



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008140303/10, 09.03.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.03.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.03.2006 US 60/781,860

(43) Дата публикации заявки: 20.04.2010 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 27.12.2012 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: EP 1506786 A1, 16.02.2005. EP 1524274 A1,
20.04.2005. US 2005059015 A1, 17.03.2005. RU
2005104841 A, 10.09.2005.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 13.10.2008(86) Заявка РСТ:
US 2007/006189 (09.03.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/108990 (27.09.2007)

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

МИНТЦ Лиат (US)

(73) Патентообладатель(и):

МИНТЦ Лиат (US)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ВАРИАНТА СПЛАЙСИНГА ГРЕЛИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КАХЕКСИИ,
И/ИЛИ АНОРЕКСИИ, И/ИЛИ АНОРЕКСИИ-КАХЕКСИИ, И/ИЛИ НАРУШЕНИЯ ПИТАНИЯ,
И/ИЛИ ЛИПОДИСТРОФИИ, И/ИЛИ МЫШЕЧНОГО ИСТОЩЕНИЯ, И/ИЛИ СТИМУЛЯЦИИ
АППЕТИТА

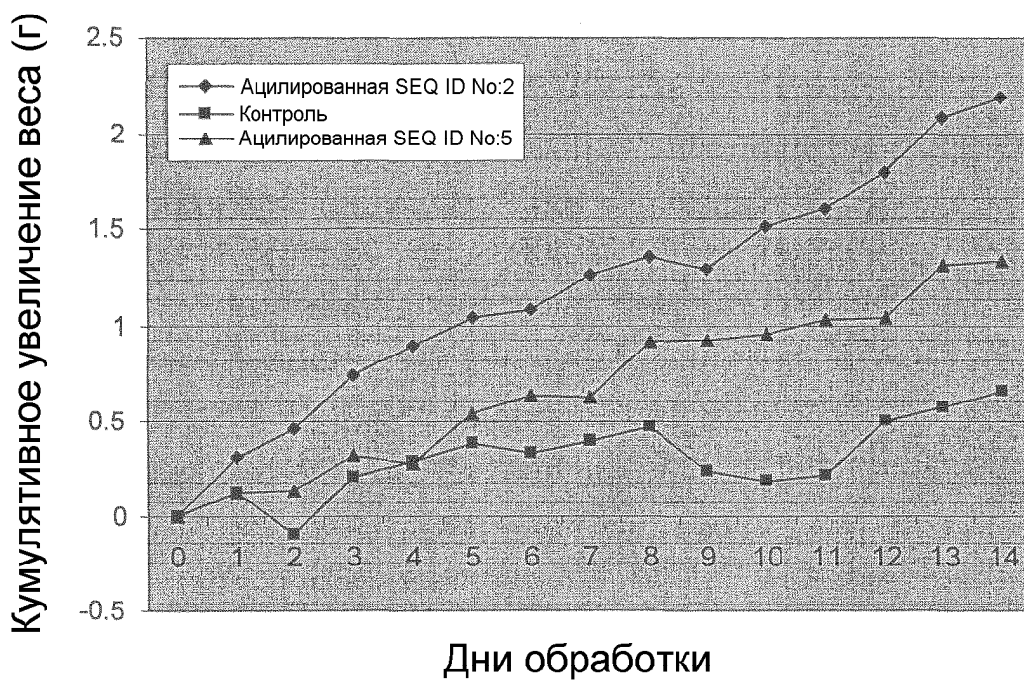
(57) Реферат:

Изобретение относится к области генной инженерии, конкретно к получению вариантов сплайсинга грелина, и может быть использовано в медицине. Изобретение позволяет использовать полученное соединение варианта сплайсинга грелина для производства

эффективного лекарственного средства, активирующего увеличение веса тела и потребление пищи и/или стимулирующего высвобождение гормона роста, а также для лечения или предупреждения кахексии, липодистрофии и мышечного истощения. 4 н. и 2 з.п. ф-лы, 6 ил., 13 пр.

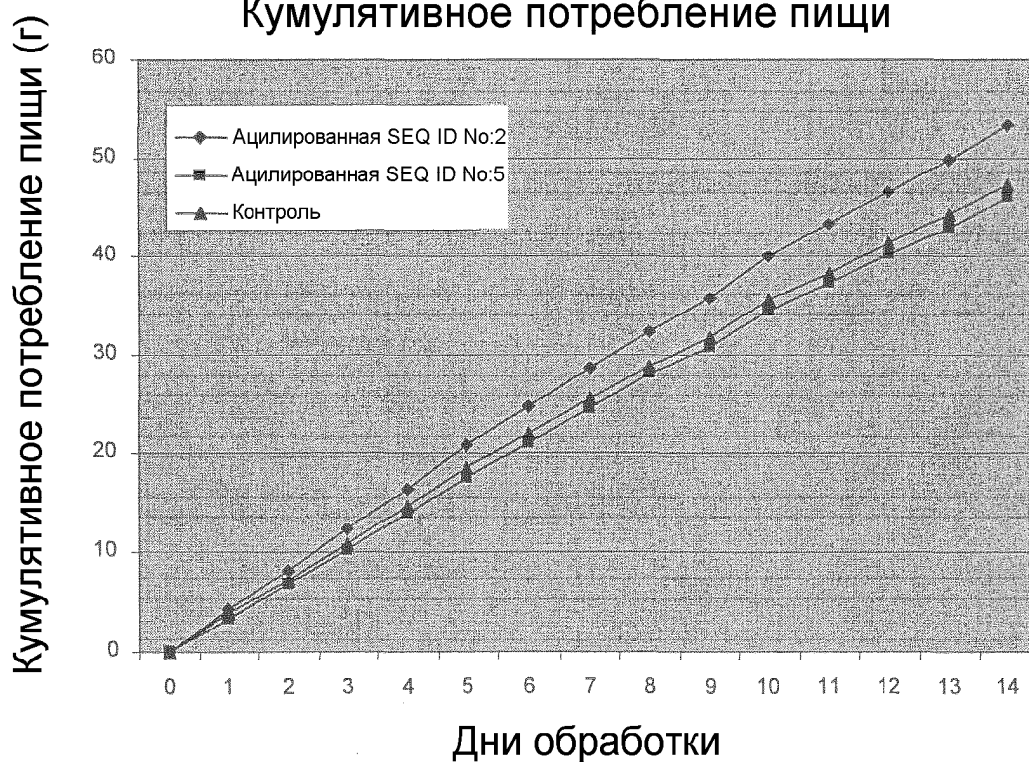
А.

Кумулятивное увеличение веса тела



В.

Кумулятивное потребление пищи



Фиг. 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/60 (2006.01)**A61P 1/14** (2006.01)**A61P 5/06** (2006.01)**A61K 38/25** (2006.01)**A61P 5/02** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2008140303/10, 09.03.2007**(24) Effective date for property rights:
09.03.2007

Priority:

(30) Convention priority:
13.03.2006 US 60/781,860(43) Application published: **20.04.2010 Bull. 11**(45) Date of publication: **27.12.2012 Bull. 36**(85) Commencement of national phase: **13.10.2008**(86) PCT application:
US 2007/006189 (09.03.2007)(87) PCT publication:
WO 2007/108990 (27.09.2007)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**(72) Inventor(s):
MINTTs Liat (US)(73) Proprietor(s):
MINTTs Liat (US)**(54) USE OF GHRELIN SPLICING VERSION FOR TREATING CACHEXIA AND/OR ANOREXIA, AND/OR ANOREXIA-CACHEXIA, AND/OR EATING DISORDER, AND/OR LIPODYSTROPHY, AND/OR MUSCLE ATROPHY, AND/OR APPETITE STIMULATION**

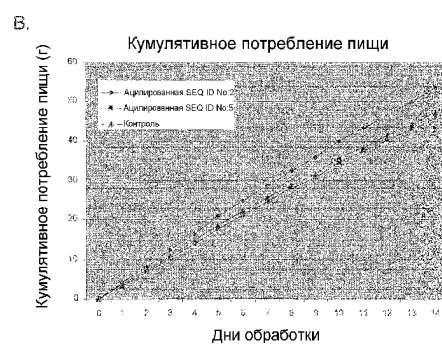
(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention provides using a prepared compound of a ghrelin splicing version for preparing an effective drug preparation activating body weight and food intake gain and/or stimulating growth hormone release, as well as for treating or preventing cachexia, lipodystrophy and muscle atrophy.

EFFECT: higher clinical effectiveness.

6 cl, 6 dwg, 13 ex



Фиг. 1

RU 2 4 7 0 9 4 0 C 2

RU 2 4 7 0 9 4 0 C 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Эта заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент США № 60/781860, поданной 13 марта 2006, которая полностью включена сюда посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к соединениям для лечения или предупреждения кахексии, и/или липодистрофии, и/или мышечного истощения и связанных с ними состояний.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Грелин является биоактивным пептидом, который стимулирует потребление пищи, увеличение веса тела и ожирение у грызунов (Tschop M. et al., Nature 407: 903-13 (2000); Wren A.M. et al., Diabetes 50: 2540-47 (2001)). Экстренное введение грелина стимулирует потребление пищи у здоровых мужчин и женщин (Wren A.M. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 5992-95 (2001); Druce M.R. et al., Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 29: 1130-36 (2005)), а также у раковых больных с анорексией (Neary N.M. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 89: 2832-36 (2004)). Многократное введение грелина увеличивает тощую массу тела, вес тела и потребление пищи у страдающих кахексией больных с хроническим обструктивным заболеванием легких (COPD) (Nagaya N. et al., Chest 128: 1187-93 (2005)) и уменьшает мышечное истощение у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (Nagaya N. et al., Circulation 110: 3674-79 (2004)). Схожий эффект был также продемонстрирован в модели на мышцах (Hanada T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 301: 275-79 (2003)).

Опухолевый рост связан с кардинальными метаболическими и нейрохимическими изменениями, которые приводят к возникновению синдрома анорексии-кахексии. Анорексия определяется как утрата желания есть, в то время как кахексия является результатом прогрессирующего истощения массы скелетных мышц и в меньшей степени жировой ткани, происходящего как раз до того, как становится очевидной потеря веса. Синдром раковой анорексии-кахексии в высокой степени распространен среди больных раком, оказывает большое влияние на заболеваемость и смертность и ударяет по качеству жизни больного. Однако его клиническую значимость часто пропускают, и обычно приступают к лечению только во время запущенных стадий заболевания (Laviano A. et al., Nat. Clin. Pract. Oncol. 3: 158-65 (2005)).

Грелин секретируется в предшествующей приему пищи ситуации, начинающейся за 1-2 часа до приема пищи, приводя к резкому, кратковременному скачку в уровнях грелина в плазме до приема пищи, и продолжающейся короткое время после начала приема пищи. Поскольку грелин является единственным известным продуцируемым периферически, вызывающим аппетит (возбуждающим аппетит) веществом, полагают, что увеличение уровней грелина в плазме является критическим для начала приема пищи.

Играя роль ключевого стимулятора аппетита, грелин, высвобождаемый из клеток эндокринной системы в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, может действовать как локально в качестве паракринного вещества, так и центрально в качестве гормона, как описано ниже в разделе, относящемся к раковой кахексии.

Ген GHRL (грелина) кодирует множество продуктов, являющихся результатом альтернативно сплайсированных транскриптов, различных типов расщепления препропептидов и различных посттрансляционных модификаций (Kojima M. & Kangawa M., Physiol. Rev. 85: 495-522 (2005); Zhang J.V. et al., Science 310: 996-99 (2005)). Кроме того, различными тканями продуцируются различные продукты

деградации (De Vriese C. et al., *Endocrinology* 145: 4997-5005 (2004)). Некоторые из этих продуктов GHRL описываются здесь.

Грелин является пептидом из 28 аминокислот, имеющим н-октаноильную боковую цепь у третьего серина, являющимся результатом отщепления сигнального пептида и пропептида от препрогрелина из 117 аминокислот и ацилирования.

Ацилированный N-конец грелина необходим для эндокринных функций (Kojima M. et al., *Nature* 402: 656-60 (1999); Bednarek M.A. et al., *J. Med. Chem.* 43: 4370-76 (2000)).

Показано, что грелин без ацила, у которого отсутствуют эндокринные функции, оказывает антагонистическое действие на влияние грелина на продукцию глюкозы *in vitro* (Gauna C. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 5035-42 (2004)).

Альтернативно сплайсированная мРНК грелина кодирует препропептид из 116 аминокислот, который далее процессируется в дез-Gln14-грелин и процессированный пептид из 27 аминокислот (Hosoda H. et al., *J. Biol. Chem.* 275: 21995-22000 (2000)).

Другой пептид, обестатин, отщепляется от препрогрелина и не имеет перекрытия последовательности с процессированным пептидом грелина. Показано, что этот пептид оказывает некоторое антагонистическое действие на ацилированный грелин, ингибируя потребление пищи и увеличение веса тела (Zhang J.V. et al., *Science* 310: 996-99 (2005)). Также может быть функционирующим еще один пептид, C-конец препрогрелина из 66 аминокислот (Pemberton C. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 310: 567-73 (2003)). Множество изоформ, в том числе изоформ, кодируемых различными вариантами сплайсинга, известны для других белков, например, для фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), причем различные изоформы имеют общую роль в виде развития кровеносных сосудов, при этом они отличаются по некоторым другим свойствам, таким как аффинность связывания (Neufeld G. et al., *FASEB J.* 13: 9-22 (1999)). Таким образом множество продуктов гена GHRL может отражать подобным образом сложный контроль эндокринного и паракринного действия изоформ грелина.

Ранее было показано, что введение грелина с помощью непрерывных инфузий доз 5 пмоль/кг/мин в течение 270 минут увеличивает потребление пищи здоровыми людьми (Wren A.M. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 5992-95 (2001)). Также было показано, что инфузия грелина в течение 90 минут может увеличить на 30% потребление пищи больными с раковой кахексией (Abstract P09, Digestive Hormones, Appetite and Energy Balance, Baylis and Starling meeting, London, June 2003). Недавно было показано, что подкожная инъекция 3,6 нмоль/кг ацилированного грелина до приема пищи, обеспечивая, таким образом, имитацию, близкую к встречающейся в природе ситуации, предшествующей приему пищи, увеличивало поступление энергии на 27%. Также, по-видимому, грелин увеличивал воспринимаемую аппетитность предлагаемого пищевого продукта (Druce M.R. et al., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 29: 1130-36 (2005)).

Эти исследования демонстрируют, что парентеральное введение грелина может увеличить аппетит как у нормальных субъектов, так и у пациентов с утратой аппетита. Кроме того, заявитель обнаружил, что можно получить значительный эффект увеличения веса тела и значительное увеличение потребления пищи с помощью нового варианта сплайсинга грелина (смотри находящуюся в совладении и в процессе одновременного рассмотрения опубликованную заявку на патент США № 2005/0059015, включенную сюда посредством ссылки) при введении субъекту, в частности, при введении подкожно до приема пищи, обеспечивая, таким образом, имитацию, близкую к встречающейся в природе ситуации, предшествующей приему

пищи. Эффект нового варианта сплайсинга грелина заявителя на увеличение веса направлен, главным образом, на тощую массу, в то время как эффект грелина на увеличение веса направлен, главным образом, на жировую массу.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Одним аспектом является подобное варианту сплайсинга грелина соединение, имеющее формулу $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2
10 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой;
15 Z2 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$ составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% SEQ ID NO: 1.

Другим аспектом является фармацевтическая композиция, содержащая подобное варианту сплайсинга грелина соединение, имеющее формулу $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу;
25 каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо
30 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$
35 составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% SEQ ID NO: 1.

Дальнейшим аспектом является способ лечения кахексии, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему фармацевтически приемлемого количества
40 (a) варианта сплайсинга грелина; (b) подобного варианту сплайсинга грелина соединения, имеющего формулу $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической
45 аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой
50 гидрофобной группой; Z2 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$ составляет 15-94

аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% SEQ ID NO: 1; или (с) их смеси.

Дополнительным аспектом является способ предупреждения кахексии, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему фармацевтически приемлемого количества (а) варианта сплайсинга грелина; (b) подобного варианту сплайсинга грелина соединения, имеющего формулу $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$ составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% SEQ ID NO: 1; или (с) их смеси.

Дальнейшим аспектом является способ стимуляции аппетита, потребления пищи и/или увеличения веса, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему фармацевтически приемлемого количества (а) варианта сплайсинга грелина; (b) подобного варианту сплайсинга грелина соединения, имеющего формулу $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$ составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% SEQ ID NO: 1; или (с) их смеси.

Другим аспектом является способ лечения липодистрофии, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему фармацевтически приемлемого количества (а) варианта сплайсинга грелина; (b) подобного варианту сплайсинга грелина соединения, имеющего формулу $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой

гидрофобной группой; Z2 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2 составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% SEQ ID NO: 1; или (с) их смеси.

Дальнейшим аспектом является способ предупреждения липодистрофии, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему фармацевтически приемлемого количества (а) варианта сплайсинга грелина; (b) подобного варианту сплайсинга грелина соединения, имеющего формулу Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2 составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% SEQ ID NO: 1; или (с) их смеси.

Другим аспектом является способ лечения мышечного истощения, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему фармацевтически приемлемого количества (а) варианта сплайсинга грелина; (b) подобного варианту сплайсинга грелина соединения, имеющего формулу Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2 составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% SEQ ID NO: 1; или (с) их смеси.

Дальнейшим аспектом является способ предупреждения мышечного истощения, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему фармацевтически приемлемого количества (а) варианта сплайсинга грелина; (b) подобного варианту сплайсинга грелина соединения, имеющего формулу Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота

модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой
 5 необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2 составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней
 10 мере 80% SEQ ID NO: 1; или (с) их смеси.

Дополнительным аспектом является способ лечения кахексии, и/или анорексии, и/или анорексии-кахексии, и/или нарушения питания, и/или липодистрофии и/или стимуляции аппетита, включающий введение нуждающемуся в этом
 15 млекопитающему фармацевтически приемлемого количества усиливающего секрецию средства, включающего (а) вариант сплайсинга грелина; (б) подобное варианту сплайсинга грелина соединение, имеющее формулу Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и
 20 синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой
 25 необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2 составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней
 30 мере 80% SEQ ID NO: 1; или (с) их смеси; причем лечение выбирают из группы, состоящей из профилактики или лечения кахексии, профилактики или лечения липодистрофии, стимуляции аппетита, стимуляции потребления пищи, стимуляции увеличения веса, увеличения жировой массы тела, увеличения тощей массы тела или
 35 их комбинации.

Дальнейшим аспектом является набор для введения варианта сплайсинга грелина или подобного варианту сплайсинга грелина соединения, включающий (а) лекарственную форму, содержащую фармацевтически приемлемое количество (1)
 40 варианта сплайсинга грелина; (2) подобного варианту сплайсинга грелина соединения, имеющего формулу Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и
 45 синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой необязательно присутствующую
 50 защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2 составляет 15-94

аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% SEQ ID NO: 1; или (3) их смеси; и (b) необязательно инструкции в отношении введения (а).

Другой аспект предназначен для способа продуцирования подобного варианту сплайсинга грелина соединения, включающий (а) обеспечение кДНК, включающей полинуклеотидную последовательность, кодирующую подобное варианту сплайсинга грелина соединение, описанное выше; (b) встраивание указанной кДНК в экспрессирующий вектор так, чтобы кДНК была функционально связана с промотором; (с) введение указанного экспрессирующего вектора в клетку-хозяина, посредством чего указанная клетка-хозяин продуцирует указанное подобное варианту сплайсинга грелина соединение; и (d) необязательно выделения подобного варианту сплайсинга грелина соединения, продуцированного на стадии (с).

Другие объекты и преимущества станут очевидны квалифицированным в данной области техники специалистам после ссылки на подробное описание, которое следует ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 представляет собой вариант сплайсинга препрогрелина человека после сигнальной последовательности.

SEQ ID NO: 2 представляет собой вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот.

SEQ ID NO: 3 представляет собой вариант сплайсинга грелина человека из 24 аминокислот.

SEQ ID NO: 4 представляет собой модифицированный вариант сплайсинга грелина человека из 24 аминокислот.

SEQ ID NO: 5 представляет собой вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот.

SEQ ID NO: 6 представляет собой фрагмент полноразмерного варианта сплайсинга грелина человека.

SEQ ID NO: 7 представляет собой вариант сплайсинга препрогрелина мыши после сигнальной последовательности.

SEQ ID NO: 8 представляет собой вариант сплайсинга препрогрелина крысы после сигнальной последовательности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1А представляет собой линейный график, демонстрирующий кумулятивное увеличение веса тела у мышей 129Sv, подвергнутых лечению ацилированным вариантом сплайсинга грелина (SEQ ID NO: 2 и 5), по сравнению с контролями, обработанными носителем. Ацилированный вариант сплайсинга грелина вызывает увеличение веса тела у самцов мышей дикого типа ($n=10$ на группу, $P = 0,0001$). Для мышей, подвергнутых лечению один раз в день на протяжении двух недель ацилированным вариантом сплайсинга грелина (0,8 мг/кг, подкожно), кумулятивное увеличение веса у животных группы SEQ ID NO: 2 было в 3,4 раза больше, чем у контрольных животных, которым инъецировали носитель. Кумулятивное увеличение веса у животных группы ацилированной SEQ ID NO: 5 было в 2 раза больше, чем у контрольных животных, которым инъецировали носитель. Фиг. 1В представляет собой линейный график, демонстрирующий кумулятивное потребление пищи мышами 129Sv, подвергнутыми лечению ацилированным вариантом сплайсинга грелина (SEQ ID NO: 2 и 5), по сравнению с контролями, обработанными носителем. Лечение ацилированным вариантом сплайсинга грелина увеличивало потребление пищи мышами дикого типа. Мыши, подвергнутые лечению один раз в день на

протяжении двух недель ацилированным вариантом сплайсинга грелина (0,8 мг/кг, подкожно), или на 13% больше контрольных животных, которым вводили носитель (n=10 на группу, P = 0,0004).

Фиг. 2А представляет собой линейный график, демонстрирующий кумулятивное увеличение веса тела у мышей 129Sv, подвергнутых лечению ацилированным вариантом сплайсинга грелина (SEQ ID NO: 2 и 4) и неацилированной SEQ ID NO: 5, по сравнению с контролями, обработанными носителем. Ацилированный вариант сплайсинга грелина вызывает увеличение веса тела у самцов мышей дикого типа (n=8 на группу, P = 0,0001). Для мышей, подвергнутых лечению один раз в день на протяжении семи дней ацилированным или неацилированным вариантом сплайсинга грелина (7,2 мг/кг, подкожно), кумулятивное увеличение веса у животных группы SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 было в 2,2 раза больше, чем у контрольных животных, которым инъецировали носитель. Кумулятивное увеличение веса у животных группы неацилированной SEQ ID NO: 5 было на 25% меньше, чем у контрольных животных, которым инъецировали носитель. Фиг. 2В представляет собой линейный график, демонстрирующий кумулятивное потребление пищи мышами 129Sv, подвергнутыми лечению ацилированным вариантом сплайсинга грелина (SEQ ID NO: 2 и 4) и неацилированной SEQ ID NO: 5, по сравнению с контролями, обработанными носителем. Лечение ацилированным вариантом сплайсинга грелина увеличивало потребление пищи мышами дикого типа. Мыши, подвергнутые лечению один раз в день на протяжении семи дней ацилированным вариантами сплайсинга грелина (7,2 мг/кг, подкожно), или на 18% больше контрольных мышей, которым вводили носитель (n=8 на группу). Мыши, подвергнутые лечению один раз в день на протяжении семи дней SEQ ID NO: 5 (7,2 мг/кг, подкожно), или на 2% меньше контрольных животных, которым вводили носитель (n=8 на группу).

Фиг. 3 представляет собой гистограмму, демонстрирующую концентрацию гормона роста в сыворотке после подкожного введения ацилированного варианта сплайсинга грелина (SEQ ID NO: 2, 4, 5) и неацилированной SEQ ID NO: 5 по сравнению с контролями, которым вводили носитель. Демонстрируется эффект солевого раствора или ацилированного варианта сплайсинга грелина (0,8 мг/кг, подкожно) на гормон роста в плазме через 10 минут и 20 минут после инъекции мышам дикого типа (n=5 на группу).

Фиг. 4 представляет собой гистограмму, демонстрирующую изменение состава тела у мышей 129Sv, подвергнутых лечению ацилированным вариантом сплайсинга грелина (SEQ ID NO: 2 и 4), и мышей, подвергнутых лечению неацилированной SEQ ID NO: 5, по сравнению с контролями, обработанными носителем и подвергнутых лечению грелином. Демонстрируется эффект ежедневного подкожного лечения на протяжении семи дней солевым раствором, грелином или ацилированным вариантом сплайсинга грелина (7,2 мг/кг, подкожно) на жировую и тощую массу тела, измеряемую с помощью ЯМР.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявители специально включают полное содержание всех упоминаемых в этом описании ссылок. Кроме того, когда количество, концентрация или другая величина или параметр приводится или в виде диапазона, предпочтительного диапазона, или в виде перечисления верхних предпочтительных величин и нижних предпочтительных величин, это следует понимать как раскрытие, в частности, всех диапазонов, образованных любой парой из любой верхней границы диапазона или

предпочтительной величины и любой нижней границы диапазона или предпочтительной величины, независимо от того, раскрыты ли диапазоны отдельно. При упоминании здесь диапазона численных величин, если только не указано иное, диапазон, как предполагается, включает его конечные значения, и все целые числа и

В контексте этого описания будет использоваться ряд терминов.

Используемый здесь термин «аффинность» означает прочность связи между рецепторами и их лигандами, например, между антителом и его антигеном.

Используемый здесь термин «аминокислотный остаток» означает аминокислоту, образуемую при химическом расщеплении (гидролизе) полипептида по его пептидным связям. Описываемый здесь аминокислотный остаток предпочтительно находится в «L» изомерной форме. Однако аминокислота охватывает всякую аминокислоту, такую как L-аминокислота, D-аминокислота, альфа-аминокислота, бета-аминокислота, гамма-аминокислота, природная аминокислота и синтетическая аминокислота и т.п., пока полипептидом сохраняется желаемое функциональное свойство. NH_2 относится к свободной аминогруппе, присутствующей на аминоконце полипептида. COOH относится к свободной карбоксильной группе, присутствующей на карбоксильном конце полипептида. Стандартные сокращения для аминокислотных остатков полипептида продемонстрированы в таблице 1.

Таблица 1		
Однобуквенный код	Трехбуквенный код	Аминокислота
A	Ala	Аланин
B	Asx, Asn и/или Asp	Аспарагиновая кислота и/или аспарагин
C	Cys	Цистеин
D	Asp	Аспарагиновая кислота
E	Glu	Глутаминовая кислота
F	Phe	Фенилаланин
G	Gly	Глицин
H	His	Гистидин
I	Ile	Изолейцин
K	Lys	Лизин
L	Leu	Лейцин
M	Met	Метионин
N	Asn	Аспарагин
P	Pro	Пролин
Q	Gln	Глутамин
R	Arg	Аргинин
S	Ser	Серин
T	Thr	Треонин
V	Val	Валин
W	Trp	Триптофан
X	Xaa	Неизвестная или другая
Y	Tyr	Тирозин
Z	Glx, Gln и/или Glu	Глутаминовая кислота и/или глутамин
-	Dpr	2,3-диаминопропионовая кислота

Следует отметить, что все представленные здесь формулой последовательности аминокислотных остатков ориентированы слева направо в общепринятом направлении от аминоконца к карбоксильному концу. Кроме того, при широком

определении фразы «аминокислотный остаток» включает аминокислоты, перечисленные в таблице 1, и модифицированные и не встречающиеся в природе аминокислотные остатки. Кроме того, следует отметить, что тире в начале или конце последовательности аминокислотных остатков указывает пептидную связь с
 5 дополнительной последовательностью из одного или нескольких аминокислотных остатков или ковалентную связь с группой на аминоконце, такой как, NH_2 или ацетил, или с группой на карбоксильном конце, такой как COOH .

Используемый здесь термин «антинеопластическое лечение» означает лечение,
 10 нацеленное на остановку или уменьшение абнормального роста ткани (такого как неоплазма) у индивидуума. Примеры такого лечения включают противораковые терапии, такие как радиотерапия или химиотерапия.

«Аппетит» в отношении индивидуума определяют с помощью измерения количества потребляемой пищи и с помощью оценки желания индивидуума есть.
 15 Здесь аппетит (т.е. голод) обычно определяют с помощью короткой анкеты, даваемой индивидуумам на случайной основе несколько раз в неделю. Как правило, субъекты оценивают свой голод, поглощенность мыслями о еде или желание съесть большие количества и различные типы пищевых продуктов, отвечая на вопросы с использованием аналоговой шкалы от 1 (нет совсем) до 5 (предельно).
 20

«Показатель массы тела» или «ВМІ» является величиной отношения роста к весу индивидуума. ВМІ определяют расчетом веса в килограммах, поделенного на квадрат роста в метрах. «Нормальный» диапазон ВМІ составляет 18,5-25.

«Жировую массу тела» можно определить, например, с помощью метода жировой
 25 складки. В методе жировой складки используется циркуль типа пинцета для определения подкожного жира с помощью измерения толщины складки кожи в репрезентативных местах на теле. Эти измерения складок кожи затем используют для расчета жира тела или с помощью сложения показателей различных измерений,
 30 или использования этой величины в качестве индикации относительной степени ожирения среди индивидуумов, или с помощью использования измерений в математических уравнениях, которые были разработаны для предсказания процента жира тела (Fogelholm M. & van Marken Lichtenbelt W., Eur. J. Clin. Nutr. 51: 495-503 (1997)).

Используемый здесь термин «эквивалент концентрации» означает эквивалентную дозу подобного варианту сплайсинга грелина соединения, имеющей *in vitro* и/или *in vivo* ответ, одинаковый с ответом, рассчитанным по кривой доза-ответ варианта сплайсинга грелина.
 35

«Константа диссоциации» или «Kd» является величиной, характеризующей прочность связи (или аффинность, или авидность) между рецепторами и их лигандами, например, антителом и его антигеном. Чем меньше Kd, тем сильнее связывание.
 40

«Слитый полипептид» представляет собой полипептид, включающий по крайней
 45 мере два полипептида и связывающую последовательность для функционального связывания двух полипептидов в один непрерывный полипептид. Два полипептида, связанные в слитый полипептид, обычно происходят из двух независимых источников, и, следовательно, слитый полипептид включает два связанных полипептида, не обнаруживаемых, как правило, связанными в природе.
 50

Как здесь используется, «грелин человека» представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, заявленную в № доступа в GenBank® - NP_057446 или Swiss-Prot-идентификаторе GHRL_HUMAN. Препротеин

грелина человека имеет 117 аминокислот. Этот препротеин подвергается
 следующему посттрансляционному процессингу. Сигнальный пептид
 (аминокислоты 1-23) удаляется, и остающиеся 94 аминокислоты расщепляются
 протеазой с обеспечением зрелого грелина из 28 аминокислот (аминокислоты 24-51)
 или зрелого грелина из 27 аминокислот (аминокислоты 24-50) и зрелого обестатина
 из 23 аминокислот (аминокислоты 76-98). Зрелые пептиды грелина из 27 или 28
 аминокислот могут далее быть модифицированы в положении 26 серина в
 препротеине с помощью или О-октаноильной группы, или О-деcanoильной группы.
 Зрелый пептид обестатина может далее быть модифицирован в положении 98 лизина
 в препротеине с помощью амидной группы. Известен дополнительный препротеин
 грелина, в котором отсутствует глутамин в положении 37 препротеина.

«Вариант сплайсинга грелина» представляет собой полипептид, имеющий
 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или любой
 пептид из 15 аминокислот или больше из SEQ ID NO: 1 с посттрансляционной
 модификацией или без нее, или любой гомолог SEQ ID NO: 1, представленный в SEQ
 ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8, и/или любой пептид из 15 аминокислот или больше из SEQ
 ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 с посттрансляционной модификацией или без нее.

«Подобное варианту сплайсинга грелина соединение», как здесь используется,
 относится к любому соединению, которое воспроизводит функцию варианта
 сплайсинга грелина, в частности, варианта сплайсинга грелина человека, приводя, в
 частности, относительно функций варианта сплайсинга грелина, к желательным
 терапевтическим эффектам, описанным здесь, таким как стимуляция аппетита и/или
 лечение и/или профилактики кахексии, и определяется формулой I: $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную
 группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе
 аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в
 природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная
 аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3
 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической
 аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно
 модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой
 необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое
 число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при
 условии, что длина соединения в соответствии с формулой $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$
 составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней
 мере 80% (или в альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения
 на 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99%, 100%) SEQ ID NO: 1. В предпочтительном
 варианте осуществления настоящего изобретения длина подобного варианту
 сплайсинга грелина соединения составляет 22-29 аминокислот.

«Иммунологически отличный» относится к способности устанавливать различие
 между двумя полипептидами по способности антитела специфически связываться с
 одним из полипептидов и не связываться специфически с другим полипептидом.

«Индивидуумом» является животное или человек, восприимчивые к состоянию, в
 частности кахектическому состоянию, определенному здесь. В предпочтительных
 вариантах осуществления настоящего изобретения индивидуумом является
 млекопитающее, в том числе человек, и не являющиеся человеком млекопитающие,
 такие как собаки, кошки, свиньи, коровы, овцы, козы, лошади, крысы и мыши. В
 наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения

индивидуумом является человек.

«Выделенный» используется для описания различных подобных варианту сплайсинга грелина соединений, т.е. полипептидов и нуклеотидов, раскрытых здесь, которые были идентифицированы и отделены и/или очищены от компонента их природного окружения. Компоненты-примеси природного окружения являются материалами, которые обычно мешали бы диагностическим или терапевтическим применениям полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковоподобные или небелковоподобные растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения подобные варианту сплайсинга грелина соединения подвергают очистке.

Как здесь используется, «модифицированная аминокислота» представляет собой аминокислоту, произвольная группа которой химически модифицирована.

Как здесь используется, «нестандартная аминокислота» представляет собой аминокислоту, которая не принадлежит к 20 стандартным аминокислотам. Нестандартные аминокислоты обычно образуются благодаря химическим модификациям стандартных аминокислот. Они могут также быть образованы природно в виде промежуточного соединения метаболического пути или микроорганизмами и/или растениями.

«Моноклональное антитело», в его различных грамматических формах, относится к популяции молекул антител, которая содержит только одну разновидность сайта связывания антитела, способного иммунологически взаимодействовать с конкретным антигеном.

«Неацилированное подобное варианту сплайсинга грелина соединение» представляет собой подобное варианту сплайсинга грелина соединение, определенное выше, которое не содержит ацильной группы, присоединенной к любой из его аминокислот - составных частей.

«Паллиативное лечение» представляет собой лечение, с помощью которого облегчаются или ослабляются симптомы заболевания или нарушения, но без эффекта лечения.

«Поликлональные антитела» являются смесью молекул антител, узнающих данный специфический антиген; следовательно, поликлональные антитела могут узнавать различные эпитопы в указанном антигене.

«Полипептид» относится к молекуле, включающей аминокислотные остатки, которые не содержат связей, отличных от амидных связей между смежными аминокислотными остатками.

«Процессированный грелин» означает ацилированный грелин из 27 или 28 аминокислотных остатков (посттрансляционный продукт расщепления и ацилирования препрогрелина длиной 116 или 117 аминокислотных остатков, соответственно (например, SWISS-PROT Q9UBU3 GHRL_HUMAN).

«Рецептор» представляет собой молекулу, такую как белок, гликопротеин и т.п., которая может специфически (не случайно) связываться с другой молекулой.

«Усиливающее секрецию средство» представляет собой вещество, стимулирующее высвобождение гормона роста, такое как грелин или подобное грелину соединение. Усиливающее секрецию средство в соответствии с настоящим описанием можно, например, выбрать из L-692-429 и L-692-585 (соединений бензоэлактама; доступных от Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, NJ), MK677 (спироинданера, доступного от Merck), G-7203, G-7039, G-7502 (пептидомиметиков в виде изонипекотиновой кислоты, доступных от Genentech, Inc., South San Francisco, Calif.), NN703 (Novo Nordisk

Inc., Princeton, NJ) или ипаморелина. В частности, усиливающим секрецию средством является подобное варианту сплайсинга грелина соединение, в том числе вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот, вариант сплайсинга грелина человека из 24 аминокислот или вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот (например, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5).

В одном варианте осуществления усиливающее секрецию гормона роста средство может быть неацилированным, например неацилированной формой варианта сплайсинга грелина или неацилированным, подобным варианту сплайсинга грелина соединением.

«Молекула поверхностно-активного вещества» является молекулой, включающей гидрофобную часть и гидрофильную часть, т.е. молекулой, способной присутствовать в интерфазе между липофильной фазой и гидрофильной фазой.

Показания

Настоящее описание относится к применению усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, для лечения или профилактики состояний, например, относящихся к патологической потере веса или утрате тощей и/или жировой массы, в том числе а) профилактики или лечения кахексии, и/или б) профилактики или лечения липодистрофии, и/или с) стимуляции аппетита, и/или d) стимуляции потребления пищи, и/или e) стимуляции увеличения веса, и/или f) увеличения жировой массы тела, и/или g) увеличения тощей массы тела. В частности, настоящее описание относится к лечению или профилактике кахексии, и/или стимуляции аппетита, стимуляции аппетита, повышению качества жизни, наиболее предпочтительно профилактике или лечению кахексии.

Кахексия

Кахексия является одним из самых огорчающих и пагубных симптомов нескольких тяжелых заболеваний, таких как рак, забирающих у индивидуумов их энергию, чувство благополучия, качество жизни и увеличивающих их зависимость от других. Кахексия часто сопровождает злокачественные опухоли поджелудочной железы, желудка, пищевода, легкого и кишечника.

Самым главным признаком кахексии является потеря веса, не только жировой ткани, но также мышечной ткани и даже кости. Эта нежировая ткань также известна как «тощая масса тела». Кроме того, существует утрата аппетита (анорексия), слабость (астения) и снижение уровня гемоглобина (анемия).

Лечение кахексии является не просто чем-либо вроде большего потребления пищи. Даже если индивидуум хочет есть, даже если индивидуум пытается есть, даже если индивидууму даются питательные вещества через гастральный зонд или внутривенно, состояние, как правило, не меняется.

Недавнее исследование показало, что в настоящее время состояние рассматривают в качестве части реакции организма на присутствие лежащей в основе болезни (Laviano A. et al., Nat. Clin. Pract. Oncol. 2: 158-65 (2005)). Недавнее исследование также показало, что в некоторых случаях сами опухоли продуцируют вещества, которые вызывают кахексию (Esper D.H. & Harb W.A., Nutr. Clin. Pract. 20: 369-76 (2005)).

Кахексия, или истощение, как ее можно также называть, наблюдается при нескольких заболеваниях, таких как СПИД, рак, состояние после перелома костей тазобедренного сустава, хроническая сердечная недостаточность, хроническое заболевание легких, такое как GOLD (хроническое обструктивное заболевание легких) и COPD (хроническое обструктивное легочное заболевание), цирроз печени,

почечная недостаточность, аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит и системная волчанка, сепсис, туберкулез, муковисцидоз, болезнь Крона и тяжелая инфекция. Кроме того, истощение также наблюдается при старении.

Хотя кахексия представляет собой сложный метаболический синдром, который наблюдается у таких больных, он обычно распознается как прогрессирующая потеря веса с истощением у хозяина запасов жировой ткани и скелетной мускулатуры.

Раковая кахексия

Сущность синдрома раковой кахексии связана с проблемой прогрессирующего роста опухоли и катаболическими побочными эффектами общепринятой антинеопластической терапии. Эти два явления вызывают изменения в нейроэндокринной системе, продукцию множества провоспалительных цитокинов и высвобождение специфических для рака кахектических факторов. В свою очередь эти медиаторы вызывают уменьшение потребления пищи, аномальность в метаболизме или комбинацию этих двух эффектов.

Как сообщается, раковая кахексия встречается у приблизительно половины всех больных раком, и она связана с более чем 20 процентами смертей от рака (Tisdale M.J., Nat. Rev. Cancer 2: 862-71 (2002)). Это состояние часто имеет место во время запущенного рака, в частности, когда в организме присутствуют метастатические опухоли. Кахексия является также более частой у детей и пациентов пожилого возраста. Также последовательно определены конкретные раковые заболевания, при которых частота раковой кахексии является особенно высокой: раковые заболевания верхнего отдела желудочно-кишечного тракта (в том числе поджелудочной железы, желудка, пищевода и печени (Bruera E., Br. Med. J. 315: 1219-22 (1997); Palesty J.A. et al., Dig. Dis. 21: 198-213 (2003)), рак легкого, в частности мелкоклеточный рак легкого; рак головы и шеи; рак ободочной кишки и прямой кишки, другие солидные опухоли (Bruera E., Br. Med. J. 315: 1219-22 (1997)). IWL (непроизвольная потеря веса) была связана со снижением на приблизительно 50% выживаемости и сниженной переносимостью противораковой терапии (Laviano A. et al., Nat. Clin. Pract. Oncol. 2: 158-65 (2005)). Местоположениями рака, ассоциируемыми с наибольшими рисками потери веса, являются местоположения, влияющие на аэропищеварительный тракт (легкое, голову и шею и пищевод) и желудочно-кишечную систему, особенно поджелудочную железу, желудок и печень. Кроме того, в момент диагностирования 80% всех больных раком верхнего отдела желудочно-кишечного тракта и 60% всех больных раком легкого уже испытали значительную потерю веса (Bruera E., Br. Med. J. 315: 1219-22 (1997)). В среднем распространенность кахексии возрастает с 50% до более 80% перед смертью, и для более 20% больных кахексия является основной причиной смерти (Bruera E., Br. Med. J. 315: 1219-22 (1997)).

Обнаружение раковой кахексии

Состояние питания оценивают с помощью комбинации клинической оценки, антропометрических проверок (веса тела, толщины складок кожи и средней длины окружности руки) и получения изображения (сканограммы DEXA, сканограммы MR, сканограммы СТ и измерение биоэлектрического сопротивления). Кахексию обычно подозревают, если непроизвольная потеря веса, составляющая более 5% предклинического веса, наблюдается в пределах периода в шесть месяцев - особенно если она сочетается с мышечным истощением.

Наиболее часто используемым лабораторным показателем является

сывороточный альбумин. Однако он является неспецифическим показателем. Другими маркерами являются белки с коротким полупериодом существования; также использовались трансферрин и транстиретин.

Другими маркерами кахексии являются IGF-1, IGFBP-3, ALP (щелочная фосфатаза) и тестостерон.

Связь между раком и раковой кахексией

Рак может вызывать кахексию через ряд механизмов, включающих индукцию анорексии и/или увеличение или изменение метаболизма, как описано ниже.

Анорексия

Показано, что поступление энергии значительно снижается у теряющих вес больных раком. Больные раком могут часто страдать от физической обструкции желудочно-кишечного тракта, боли, депрессии, запора, нарушения всасывания, истощения или побочных эффектов лечения (такого как, например, лечения опиатами, радиотерапией или химиотерапией), все из которых могут уменьшить потребление пищи (Barber M.D. et al., Surg. Oncol. 8: 133-41 (1999)). Сопровождающая рак гиперкальциемия может также вызывать тошноту, рвоту и потерю аппетита.

Однако остается большое число больных раком, у которых нет очевидной клинической причины сниженного потребления пищи.

Центральный механизм индуцируемой раком анорексии и кахексии является сложным и включает много различных цитокинов, гормонов и других фактов, продуцируемых раковыми клетками.

Лептин

В нормальных физиологических ситуациях лептин играет важную роль в иницировании адаптивного ответа на голодание, поскольку потеря веса вызывает снижение уровней лептина пропорционально потере жира тела. Однако, у больных раком увеличенный уровень цитокинов (например, IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ), продуцируемых раковыми клетками, может стимулировать экспрессию и/или высвобождение лептина. Другим возможным механизмом цитокинов является то, что они воспроизводят гипоталамический эффект экстенсивного отрицательного сигнала обратной связи от лептина, приводя к предотвращению нормального компенсаторного механизма, касающегося потребления пищи и веса тела.

NPY (нейропептид Y)

Гипоталамическая NPY система является одним из ключевых нервных путей, нарушаемым при анорексии и раке, индуцируемых IL-1 или другими цитокинами. Цитокины снижают чувствительность к NPY. Показано, что NPY является регулирующим рост фактором для опухолей нейроэндокринной системы, действующим как путем аутокринной активации пролиферации опухолевых клеток или апоптоза, так и путем развития кровеносных сосудов (Kitlinska J. et al., Cancer Res. 65: 1719-28 (2005)). Кроме того, обнаружено, что рецепторы для Y1 и Y2 экспрессируются при раках молочной железы, опухолях надпочечника и родственных опухолях, почечноклеточных карциномах и раках яичника как в опухолевых клетках, так и в связанных с опухолями кровеносных сосудах. Их широкая экспрессия в раковых клетках позволяет им опосредовать эффекты NPY на пролиферацию раковых клеток и поставку крови к опухолям (для обзора смотри Körner M & Reubi JC, Peptides 28: 419-25 (2007)).

Меланокортины

Аберрантная передача сигнала от меланокортинов может быть фактором, содействующим как анорексии, так и кахексии. Несмотря на очевидную потерю веса,

которая, как следовало бы в норме ожидать, супрессирует систему передачи сигнала от анорексигенных меланокортинов в качестве пути сохранения запасов энергии, система меланокортинов остается активной во время индуцируемой раком кахексии. Центральное блокирование меланокортинов с помощью AgRP (родственного агуты пептида) или других антагонистов реверсировала анорексию и кахексию в моделях на животных, что говорит о патогенной роли этой системы (Wisse B.E. et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 994: 275-81 (2003)). Кроме того, недавние эксперименты показали, что блокирование передачи сигнала от меланокортинов с использованием антагонистов в отношении рецептора меланокортина MC(4) уменьшает сопровождающую заболевание анорексию и истощение в моделях рака и почечной недостаточности на грызунах (DeBoer MD & Marks DL, Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 2: 459-66 (2006)).

Метаболизм

Гиперметаболизм определяется как повышение расхода энергии покоя (REE) и является главным признаком кахексии. Общий расход энергии включает REE (приблизительно 70%) и сознательный расход энергии (приблизительно 25%), и расход энергии при пищеварении (5%). Сознательный расход энергии может быть снижен при кахексии, которая может клинически проявляться в виде апатии, усталости и депрессии.

Орексигенные (вызывающие аппетит) и анорексигенные сигналы, как известно, соответственно уменьшают и увеличивают активность симпатической нервной системы, которая регулирует REE путем активации термогенеза в бурой жировой ткани у грызунов и возможно мышце людей, через индукцию митохондриальных разъединяющих белков (UCP) (Alvarez R. et al., J. Biol. Chem. 270: 5666-73 (1995)). Было высказано предположение, что активация UCP в мышце и белой жировой ткани цитокинами могла бы быть одним из молекулярных механизмов, лежащих в основе увеличения производства тепла и мышечного истощения (Inui A., CA Cancer J. Clin. 52: 72-91 (2002); Fearon K.C. & Moses A.G., Int. J. Cardiol. 85: 73-81 (2002)).

У больных раком также был описан измененный пищевой метаболизм. Солидные опухоли продуцируют большие количества лактата, который превращается обратно в глюкозу благодаря процессу, в котором используются большие количества АТФ и которой является очень неэффективным энергетически, что дополнительно, таким образом, увеличивает расход энергии. Кроме того, было показано, что происходящий из опухолей мобилизирующий липиды фактор (LMF) действует непосредственно на адипоциты и вызывает увеличение липолиза, приводя к высвобождению свободной жирной кислоты и глицерина (Islam-Ali B. et al., Br. J. Cancer 85: 758-63 (2001)) и уменьшая токсичность свободных радикалов в опухолевых клетках (Sanders PM & Tisdale MJ, Br. J. Cancer 90: 1274-78 (2004)).

Также предположили, что увеличенный уровень цитокинов может опосредованно индуцировать катаболизм мышечных белков посредством влияния на процесс мышечного восстановления (Islam-Ali B. et al., Br. J. Cancer 85: 758-63 (2001)).

Обоснование применения усиливающего секрецию средства для лечения раковой кахексии

Не связанное теорией обоснование для лечения усиливающим секрецию средством, в частности, подобным варианту сплайсинга грелина соединением, основано на следующем: вариант сплайсинга грелина, высвобождаемый из эндокринных клеток в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, может действовать как локально в качестве паракринного вещества, так и центрально в качестве гормона. Локально вариант сплайсинга грелина может действовать в

качестве инициатора афферентной активности, например, в афферентных вагусных нейронах. Такие нейроны будут передавать стимул от варианта сплайсинга грелина в центры центральной нервной системы, такие как ядро одиночного пути (NTS), которые далее устанавливают связь с центрами, регулирующими аппетит и гомеостаз энергии, такими как паравентрикулярное ядро и дугообразное ядро в гипоталамусе. В качестве гормона вариант сплайсинга грелина, как полагают, действует на центральные регулирующие аппетит POMC- (проопиомеланокортин) и NPY/AgRP-нейроны, которые экспрессируют рецепторы для вариантов сплайсинга грелина.

Недавно описывалось, что грелин перемещается через барьер кровь - головной мозг (Banks W.A. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 302: 822-27 (2002)). Важно отметить, что в центральном регулирующем аппетит центре, например, в NPY/AgRP-нейронах - т.е. нейронах первого уровня в стимулирующей ветви контроля аппетита, грелин, действующий через стимулирующие рецепторы грелина, является единственным известным стимулирующим входным сигналом с периферии. Все известные гормоны и нейромедиаторы, например, лептин, инсулин, PYY3-36, α -MSH и т.п., действуют как ингибиторы NPY/AgRP-нейронов в этом важном контролирующем аппетит центре. Поскольку NPY-система супрессирована во время индуцированной раком кахексии, стимуляция этой системы с помощью грелина может быть способна нормализовать состояние. Аналогично, меланокортин, являющийся активным во время индуцированной раком кахексии, может быть ингибирован грелином и вариантом сплайсинга грелина через стимуляцию AgRP.

Также показано, что увеличение концентрации грелина приводит к увеличению АСТН (адренотропного гормона) с получаемым в результате увеличением уровня кортизола. Это действие может иметь важные благотворные последствия для лечения кахексии, поскольку кортизол снижает уровень цитокинов (например, IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- α). Введение глюкокортикоидов уже широко используется в паллиативном регулировании симптомов, связанных с раком (Inui A., CA Cancer J. Clin. 52: 72-91 (2002)). Кроме того, было показано, что инъекция в кардиоваскулярную систему грелина снижает температуру основы тела у грызунов, что указывает на снижение REE (Lawrence C.B. et al., Endocrinology 143: 155-62 (2002)). Снова высказывается не связанное теорией предположение, что вариант сплайсинга грелина, схожий с грелином дикого типа, будет реверсировать увеличение REE, которое является важным признаком кахексии, описанным выше.

Усиливающее секрецию средство, в частности, подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно вводить с использованием любой подходящей схемы, принимая во внимание сведения об ожидаемом прогрессировании рака, а также схеме антинеопластической терапии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривается, что в соответствии с настоящим описанием усиливающее секрецию средство можно вводить любому индивидууму, страдающему любым типом рака, независимо от этиологии, для успешного лечения, уменьшения или предупреждения раковой кахексии.

Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения лечение индивидуума усиливающим секрецию средством, таким как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, предназначено для лечения или предупреждения раковой кахексии, вызванной, например, одним или несколькими из следующих типов рака: острым лимфобластным лейкозом, острым миелоидным лейкозом, адренотропической

карциномой, связанными со СПИДом раками, связанной со СПИДом лимфомой,
 раком анального канала, астроцитомой, астроцитомой мозжечка у детей,
 базальноклеточной карциномой мозга у детей, раком внепеченочного желчного
 протока, раком мочевого пузыря, раком кости, остеосаркомой/злокачественной
 5 фиброзной гистиоцитомой, глиомой ствола мозга, опухолью головного мозга,
 раком молочной железы, аденомами/карциноидами бронхов у мужчин, лимфомой
 Беркитта, карциноидной опухолью, первичной карциномой неизвестной
 локализации, лимфомой центральной нервной системы, первичной
 10 астроцитомой/злокачественной глиомой мозга, цервикальным раком, раками у
 детей, хроническим лимфоцитарным лейкозом, хроническим миелогенным лейкозом,
 хроническими миелопролиферативными нарушениями, раком ободочной кишки, Т-
 клеточной лимфомой кожи, раком эндометрия, эпендимальной глиомой, раком
 15 пищевода у детей, семейством опухолей Юинга, внечерепной опухолью из половых
 клеток, опухолью из половых клеток вне половой железы у детей, раком глаза,
 раком глаза - внутриглазной меланомой, ретинобластомой - раком желчного
 пузыря, раком желудка, карциноидной опухолью желудочно-кишечного тракта,
 трофобластной опухолью матки, глиомой, волосоклеточным лейкозом, раком
 20 головы и шеи, печеночноклеточным раком, лимфомой Ходжкина, раком глотки-
 пищевода, глиомой гипоталамуса и оптических путей, внутриглазной меланомой -
 инсуломой (поджелудочной железы внутренней секреции), раком почки - саркомой
 Капоши, раком гортани, раком губы и ротовой полости, раком легкого,
 немелкоклеточным раком легкого, мелкоклеточной лимфомой, связанной со
 25 СПИДом лимфомой, Т-клеточной лимфомой кожи, неходжкинской
 макроглобулинемией, злокачественной фиброзной гистиоцитомой
 кости/остеосаркомой Вальденстрема, медуллобластомой, меланомой - раком клеток
 Меркеля, мезотелиомой, злокачественной мезотелиомой у взрослых,
 30 метастатическим сквамозным раком шеи у детей с первичным синдромом
 множественной эндокринной неоплазии неизвестного происхождения,
 множественной миеломой/плазмноклеточной неоплазией у детей, фунгоидной
 гранулемой, миелодиспластическими синдромами,
 миелодиспластическими/миелопролиферативными заболеваниями, миеломой,
 35 множественными хроническими миелопролиферативными нарушениями, раком
 носовой полости и околоносовой пазухи, раком носоглотки, небластомой у детей,
 раком ротоглотки, остеосаркомой/злокачественной фиброзной гистиоцитомой
 кости, раком яичника, эпителиальным раком яичника у детей, опухолью из половых
 40 клеток яичника, опухолью яичника с низким потенциалом злокачественности, раком
 поджелудочной железы, раком околоносовой пазухи и носовой полости, раком
 паращитовидной железы, сенильным раком, феохромоцитомой, пинеалобластомой и
 расположенными над мозжечковым наметом, примитивными
 нейроэктодермальными опухолями, опухолью гипофиза у детей, плеврорлегочной
 45 бластомой, раком предстательной железы, раком почечной лоханки и мочеточника,
 переходно-клеточным раком - ретинобластомой, рабдомиосаркомой, раком
 слюнной железы у детей, возникающей у взрослых саркомой мягких тканей,
 саркомой, саркомой матки у детей, ретикулезом Сезари, раком кожи (не являющимся
 50 меланомой), карциномой кожи, раком клеток Меркеля тонкой кишки,
 расположенными над мозжечковым наметом, примитивными
 нейроэктодермальными опухолями, Т-клеточной лимфомой кожи у детей, раком
 яичка, тимомой и карциномой зубной железы, раком щитовидной железы, переходно-

клеточным раком почечной лоханки и мочеточника, трофобластной опухолью, раком мочеточника и почечной лоханки у беременных, переходно-клеточным раком, раком мочеиспускательного канала, раком эндометрия тела матки, саркомой матки, раком влагалища, глиомой оптических путей и гипоталамуса,
 5 макроглобулинемией Вальденстрема у детей, опухолью Вильмса.

Как обсуждалось выше, раковая кахексия может быть вызвана катаболическим нарушением, например гиперметаболическим состоянием, описанным выше, являющимся результатом или прогрессирующего роста опухоли, или
 10 катаболических побочных эффектов противораковой терапии. Однако раковая кахексия может также быть вызвана таким аноректическим нарушением, каким является случай, когда индивидуум, страдающий раком, не имеет аппетита, или местоположение опухоли уменьшает потребление пищи или препятствует ему.

Соответственно, один вариант осуществления настоящего изобретения
 15 предназначен для лечения или предупреждения с помощью усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, раковой кахексии, вызванной катаболическим нарушением. Это, в частности, применимо, когда раком является рак желудочно-кишечного тракта, особенно рак верхнего
 20 отдела желудочно-кишечного тракта (здесь следует понимать, что термин «рак верхнего отдела желудочно-кишечного тракта» также охватывает рак поджелудочной железы), рак легкого (в частности, мелкоклеточный рак легкого) и/или рак печени (здесь следует понимать, что термин «рак печени» также охватывает метастатический раковый процесс в печени).

Другой вариант осуществления настоящего изобретения предназначен для
 25 лечения или предупреждения с помощью усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, раковой кахексии, вызванной аноректическим нарушением.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения предназначен для
 30 лечения или предупреждения с помощью усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, раковой кахексии независимо от того, каким образом рак вызвал кахексию, а также кахексии, вызванной комбинацией катаболического нарушения и аноректического нарушения.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения
 35 усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, используют для лечения или предупреждения раковой кахексии, вызванной солидной опухолью.

Другой подгруппой раков являются раки с анорексией, вызванной нарушением
 40 регуляции центрального регулирующего аппетит центра в гипоталамусе, когда исключены другие возможные причины уменьшения потребления пищи.

У специфических индивидуумов на последних стадиях рака, когда невозможно
 45 дальнейшее лечение рака, лечение вариантом сплайсинга грелина в качестве паллиативного лечения для увеличения потребления пищи, улучшения пищеварения и улучшения метаболизма может оказаться благотворным. Соответственно другой аспект относится к паллиативному лечению для увеличения потребления пищи,
 50 улучшения пищеварения и улучшения метаболизма у индивидуума, нуждающегося в этом, например, когда указанный индивидуум страдает запущенным раком, в частности раком последних стадий.

В соответствии с отмеченным выше раскрытые здесь соединения применимы, в
 частности, для лечения или предупреждения кахексии у индивидуума, страдающего

следующими формами рака аэропищеварительного тракта: раком поджелудочной железы, раком верхнего отдела желудочно-кишечного тракта, таким как рак желудка и/или рак пищевода, раком головы и шеи, в частности раком щитовидной железы или раком слюнных железом, и раком легкого, в частности мелкоклеточным раком легкого.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, используют для лечения или предупреждения раковой кахексии, вызванной раком нижнего отдела желудочно-кишечного тракта, таким как рак ободочной и прямой кишок, в частности раком ободочной кишки.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, используют для лечения или предупреждения раковой кахексии, вызванной эндокринным раком, т.е. раком в эндокринном органе организма индивидуума.

Раскрытые здесь соединения также применимы для лечения индивидуумов, страдающих раком яичников или раком молочной железы.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, используют для лечения или предупреждения раковой кахексии, вызванной целиком или отчасти противораковым лечением, таким как химиотерапия или радиотерапия, или их комбинации.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения индивидуум, подвергаемый лечению в отношении раковой кахексии, является пожилым, например, возрастом 60-120 лет, например, возрастом 70-120 лет, например, возрастом 80-120 лет, например, возрастом 90-120 лет. В равной степени предпочтительными являются варианты осуществления настоящего изобретения, когда указанный индивидуум является ребенком, например, возрастом 0-20 лет, например, возрастом 0-15 лет, например, возрастом 0-10 лет, например, возрастом 0-5 лет, например, возрастом 0-1 год лет, например, новорожденным возрастом менее 2 месяца.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предпочтительно вводить усиливающее секрецию средство, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, профилактически для предупреждения кахектического состояния. В этом варианте осуществления настоящего изобретения лечение можно начинать до начала какого-либо антинеопластического лечения. Усиливающее секрецию средство можно вводить постоянно во время антинеопластического лечения, или его можно вводить с интервалами, например между периодами антинеопластической терапии. С помощью введения во время антинеопластической терапии и, в частности, между периодами антинеопластической терапии риск того, что у подвергаемого лечению индивидуума обнаружатся инфекции и/или другие осложнения, может быть снижен из-за лучших состояний здоровья индивидуума.

Лечение раковой кахексии с использованием усиливающего секрецию средства, такого как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно успешно выполнить, используя любой известный в данной области техники способ введения. Предпочтительно лечение можно успешно выполнить, используя любой из описанных здесь способов введения, более

предпочтительно используя внутривенное или подкожное введение, наиболее предпочтительно используя способы подкожного введения.

Липодистрофия

В другом аспекте настоящее описание относится к применению усиливающего секрецию средства, такого как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, описанного выше, для лечения липодистрофического синдрома или производства лекарственного средства для лечения липодистрофического синдрома. Липодистрофические синдромы охватывают гетерогенную группу редких нарушений, характеризующихся частичной или генерализованной утратой отложений жировой ткани (Garg A., Am. J. Med. 108: 143-52 (2002)). Существуют несколько различных типов липодистрофий, и степень утраты жира может варьировать от очень небольших областей со снижением жировой ткани до почти полного отсутствия жировой ткани. Некоторые пациенты могут иметь только косметические проблемы, в то время как другие могут также иметь тяжелые метаболические осложнения, такие как дислипидемия, жировая дегенерации печени и тяжелая инсулинорезистентность (Reitman M.L. et al., Trends Endocrinol. Metab. 11: 410-16 (2000)). Эти нарушения могут быть или наследственными (семейными или наследственными липодистрофиями) или могут возникать вторично относительно различных типов заболеваний или лекарственных средств (приобретенные липодистрофии). Наследственные липодистрофии могут быть вызваны мутациями в гене.

Были идентифицированы несколько генов, ответственных за различные типы наследственных липодистрофий. Они включают AGPAT2 (1-ацилглицерол-3-фосфат-О-ацилтрансферазу 2), ген BSCL2 (наследственной липодистрофии 2 Берардинелли-Сеипа) при наследственной генерализованной липодистрофии (CGL), ген ламина A/C (LMNA) при множестве семейных частичных липодистрофий Даннигана (семейной частичной липодистрофии) и ген PPAR γ (активируемого пролифератором пероксисом гамма-рецептора) при семейной частичной липодистрофии. Несколько других возможных генов исследуются в настоящее время для других множеств наследственных липодистрофий.

Приобретенными липодистрофиями являются, например, HAART (индуцированная высокоактивной антиретровирусной терапией)/ВИЧ липодистрофия у ВИЧ-инфицированных больных (LD-HIV), приобретенная генерализованная липодистрофия (AGL), приобретенная частичная липодистрофия (APL) и локализованная липодистрофия. Приобретенные липодистрофии не имеют прямой генетической основы. Скорее могут быть вовлечены многие механизмы. Одним из таких механизмов может быть аутоиммунная реакция, разрушающая нормальные жировые клетки (Misra A. et al., Medicine (Baltimore) 83: 18-34 (2004)).

HAART/ВИЧ-индуцированная липодистрофия стала самой частой приобретенной формой генерализованной липодистрофии. Общая встречаемость этих физических отклонений составляет приблизительно 50% после 12-18 месяцев лечения ингибиторами протеаз. Различие между данными сообщениями находится в диапазоне от 18% до 83% из-за поражающих факторов, таких как тип и продолжительность антиретровирусной терапии. Было высказано предположение, что синдром липодистрофии, ассоциируемый с ингибиторами протеаз, может быть обусловлен частичной аналогией между регулируемыми липиды и адипоциты белками и каталитическим сайтом протеазы ВИЧ-1, с которым связываются

ингибиторы протеаз (Carr A. et al., Lancet 351: 1881-83 (1998)).

Локализованные липодистрофии определяются как локализованная утрата подкожного жира из небольших областей или из частей конечности. Может быть одно или более патологических изменений, характеризующихся охваченными кризисом областями, соответствующими утрате подкожного жира. В некоторых случаях это может сопровождаться болезненными узелковыми утолщениями в коже. Обычно оно встречается у больных диабетом в месте инъекций инсулина. У некоторых больных утрата жира имеет место в областях, к которым часто применяется давление (например, сдавливание бедра компенсирующей костной пластиной).

Патогенез липодистрофии преимущественно не известен. Однако накапливающиеся данные указывают на митохондриальный дефект в качестве одного из факторов увеличенной индукции апоптоза в адипоцитах (Misra A. et al., Medicine (Baltimore) 83: 18-34 (2004)). Несколько белков, кодируемых ВИЧ-1, инициируют апоптоз с помощью индуцирования проницаемости митохондриальной мембраны. Несколько нуклеозидных аналогов, клинически используемых для лечения ВИЧ-1, ингибируют репликацию митохондриальной ДНК и/или увеличивают частоту мутаций в митохондриальной ДНК. Оба этих фактора могут вызывать тяжелую митохондриопатию и вносить вклад в липодистрофию. Лечение, которое могло бы ингибировать апоптоз адипоцитов, могло быть очень полезным лечением и особенно профилактикой развития липодистрофии, в частности, в ВИЧ/HAART-индуцированной форме.

Метаболические последствия липодистрофии очень важны для общего состояния здоровья и выживания. Тот факт, что инсулинорезистентность и последующее прогрессирование диабета могут являться результатом или ожирения, или липодистрофии, отражает решающую роль жировой ткани в метаболизме углеводов и липидов. В отсутствие адекватной функциональной возможности адипоцита избыток калорий не может отводиться в их нормальное депо-хранилище; вместо этого они накапливаются в виде увеличенных запасов триглицеридов в печени, в скелетной и сердечной мышце и в β -клетках поджелудочной железы. Эта внежировая липидная аккумуляция, все еще неизвестным образом, связана с нарушенным действием инсулина и часто диабетом.

Помимо их пассивной роли в качестве депо-хранилища нормальные адипоциты секретируют ряд пептидов («адипокинов»), которые могут оказывать влияние на чувствительность к инсулину и/или баланс энергии (Kahn B.B. & Flier J.S., J. Clin. Invest. 106: 473-81 (2000); Berg A.H. et al., Trends Endocrinol. Metab. 13: 84-89 (2002)). Они включают потенциальные инсулиносенсибилизаторы, такие как лептин и Acrp30 (также известный как адипонектин), и антагонисты инсулина, включающие TNF- α , IL-6, и возможно резистин. Инсулинорезистентность при липодистрофии может, следовательно, быть результатом нарушенных липидных потоков и/или нарушений секреции адипокинов.

Сообщалось, что лечение rhGH вызывает уменьшение размера «горба бизона» (накопления жира на шее сзади и наверху спины) и жира туловища у небольшого числа больных. Однако утрата жира и липидные отклонения не улучшаются, и контроль глюкозы в крови ухудшается (Lo J.C. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 3480-87 (2001)).

Лечение липодистрофии с использованием усиливающего секрецию средства, такого как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина

соединение, можно успешно выполнить, используя любой известный в данной области техники способ введения. Предпочтительно лечение можно успешно выполнить, используя любой из описанных здесь способов введения, более предпочтительно используя внутривенное или подкожное введение, наиболее предпочтительно используя способы подкожного введения.

Качество жизни

Во всех вариантах осуществления предпочтительно, чтобы способ лечения и/или фармацевтические композиции, и/или соединения настоящего описания были способны предоставить индивидууму, подвергаемому таким образом лечению, улучшенное качество жизни (QOL), например, подтверждаемое улучшенным аппетитом и/или весом тела, и/или состоянием питания, и/или физической функцией. Таким образом, один аспект относится к улучшениям качества жизни с использованием усиливающего секрецию средства, такого как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, описанное выше.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное улучшение QOL индивидуума оценивают с использованием анкеты «Качество жизни», которая известна квалифицированному в данной области техники специалисту.

Два утвержденных исследования качества жизни, предпочтительных для использования при оценке улучшения QOL, вызванного введением раскрытых здесь соединений, представляют собой следующие исследования: (i) краткое исследование здоровья в виде исследования медицинских последствий (SF-36) и (ii) анкета EORTC QLQ-C30 (+3). SF-36 содержит 36 вопросов, с помощью которых оцениваются восемь аспектов QOL пациента: физическое функционирование (PF), ролевое-физическое функционирование (RP), телесная боль (BP), общее состояние здоровья (GH), жизнеспособность (VT), социальное функционирование (SF), ролевое-эмоциональное функционирование (RE) и психическое здоровье (MH). В соответствии с руководством и инструкцией в отношении интерпретации ответы на вопросы по шкалам суммируют и линейно трансформируют в показатели масштабного коэффициента, которые находятся в диапазоне от 0 (представляя плохое состояние здоровья) до 100 (представляя оптимальное состояние здоровья). Была подтверждена правильность шведской версии, и были представлены нормативные данные для общей популяции шведов (Sullivan M. et al., “Hälsoenkät: Svensk Manual och Tolkningsguide” (SF-36 Health Survey, Swedish Manual and Interpretation Guide), Göteborg, Sahlgrenska University Hospital, 1994).

EORTC QLQ-C30 (версия 3.0) является основной анкетой из 30 позиций, предназначенной для оценки QOL среди пациентов (разработанной группой EORTC Quality of Life Study), смотри сайт National Institutes of Health и смотри, например, образец EORTC QLQ-C30 (версии 3.0, доступный на сайте EORTC и включенный сюда посредством ссылки). Правильность первой версии была подтверждена на больных раком, и была опубликована нормативно-справочная информация от общих популяций. Анкета включает пять функциональных шкал: физическое функционирование (пять вопросов), ролевое функционирование (два вопроса), эмоциональное функционирование (четыре вопроса), познавательное функционирование (два вопроса) и социальное функционирование (два вопроса). Существует три шкалы симптомов: усталости (три вопроса), тошноты и рвоты (два вопроса) и боли (два вопроса). Существует шесть отдельных позиций на затрудненное дыхание, бессонницу, потерю аппетита, запор, диарею и финансовые

затруднения. Задают два общих вопроса о состоянии здоровья пациента и общем QOL. Все шкалы и значения одной позиции находятся в диапазоне показателей от 0 до 100. Высокий показатель для шкал функционирования и общего состояния здоровья и QOL представляет высокий уровень функционирования/состояния здоровья и QOL. Высокий показатель для шкал симптомов/позиций представляет высокий уровень симптомов/проблем. Показатели QOL можно рассчитать в соответствии с руководством по определению показателей EORTC QLQ-C30.

Предпочтительные анкеты для оценки улучшения качества жизни пациентов после лечения одним или несколькими соединениями -усиливающими секрецию средствами представлены в таблице 9 ниже.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения лечение пациента с состоянием(ями), описанным здесь, приводит к значительному улучшению QOL пациента. Предпочтительно лечение приводит к значительному увеличению QOL, определяемому с использованием любого способа проверки QOL, в том числе, но без ограничения, вышеупомянутых анкет, например, увеличению показателя(ей) QOL или составного показателя QOL, что подходит для способа индивидуального определения, или снижению показателя(ей), относящихся к симптомам и/или проблемам, соответственно.

Это увеличение или снижение, соответственно, составляет предпочтительно 1% над показателем, полученным до начала лечения, более предпочтительно 2%, даже более предпочтительно 5%, например, 10%, даже более предпочтительно 20%, 50% или 75% над показателем до лечения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лечение приводит к определяемым увеличениям показателя QOL, так что показатель после лечения равен среднему показателю, обнаруживаемому в сравнимом пуле здоровых субъектов, или близок к такому «нормальному» показателю, т.е. составляет более 50% показателя, даже более предпочтительно 60% показателя и более предпочтительно 75% показателя. Кроме того, в другом варианте осуществления настоящего изобретения лечение приводит к снижению показателя(ей), связанного с симптомами и/или проблемами, составляющему по крайней мере 1%, более предпочтительно 3%, даже более предпочтительно 5% или более предпочтительно 10%, 20%, 30% или 50% показателя(ей) до начала лечения. Эти увеличения или снижения, соответственно, могут относиться к одному, нескольким или ко всем аспектам способа определения QOL индивидуума или составному показателю, если подходит.

Стимуляция аппетита, потребления пищи, увеличения веса, увеличения тощей массы тела, увеличения жировой массы тела

Как обсуждалось выше, содействие увеличению веса или содействие сохранению веса, в частности, у индивидуумов, страдающих от патологической потери веса, является не просто чем-либо вроде стимуляции аппетита и/или потребления пищи, но скорее также коррекцией нарушения баланса между поступлением энергии и расходом энергии, т.е. общего метаболизма организма. Однако стимуляция аппетита все еще будет благотворной для некоторых индивидуумов, в частности для тех индивидуумов, у которых патологический процесс привел к понижению аппетита, что будет естественно приводить к нездоровой потере веса. Таким образом, один аспект относится к стимуляции аппетита с помощью введения усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение. Стимуляцию аппетита можно определить с использованием, например, визуальной

аналоговой шкалы для измерения аппетита, чувства голода или уровня насыщения. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения стимуляция представляет собой стимуляцию на по крайней мере 5% по сравнению с аппетитом до лечения, например, на 10% выше, более предпочтительно на 20% выше или даже более предпочтительно на 30%, 40% или 50% выше.

Стимуляция аппетита необязательно приводит к увеличению потребления пищи, и, следовательно, настоящее описание, кроме того, относится к другому аспекту - стимуляции потребления пищи с помощью введения усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение.

Потребление пищи можно измерить с использованием множества методов, включающих сообщение о себе с использованием, например, дневников или анкет, измерения поглощения калорий буфетной пищи, использование взвешивания пищи до ее приема или взвешивание и анализ двойных количеств пищи. Потребление пищи можно измерить на пищевой основе, ежесуточной основе, еженедельной основе или ежемесячной основе. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения лечение приводит к увеличению на 1% потребления пищи, например, увеличению на 2%, более предпочтительно на 3% или 5%, или 7% и даже более предпочтительно на 10% над средним потреблением пищи до начала лечения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лечение приводит к увеличению поглощения калорий независимо от изменений в потреблении пищи, поскольку количество потребленной пищи может не быть напрямую связано с потребленными калориями, так как различные элементы пищи, такие как жир, углеводы и белки, содержат различные количества калорий на количество пищи. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения лечение приводит к увеличению на 1% поглощения калорий, например, увеличению на 2%, более предпочтительно на 3% или 5%, или 7% и даже более предпочтительно увеличению на 10% поглощения калорий.

Другой аспект относится к стимуляции увеличения веса или поддержанию стабильного веса тела с помощью введения подобного варианту сплайсинга грелина соединения.

Предпочтительно для стимуляции потребления пищи и увеличения веса применимо усиливающее секрецию средство, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединение. Более предпочтительно усиливающее секрецию средство, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, применимо для стимуляции увеличения веса или поддержания стабильного веса тела.

Как обсуждается ниже, предпочтительно, чтобы усиливающее секрецию средство, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, вводилось до приема пищи, например, в пределах 180 минут до приема пищи, например, в пределах 150 минут до приема пищи, например, в пределах 120 минут до приема пищи, например, в пределах 100 минут до приема пищи, например, в пределах 80 минут до приема пищи, например, в пределах 60 минут до приема пищи, например, в пределах 45 минут до приема пищи, например, в пределах 30 минут до приема пищи, например, в пределах 15 минут до приема пищи. Кроме того, предпочтительно, чтобы подобное варианту сплайсинга грелина соединение вводилось подкожно.

Кроме того, усиливающее секрецию средство, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно вводить для того, чтобы способствовать сохранению физического функционирования и/или способствовать восстановлению физической функции, например, у индивидуумов, восстанавливающихся после

крупных хирургических операций, таких как внедрение протеза тазобедренного сустава, ампутации, переломы кости и открытая операция на сердце.

В частности, усиливающее секрецию средство, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, применимо для лечения субъектом с пониженным

весом или для предупреждения потери веса до состояния пониженного веса. Субъекты с пониженным весом включают субъектов, имеющих вес тела меньше на приблизительно 3%, 5% или менее, 10% или менее, 20% или менее, или 30 или менее, нижнего предела «нормального» весового диапазона или ВМІ. «Нормальные» весовые диапазоны хорошо известны в данной области техники и учитывают такие факторы, как возраст пациента, рост и тип тела. Кроме того, раскрытые здесь соединения пригодны для лечения пациентов, подвергшихся непроизвольной потере веса до начала лечения, например, потере веса на 1% в месяц, 2% или менее в месяц, или 5% или менее в течение 6 месяцев.

Увеличение веса или аппетита может быть полезным для пациента, имеющего заболевание или подвергаемого лечению, которое оказывает влияние на вес или аппетит. Кроме того, например, сельскохозяйственных животных, таких как свиньи, коровы или куры, можно подвергать лечению для увеличения веса.

Увеличение жировой массы тела индивидуума может быть легко оценено квалифицированным специалистом с использованием ряда известных методов. Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к увеличению жировой массы тела без увеличения общего веса индивидуума. Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения приводит к увеличению жира тела на 2%, по сравнению с жиром до начала лечения, более предпочтительно на 4%, например 5%, и 8%, и 10%, и даже более предпочтительно на 20% или 40% над величинами до лечения.

Дополнительные состояния индивидуума, которые могут быть излечены в соответствии с настоящим описанием, включают нейрогенную булемию, анорексию, эректильную дисфункцию у мужчин, половую дисфункцию у женщин, уменьшение интенсивности ишемического повреждения нерва или мышцы, а также системную красную волчанку.

Подкожное введение

Важно отметить, что грелин и вариант сплайсинга грелина активируют рецепторы GHS и дополнительные рецепторы, которые все еще идентифицируются. Эти рецепторы обнаружены на продуцирующих GH клетках, в гипоталамических центрах контроля аппетита и в ряде дополнительных мест в организме. В центральной нервной системе эти рецепторы настроены на получение сигналов от локальных, содержащих вариант сплайсинга грелина нейронов. Периферически-секретируемые или искусственно вводимые варианты сплайсинга грелина будут достигать такие места и будут проходить через барьер кровь - головной мозг, специфически активируя соответствующие рецепторы и иницируя специфический путь. Однако, имеющиеся в настоящее время «так называемые» усиливающие секрецию GH средства, которые являются небольшими органическими соединениями, такими как МК-0677 (Merck), нацеленными, как правило, на связывание с рецептором GHS, будут проходить через барьер кровь - головной мозг и также достигать эти места, активируя различные связанные с рецепторами GHS пути и, следовательно, представляя опасность вызова нежелательных побочных эффектов, таких как головокружение, тошнота, падение, повышенный уровень глюкозы в сыворотке натошак и инсулина и затемненное зрение. Таким образом,

такие соединения, которые действительно имеют преимущество в том, что они, являются, например, орально активными, не будут оптимальными для воспроизведения природного, предшествующего приему пищи, индуцирующего аппетит скачка варианта сплайсинга грелина, поскольку они активируют

5 неспецифически все связанные с рецепторами GHS пути в организме. Напротив, используя природный пептид, сам вариант сплайсинга грелина или его гомологи, и вводя его периферически, как в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, гарантируют, что только релевантные, регулирующие

10 аппетит рецепторы варианта сплайсинга грелина и пути достигаются и стимулируются.

Частью варианта осуществления настоящего описания может быть любая форма парентерального введения, которая будет гарантировать, что рецепторы варианта сплайсинга грелина, которые обычно являются мишенью для периферически-

15 продуцируемого варианта сплайсинга грелина в предшествующей приему пищи ситуации, будут подвергаться воздействию уровней биоактивной формы варианта сплайсинга грелина, достаточных для обеспечения сильной и соответствующей стимуляции аппетита, без вызова десенсибилизации системы. Однако, принимая во

20 внимание, что подвергаемые лечению индивидуумы возможно должны получать лечение в течение большого периода, такого как недели или месяцы, предпочтительно, чтобы к нему хорошо подходила форма введения. Соответственно, предпочтительно, чтобы усиливающее секрецию средство, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, вводилось подкожно в

25 количестве, делающим возможным достижение достаточных уровней биоактивной формы варианта сплайсинга грелина, т.е. ацилированной формы, до рецепторов до предстоящего приема пищи.

В настоящем описании предпочтительно рассматриваются способы введения усиливающего секрецию средства, такого как вариант сплайсинга грелина, путем,

30 который воспроизводит физиологически предшествующую приему пищи ситуацию как можно ближе и все еще обеспечивает пациентов, нуждающихся в увеличении потребления пищи, например, слабых пациентов пожилого возраста, пациентов после операции и/или пациентов с потерей аппетита в виде части кахексии,

35 вызванной, например, раком, заболеванием сердца и т.п., достаточным добавочным стимулирующим сигналом на их регулирующие аппетит рецепторы варианта сплайсинга, которые обычно достигаются вариантом сплайсинга грелина в предшествующей приему пищи ситуации.

Болюсное введение

40 Кроме того, с точки зрения молекулярной фармакологии важно отметить, что, как обнаружено, на рецептор грелина и, следовательно, рецептор варианта сплайсинга грелина воздействуют кратковременные скачки в концентрации грелина. Рецептор GHS-R 1a (рецептор 1a усиливающего секрецию гормона роста средства)

45 принадлежит классу связанных с белком G рецепторов или рецепторов 7ТМ, которые при непрерывном воздействии агониста десенсибилизируются, подвергаются интернализации и супрессируются. Эти механизмы, которые присущи всей системе трансдукции сигнала, включают такие процессы, как фосфорилирование

50 рецептора (которое само уменьшает аффинность рецептора к агонисту) и связывание ингибиторных белков, таких как аррестин, (которые стерически блокируют связывание молекул трансдукции сигнала, таких как белки G). Другой частью опосредуемого агонистом процесса десенсибилизации является интернализация

рецептора (т.е. физическое перемещение рецептора с поверхности клетки, где он мог бы связывать агонист), а также супрессия рецептора (т.е. уменьшение продукции/экспрессии рецептора). За интернализацией рецептора мог бы, после кратковременного воздействия на рецептор агониста, следовать процесс ресенсибилизации, когда рецептор подвергается дефосфорилированию и восстанавливается на поверхности клетки для того, чтобы вновь использоваться. Высказывается не связанное теорией предположение, что при длительной стимуляции, которая происходила бы, например, во время продолжительной непрерывной инфузии агониста, процесс супрессии рецептора обеспечивает то, что система трансдукции сигнала клетки-мишени приспосабливается к этой ситуации.

Оптимальное введение

Настоящим описанием также обеспечивается процедура для оптимального введения пациентам варианта сплайсинга грелина для того, чтобы получить максимальный ответ и избежать, например, механизмов десенсибилизации.

Соответственно один аспект относится к введению усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, в болюсах, предпочтительно болюса до каждого основного приема пищи. Обнаружено, что в противоположность продолжительным процессам введения в предшествующем уровне техники болюсное введение приводит не только к стимуляции аппетита, но также к стимуляции потребления пищи и более важно к стимуляции увеличения веса. Высказывается не связанное теорией предположение, что подкожная инъекция, внутривенная инъекция или кратковременные инфузии до приема пищи соответствующих доз усиливающего секрецию средства, такого как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, будут обеспечивать то, что сильная стимуляция индуцирующих аппетит рецепторов варианта сплайсинга грелина будет получена с минимальным ограничением, например, мобильности пациента. Таким образом, например, пациенты с переломом бедра могут, в ситуации после операции, подвергаться лечению в предшествующий прием пищи период и, если требуется, во время самого приема пищи, свободно передвигаться и участвовать в важных послеоперационных физиотерапевтических схемах. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, вводят в виде болюса в количестве, равном 10 мкг на кг веса тела.

Подобное варианту сплайсинга грелина соединение

В раскрытых здесь способах можно использовать любое усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение. Одним из предпочтительных типов подобного варианту сплайсинга грелина соединения, описанного здесь, является соединение, включающее структуру, определяемую формулой I: $Z1-(X1)_m-(X2)-(X3)_n-Z2$, где Z1 представляет собой необязательно присутствующую защитную группу; каждую из X1 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты; X2 выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, при этом указанная аминокислота модифицирована большой гидрофобной группой; каждую из X3 независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты и синтетической аминокислоты, причем одна или более из X1 и X3 могут быть необязательно модифицированы большой гидрофобной группой; Z2 представляет собой

необязательно присутствующую защитную группу; m представляет собой целое число в диапазоне 1-10; n представляет собой целое число в диапазоне 4-92; при условии, что длина соединения в соответствии с формулой Z1-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2 составляет 15-94 аминокислот, и это соединение гомологично на по крайней мере 80% (или в альтернативных вариантах осуществления 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99%, 100%) SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения длина подобного варианту сплайсинга грелина соединения составляет 22-29 аминокислот.

Соответственно термин «усиливающее секрецию средство» включает встречающийся в природе вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 5, а также встречающийся в природе вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 2, и встречающийся в природе вариант сплайсинга грелина человека из 24 аминокислот, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 3.

Настоящее описание включает диастереомеры, а также рацемические и расщепленные энантимерно чистые формы. Усиливающее секрецию средство может содержать D-аминокислоты, L-аминокислоты, альфа-аминокислоту, бета-аминокислоту, гамма-аминокислоту, природную аминокислоту и/или синтетическую аминокислоту или т.п. или их комбинацию. Предпочтительно аминокислоты, присутствующие в подобном варианту сплайсинга грелина соединении, представляют собой L-энантиомеры.

Подобное варианту сплайсинга грелина соединение предпочтительно включает аминокислоту, модифицированную большой гидрофобной группой. Число аминокислот, являющихся N-концевыми относительно модифицированной аминокислоты, предпочтительно находится в пределах диапазона, составляющего 1-9. Соответственно m представляет собой предпочтительно целое число в диапазоне 1-9, например, 1-8, например, 1-7, например, 1-6, например, 1-5, например, 1-4, например, 1-3, например, 1-2, например, 2.

Более предпочтительно, когда число аминокислот, являющихся N-концевыми относительно модифицированной аминокислоты, является низким, например, 1-3, например, 1-2. Наиболее предпочтительно 2 аминокислоты имеют N-концевое положение относительно модифицированной аминокислоты.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения (X1)m имеет остаток Gly в N-концевой части этой последовательности. Соответственно в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения (X1)m выбирают из последовательностей Gly, Gly-Ser, Gly-Cys, Gly-Lys, Gly-Asp, Gly-Glu, Gly-Arg, Gly-His, Gly-Asn, Gly-Gln, Gly-Thr и Gly-Tyr. Более предпочтительно (X1)m выбирают из Gly-Ser и Gly-Cys, наиболее предпочтительно (X1)m представляет собой Gly-Ser.

Другими словами в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения подобное варианту сплайсинга грелина соединение выбирают из Z1-Gly-(X1)m-(X2)-(X3)n-Z2 (формулы II), Z1-Gly-Ser-(X2)-(X3)n-Z2 (формулы III) и Z1-Gly-(X2)-(X3)n-Z2 (формулы IV). Более предпочтительно подобное варианту сплайсинга грелина соединение имеет формулу III.

Как описано выше, X2 может быть любой аминокислотой, модифицированной большой гидрофобной группой. В частности, X2 выбирают из группы, состоящей из модифицированного Ser, модифицированного Cys, модифицированного Asp,

модифицированного Lys, модифицированного Trp, модифицированного Phe, модифицированного Ile и модифицированного Leu. Более предпочтительно X2 выбирают из группы, состоящей из модифицированного Ser, модифицированного Cys и модифицированного Lys; наиболее предпочтительно X2 представляет собой модифицированный Ser.

Кроме того, (X1)m-(X2) предпочтительно представляет собой Gly-Хаа-Ser* или Gly-Хаа-Cys*, где Хаа представляет собой любую аминокислоту, более предпочтительно (X1)m-(X2) представляет собой Gly-Ser-Ser* или Gly-Ser-Cys*, где * указывает, что аминокислотный остаток модифицирован большой гидрофобной группой.

(X3)n предпочтительно включает последовательность, которая является фрагментом варианта сплайсинга грелина, такого как вариант сплайсинга грелина человека. Соответственно (X3)n предпочтительно включает фрагмент следующей последовательности (SEQ ID NO: 6): Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Val Arg Pro Pro His Lys Ala Pro His Val Val Pro Ala Leu Pro Leu Ser Asn Gln Leu Cys Asp Leu Glu Gln Gln Arg His Leu Trp Ala Ser Val Phe Ser Gln Ser Thr Lys Asp Ser Gly Ser Asp Leu Thr Val Ser Gly Arg Thr Trp Gly Leu Arg Val Leu Asn Arg Leu Phe Pro Pro Ser Ser Arg Glu Arg Ser Arg Arg Ser His Gln Pro Ser Cys Ser Pro Glu Leu.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения длина подобного варианту сплайсинга грелина соединения по существу схожа с длиной процессированного грелина человека, т.е. составляет 29 аминокислот. Соответственно предпочтительно n представляет собой целое число в диапазоне 4-25, например, 4-24, например, 4-22, например, 4-15, например, 4-10, например, 10-25, например, 10-24, например, 15-25, например, 15-24. Наиболее предпочтительно подобным варианту сплайсинга грелина соединением является вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO:5; вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO:2; вариант сплайсинга грелина человека из 24 аминокислот, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO:3; или вариант сплайсинга грелина человека из 24 аминокислот, имеющий в третьем положении остаток 2,3-диаминопропионовой кислоты (Dpr), аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO:4.

Функциональность

Усиливающие секрецию средства, описанные здесь, активны в отношении описанного здесь рецептора для GHS, т.е. GHS-R 1a. Соединения могут связываться с GHS-R 1a и предпочтительно стимулируют активность рецептора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения могут связываться с другими рецепторами и необязательно стимулируют их активность.

Активность рецептора можно измерить с использованием различных методов, таких как обнаружение изменения внутриклеточной конформации рецептора, связанных с G-белками активностей и/или внутриклеточных переносчиков. Одним простым показателем способности подобного варианту сплайсинга грелина соединения активировать рецептор варианта сплайсинга грелина является измерение его EC50, т.е. дозы, при которой соединение способно активировать индукцию рецептора с получением половины максимального эффекта соединения. При измерении, например EC50, рецептор может быть или экспрессирован эндогенно на исходных клеточных культурах, например клетках гипофиза, или экспрессирован

гетерогенно на клетках, трансфицированных рецептором грелина. Анализы с использованием целых клеток или анализы с использованием мембран, приготовленных из одного-двух этих типов клеток, можно использовать в зависимости от типа анализа.

Поскольку рецептор, как обычно считают, связан, главным образом, с путем передачи сигнала Gq, можно использовать любой подходящий анализ, который позволяет контролировать активность в пути передачи сигнала Gq/G11, например,

1) Анализ, с помощью которого определяется активация Gq/G11, выполняемый, например, с помощью измерения связывания GTPγS, сочетаемого, например, с преципитацией с использованием антитела против G-альфа-q или -11, для увеличения отношения сигнал к шуму. С помощью этого исследование можно также обнаружить связывание с G-белками, отличными от Gq/11.

2) Анализ, с помощью которого определяется активность фосфолипазы C (PLC), одной из первых эффекторных молекул в направлении вниз пути, например, с помощью измерения аккумуляции инозитолфосфата, который является одним из продуктов PLC.

3) Ниже в каскаде передачи сигнала находится мобилизация кальция из внутриклеточных запасов, которую можно определить с помощью любого способа, известного специалисту со средним уровнем компетентности в данной области техники.

4) Можно также определить еще ниже расположенные молекулы передачи сигнала, например, активность различных видов киназ MAP (p38, jun, т.п.), транслокацию NKκB и управляемую CRE транскрипцию генов.

5) Связывание флуоресцентно меченного аррестина с активированным рецептором грелина.

Примеры подходящих для использования при определении функциональности усиливающего секрецию средства протоколов приведены в примере 4 ниже.

В одном варианте осуществления связывание соединения с рецептором GHS-R 1a можно определить с помощью использования анализа, описанного здесь выше.

Подобное варианту сплайсинга грелина соединение предпочтительно имеет по крайней мере приблизительно 50%, по крайней мере приблизительно 60%, по крайней мере приблизительно 70%, по крайней мере приблизительно 80% или по крайней мере приблизительно 90% функциональной активности относительно грелина человека дикого типа из 28 аминокислот, определяемой с использованием анализа, описанного здесь выше, и/или EC50, превышающую приблизительно 1000, превышающую приблизительно 100 или превышающую приблизительно 50, или превышающую приблизительно 10. Превышающая относится к активности и, таким образом, указывает на то, что меньшее количество требуется для достижения ингибирования связывания.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение имеет активность (EC50) в отношении GHS-R 1a, составляющую менее 500 нМ. В другом варианте осуществления настоящего изобретения соединение имеет активность (EC50) в отношении GHS-R 1a, составляющую менее 100 нМ, например, менее 80 нМ, например, менее 60 нМ, например, менее 40 нМ, например, менее 20 нМ, например, менее 10 нМ, например, менее 5 нМ, например, менее 1 нМ, например, менее 0,5 нМ, например, менее 0,1 нМ, например, менее 0,05 нМ, например, менее 0,01 нМ.

В дальнейшем варианте осуществления настоящего изобретения константа диссоциации (Kd) соединения составляет менее 50 нМ. Во все еще дальнейшем

варианте осуществления настоящего изобретения константа диссоциации (Kd) лиганда составляет менее 100 нМ, например, менее 80 нМ, например, менее 60 нМ, например, менее 40 нМ, например, менее 20 нМ, например, менее 10 нМ, например, менее 5 нМ, например, менее 1 нМ, например, менее 0,5 нМ, например, менее 0,1 нМ, например, менее 0,05 нМ, например, менее 0,01 нМ.

Анализ связывания можно проводить с использованием рекомбинантно продуцируемых полипептидов рецепторов, присутствующих в различных окружениях. Такие окружения включают, например, клеточные экстракты и очищенные клеточные экстракты, содержащие полипептид рецептора, экспрессированный с рекомбинантной нуклеиновой кислоты или встречающейся в природе нуклеиновой кислоты, и также включают, например, использование очищенного полипептида рецептора GHS, продуцированного рекомбинантным способом или из встречающейся в природе нуклеиновой кислоты, который вводят в различное окружение.

Использование рекомбинантно экспрессированного рецептора GHS предлагает несколько преимуществ, например, возможность экспрессировать рецептор в охарактеризованной клеточной системе, так что ответ на соединение в рецепторе можно легко дифференцировать от ответов в других рецепторах. Например, рецептор можно экспрессировать в линии клеток, такой как НЕК 293, COS 7 и СНО, не экспрессирующей, как правило, рецептор, с помощью экспрессирующего вектора, причем та же самая линия клеток без экспрессирующего вектора может действовать в качестве контроля.

Идентичность и гомология

Термин «идентичность» и «гомология», как его следует интерпретировать, означает процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны остаткам соответствующей последовательности, с которой ее сравнивают, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо для получения максимального процента идентичности для всей последовательности, и без рассмотрения любых консервативных замен в качестве части идентичности последовательностей. Ни N- или C-концевые удлинения, ни вставки не будут считаться уменьшающими идентичность или гомологию. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области техники. Идентичность последовательностей можно определить с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей (например, пакета программ для анализа последовательностей, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wis.). Это программное обеспечение сравнивает сходные последовательности с помощью установки степеней гомологии для различных замен, делеций и других модификаций.

Гомолог варианта сплайсинга грелина, имеющий одну или несколько точно определенных здесь последовательностей, может отличаться по одной или нескольким аминокислотам по сравнению с определенными последовательностями, но способен выполнять ту же функцию, т.е. гомолог может предусматриваться в качестве функционального эквивалента заданной последовательности.

Предпочтительно гомологом варианта сплайсинга грелина является подобное варианту сплайсинга грелина соединение, описанное выше.

Как описано выше, гомолог любой из заданных здесь последовательностей можно определить как i) гомологи, включающие аминокислотную последовательность, способную быть узнаваемой антителом, также узнающим

вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот и/или 24 аминокислот, и/или вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот, предпочтительно ацилированный вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот и/или 24 аминокислот, и/или ацилированный вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот, и/или ii) гомологи, включающие аминокислотную последовательность, способную селективно связываться с GHS-R 1a, и/или iii) гомологи, имеющие аффинность связывания с GHS-R 1a, по существу схожую или более высокую, чем вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот и/или 24 аминокислот, и/или вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот, предпочтительно ацилированный вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот и/или 24 аминокислот, и/или ацилированный вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот. (Вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот и/или 24 аминокислот, и/или из 29 аминокислот может иметь последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, и при ацилировании он ацилируется в положении 3).

Используемые здесь антитела могут быть антителами, связывающими N-концевой район варианта сплайсинга грелина или C-концевой район варианта сплайсинга грелина, предпочтительно N-концевой район. Антитела могут быть антителами, описанными Ariyasu H. и др. (Endocrinology 143: 3341-50 (2002)).

Приводимые в качестве примеров гомологи включают одну или более консервативных аминокислотных замен, включающих одну или более консервативных аминокислотных замен в пределах одной и той же группы заранее определенных аминокислот, или множество консервативных аминокислотных замен, причем каждая консервативная замена создана заменой в пределах отличной группы заранее определенных аминокислот. Гомологи могут, таким образом, включать консервативные замены, независимые одна от другой, причем по крайней мере один глицин (Gly) указанного гомолога замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Ala, Val, Leu и Ile; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один из указанных аланинов (Ala) указанного гомолога замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Gly, Val, Leu и Ile; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один валин (Val) указанного гомолога замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Gly, Ala, Leu и Ile; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один из указанных лейцинов (Leu) указанного гомолога замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Gly, Ala, Val и Ile; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один из указанных изолейцинов (Ile) указанных гомологов замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Gly, Ala, Val и Leu; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере одна из указанных аспарагиновых кислот (Asp) указанного гомолога замещена аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Glu, Asn и Gln; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один из указанных фенилаланинов (Phe) указанных гомологов замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Tyr, Trp, His и Pro, и предпочтительно выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Tyr и Trp; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один из указанных тирозинов (Tyr) указанных гомологов замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Phe, Trp, His и Pro, предпочтительно аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей

из Phe и Trp; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один из указанных аргининов (Arg) указанного фрагмента замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Lys и His; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один лизин (Lys) указанных гомологов замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Arg и His; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один из указанных аспарагинов (Asn) указанных гомологов замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Asp, Glu и Gln; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один глутамин (Gln) указанных гомологов замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Asp, Glu и Asn; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один пролин (Pro) указанных гомологов замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Phe, Tyr, Trp и His; и независимо от этого гомологи, в которых по крайней мере один из указанных цистеинов (Cys) указанных гомологов замещен аминокислотой, выбираемой из группы аминокислот, состоящей из Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr и Tyr.

Консервативные замены могут быть введены в любое положение предпочтительной заданной последовательности. Однако может быть желательно введение неконсервативных замен, в частности, но без ограничения, неконсервативной замены в одно или несколько положений.

Неконсервативная замена, приводящая к образованию функционально эквивалентного гомолога последовательностей здесь, могла бы, например, i) отличаться в значительной степени по полярности, например остаток с неполярной боковой цепью (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Gly, Leu, Phe или Met), замененный на остаток с полярной боковой цепью, такой как Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn или Gln, или заряженной аминокислоты, такой как Asp, Glu, Arg или Lys, или замена заряженного или полярного остатка неполярным остатком; и/или ii) отличаться в значительной степени по ее эффекту на ориентацию полипептидного остова, например, замена Pro или Gly другим остатком; и/или iii) отличаться в значительной степени по электрическому заряду, например замена отрицательно заряженного остатка, такого как Glu или Asp, на положительно заряженный остаток, такой как Lys, His или Arg (и наоборот); и/или iv) отличаться в значительной степени по стерическому объему, например замена большого (объемного) остатка, такого как His, Trp, Phe или Tyr, на остаток, имеющий небольшую боковую цепь, например Ala, Gly или Ser (и наоборот).

В одном варианте осуществления замену аминокислот можно осуществить на основе величин их гидрофобности и гидрофильности и относительной схожести заместителей боковых цепей аминокислот, в том числе заряда, размера и т.п.

Примеры аминокислотных замен, в которых учитываются различные из вышеприведенных характеристик, хорошо известны квалифицированным в данной области техники специалистам и включают, например, аргинин и лизин; глутамат и аспартат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения связывающий домен включает гомолог, имеющий аминокислотную последовательность, гомологичную на по крайней мере 60% SEQ ID NO: 1. Более предпочтительно гомология составляет по крайней мере 65%, например, гомология SEQ ID NO: 1 на по крайней мере 70%, например, на 75%, например, на 80%, например, на 85%, например, на 90%, например, на 95%, например, на 98%. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения

отмеченные выше проценты относятся к идентичности последовательности гомолога по сравнению с SEQ ID NO: 1. Гомологами SEQ ID NO: 1 могут быть вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот (SEQ ID NO: 2), вариант сплайсинга грелина человека из 24 аминокислот (SEQ ID NO: 3) или вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот (SEQ ID NO: 5). Другими гомологами являются варианты, описанные в EP 1197496 (Kangawa), включенный сюда посредством ссылки.

Большая гидрофобная группа

Большая гидрофобная группа усиливающего секрецию средства, раскрытого здесь, представляет собой любую большую гидрофобную группу, способную обеспечить дезацилированный грелин человека дикого типа из 28 аминокислот, или его аналог, аффинностью связывания с GHS-R 1a и/или GS-R-1b. Любую подходящую аминокислоту можно модифицировать любой подходящей большой гидрофобной группы. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения остаток Ser (предпочтительно аминокислоты с номером 3 в аминокислотной цепи варианта сплайсинга грелина) модифицируют большой гидрофобной группы. Если модифицируемая аминокислота содержит, например, -OH, -SH, -NH или -NH₂, в качестве замещающей группы в ее боковой цепи предпочтительной является замещающая группа, образованная с помощью ацилирования. Способ связи может, таким образом, быть выбран из группы, состоящей из сложного эфира, простого эфира, тиоэфира, амида и карбамида. Например, если модифицируемой аминокислотой является серин, треонин, тирозин или оксипролин, аминокислота имеет гидроксильную группу в боковой цепи. Если модифицируемой аминокислотой является цистеин, аминокислота имеет меркаптогруппу в боковой цепи. Если модифицируемой аминокислотой является лизин, аргинин, гистидин, триптофан, пролин или оксипролин, аминокислота имеет аминогруппу или иминогруппу в боковой цепи.

Гидроксильная группа, меркаптогруппа, аминогруппа и иминогруппа, описанные выше, могут, таким образом, быть химически модифицированы. Т.е. гидроксильную группу или меркаптогруппу можно, например, подвергнуть этерификации, эстерификации, тиоэтерификации или тиоэстерификации. Иминогруппу можно, например, подвергнуть иминоэтерификации, иминотиоэстерификации или алкилированию. Аминогруппу можно, например, подвергнуть амидированию, тиамидированию или карбамидированию. Кроме того, меркаптогруппу можно, например, превратить в дисульфид, иминогруппу можно, например, подвергнуть амидированию или тиамидированию, и аминогруппа может быть, например, алкилирована или тиокарбамидирована.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения модифицированной аминокислотой является Ser, связанный через сложную эфирную связь с гидрофобной группой, или в другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения модифицированной аминокислотой является Dpr, связанная через амидную связь с гидрофобной группой.

Гидрофобной группой может быть любая группа с насыщенной или ненасыщенной алкильной или ацильной группой, содержащей один или несколько атомов углерода. В одном варианте осуществления настоящего изобретения большой гидрофобной группой является ацильная группа, включающая группы, образованные удалением гидроксильной группы с органической карбоновой кислоты, органической сульфокислоты или органической фосфорной кислоты.

Органическая карбоновая кислота включает, например, жирные кислоты, и число ее атомов углерода предпочтительно оставляет 1-35. В органической сульфокислоте или органической фосфорной кислоте число атомов углерода предпочтительно оставляет 1-35.

Соответственно ацильную группу предпочтительно выбирают из C₁-C₃₅ ацильной группы, например, C₁-C₂₀ ацильной группы, например, C₁-C₁₅ ацильной группы, например, C₆-C₁₅ ацильной группы, например, C₆-C₁₂ ацильной группы, например, C₈-C₁₂ ацильной группы. Более предпочтительно ацильную группу выбирают из группы, состоящей из C₇ ацильной группы, C₈ ацильной группы, C₉ ацильной группы, C₁₀ ацильной группы, C₁₁ ацильной группы и C₁₂ ацильной группы. Такая ацильная группа может быть образована из октановой кислоты (предпочтительно каприловой кислоты), декановой кислоты (предпочтительно каприновой кислоты) или додекановой кислоты (предпочтительно лауриновой кислоты), а также их моноеновых или полиеновых жирных кислот.

Кроме того, модифицированной аминокислотой может быть любая аминокислота, в которой группа модифицирована, как описано в EP 1197496 (Kangawa), включенном сюда посредством ссылки.

Защитная группа

Подобное варианту сплайсинга грелина соединение в соответствии с настоящим описанием может включать защитную группу на N-конце или C-конце, или на обоих концах. Защитная группа, ковалентно соединенная с N-концевой аминогруппой, уменьшает реакционную способность аминоконца в условиях *in vivo*. Защищающие аминоконец группы включают, например, C₁-C₁₀ алкил, C₁-C₁₀ замещенный алкил, C₂-C₁₀ алкенил, C₂-C₁₀ замещенный алкенил, арил, C₁-C₆ алкиларил, C(O)-(CH₂)-(C₁-C₆ алкил)-COOH, C(O)-(C₁-C₆ алкил), C(O)-арил, C(O)-O-(C₁-C₆ алкил) или C(O)-O-арил. Предпочтительно защищающей аминоконец группой является ацетил, пропил, сукцинил, бензил, бензилоксикарбонил или трет-бутилоксикарбонил.

Защитная группа, ковалентно соединенная с C-концевой карбоксильной группой, уменьшает реакционную способность карбоксильного конца в условиях *in vivo*. Защищающую карбоксильный конец группу предпочтительно присоединяют к α-карбонильной группе последней аминокислоты. Защищающие карбоксильный конец группы включают, например, амид, метиламид и этиламид.

Конъюгаты

Усиливающее секрецию средство, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, может быть предоставлено в форме конъюгата усиливающего секрецию средства, т.е. молекулы, включающей усиливающее секрецию средство, конъюгированное с другим элементом. Другим элементом может быть любое вещество, которое способно придавать улучшенные свойства усиливающему секрецию средству, например, в отношении увеличенной стабильности, полупериода существования и т.п. Примеры подходящих элементов описываются следующим образом. Например, усиливающее секрецию средство можно конъюгировать с пептидом, например, пептидом, оказывающий эффект на рецептор ноцицептина ORL1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения конъюгатом является конъюгат варианта сплайсинга грелина или его производного, или гомолога и пептида, оказывающего эффект на ORL1, т.е. пептид Ac-RYY(RK)(WI)RK)-NH₂, где в скобках показана допустимая вариация аминокислотных остатков. Примеры других подходящих пептидов обнаруживаются в опубликованных заявках на патенты США № 2003/040472 и 2002/004483 и патенте

США № 5869046, все из которых включены сюда посредством ссылки.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина и подобное варианту сплайсинга грелина соединение, конъюгируют с молекулой полимера. Молекула полимера может быть любой подходящей молекулой полимера, такой как природный или синтетический полимер, обычно с молекулярной массой в диапазоне приблизительно 1-100 кДа, например, приблизительно 3-20 кДа, например, приблизительно 5-10 кДа. Полимер присоединяют к реакционноспособной группе, присутствующей на усиливающем секрецию средстве, например, аминогруппой или тиольной группой. Примеры подходящих молекул полимеров включают молекулы полимеров, выбираемые из группы, состоящей из полиалкиленоксида (PAO), в том числе полиалкиленгликоля (PAG), например, линейного или разветвленного полиэтиленгликоля (PEG) и полипропиленгликоля (PPG); поливинилового спирта (PVA); поликарбоксилата; поли(винилпирролидона); полиэтилена-сополимера малеинового ангидрида; полистирола-сополимера малеинового ангидрида; и декстрана, в том числе карбоксиметилдекстрана. Предпочтительно молекулой полимера является молекула PEG, в частности однофункциональный PEG, такой как метоксиполиэтиленгликоль (mPEG). Подходящие активированные молекулы PEG доступны от, например, Nektar Therapeutics Inc. (Huntsville, Ala) или Valentis, Inc. (Burlingame, Cal). В альтернативном случае молекулы полимеров можно активировать с помощью общепринятых способов, известных в данной области техники, например, описанных в заявке WO 90/13540, включенной сюда посредством ссылки. Конкретные примеры активированных полимеров PEG включают следующие линейные PEG: NHS-PEG (например, SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG и SCM-PEG), NOR-PEG, BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG и MAL-PEG, и разветвленные PEG, такие как PEG2-NHS и те, которые раскрыты в патентах США № 5932462 и 5643576, оба из которых включены сюда посредством ссылки.

ПЭГилирование (т.е. конъюгацию полипептида усиливающего секрецию средства и активированной молекулы полимера) проводят в соответствии с общепризнанными процедурами, например, описанными в следующих ссылочных документах (в которых также описываются подходящие способы активации молекул полимеров): R.F. Taylor (1991) "Protein Immobilization. Fundamentals and Applications", Marcel Dekker, N.Y.; S.S. Wong (1992) "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton; G.T. Hermanson et al. (1993) "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, N.Y.).

Также предусматривается согласно настоящему описанию связывание молекул полимеров с усиливающим секрецию средством через линкер. Подходящие линкеры хорошо известны квалифицированному специалисту. Предпочтительным примером является циануровой кислоты хлорид (Abuchowski A. et al., J. Biol. Chem. 252: 3578-81 (1977); патент США № 4179337; Shafer et al., J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 24: 375-78 (1986)).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секрецию средство конъюгируют с молекулой олигосахарида, такой как декстран, гликан, трансферрин и т.п. Таковую конъюгацию можно успешно выполнить в соответствии с общепризнанными методами, такими как методы, доступные от Neose Technologies, Inc. (Horsham, PA).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секретию средство конъюгируют с фрагментом Fc молекулы IgG, обычно в форме слитого белка. Например, связывающийся с рецептором эпитоп спасения фрагмента Fc IgG (т.е. фрагмента Fc иммуноглобулина изотипа IgG) включают в усиливающее секретию средство для того, чтобы увеличить его циркуляторный полупериод существования, но без потери его биологической активности. Это может произойти любым способом, например, с помощью мутации соответствующего района в усиливающем секретию средстве для имитации фрагмента Fc или с помощью включения эпитопа в пептидную метку, которую затем сливают с усиливающим секретию средством на одном из двух концов или включают в середину, или с помощью синтеза ДНК или пептида.

Связывающийся с рецептором эпитоп спасения является любым подходящим эпитопом, известным квалифицированному в данной области техники специалисту, и его природа будет зависеть, например, от типа подвергаемого модификации усиливающего секретию средства. Эпитоп включают в усиливающее секретию средство, так что биологическая активность усиливающего секретию средства сохраняется, т.е. эпитоп не наносит ущерб конформации усиливающего секретию средства или не оказывает влияние на его связывание с лигандами, которое обеспечивает его биологическую активность.

В альтернативном случае для обеспечения усиливающего секретию средства в форме конъюгата усиливающее секретию средство можно модифицировать с включением подходящих реакционноспособных групп, посредством чего модифицированное таким образом усиливающее секретию средство способно образовывать конъюгат *in vivo* (после введения индивидууму) благодаря ковалентному связыванию с доступными реакционноспособными функциональными группами на компонентах крови. Настоящее описание также относится к таким модифицированным усиливающим секретию средствам и способам их применения. Также настоящее описание относится к конъюгатам, образованным *in vitro* между модифицированным усиливающим секретию средством, описанным выше, и компонентом крови. Предусматривается, что конъюгаты, образованные в соответствии с этим вариантом осуществления настоящего изобретения, имеют увеличенный полупериод существования *in vivo* по сравнению с соответствующим немодифицированным усиливающим секретию средством.

В соответствии с этим вариантом осуществления настоящего изобретения усиливающее секретию средство модифицировано химически активной группой (реакционноспособным элементом). Реакционноспособный элемент можно, например, выбрать из широкого множества активных карбоксильных групп, в частности сложных эфиров, где гидроксильная составляющая является физиологически приемлемой. Такие группы можно выбрать из группы, состоящей из N-гидроксисукцинимиды (NHS), N-гидроксисульфосукцинимиды (сульфо-NHS), малеимидбензоилсукцинимиды (MBS), гамма-малеимидобутирилсукцинимидного эфира (GMBS) и малеимидопропионовой кислоты (MPA). Главными мишенями этой группы элементов являются первичные амины на компоненте крови. Другой группой активных элементов является малеимидо-содержащая группа, такая как MPA и гамма-малеимидбутиламид (GMBA). Такие группы вступают в реакцию с тиольными группами, присутствующими на компоненте крови (Lee V.H.L. in "Peptide and Protein Drug Delivery", New York, N.Y., M. Dekker, 1990).

Компонент крови, с которым модифицированное усиливающее секретию средство

разработано для вступления в реакцию, может быть любым компонентом крови, который имеет доступную группу-мишень, например, аминокислотную или тиольную группу, и который подходит в качестве носителя для связывания модифицированного усиливающего секретию средства *in vivo* и, таким образом, удлинит его циркуляторный полупериод существования. Примерами таких компонентов крови является сывороточный альбумин и IgG.

Как отмечено выше, ковалентное связывание модифицированного усиливающего секретию средства с компонентом крови может быть успешно осуществлено *in vivo* с помощью введения модифицированного усиливающего секретию средства непосредственно пациенту. Введение может быть выполнено в любой подходящей форме, например, в форме раствора, или вводиться медленно на протяжении времени с помощью инфузии с использованием дозированной подачи или т.п. В альтернативном случае конъюгат усиливающее секретию средство/компонент крови можно также приготовить *ex vivo* объединением крови с модифицированным усиливающим секретию средством, делая возможным ковалентное связывание модифицированного усиливающего секретию средства с реакционноспособными функциональными группами на компонентах крови и затем возвращая или вводя конъюгированную кровь индивидууму.

Кроме того, вышеуказанное можно также осуществить с помощью сначала очистки компонента крови индивидуума или ограниченного числа компонентов, таких как эритроциты, иммуноглобулины, сывороточный альбумин или т.п., и объединения компонента или компонентов *ex vivo* с химически активными усиливающими секретию средствами.

Получение подобных варианту сплайсинга грелина соединений

Подобные варианту сплайсинга грелина соединения можно получить с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Например, полипептидный район подобного варианту сплайсинга грелина соединения можно химически или биохимически синтезировать и модифицировать. Методы химического синтеза полипептидов хорошо известны в данной области техники (смотри, например, Lee V.H.L в "Peptide and Protein Drug Delivery", New York, N.Y., M. Dekker, 1990). Примеры методов биохимического синтеза, включающих введение нуклеиновой кислоты в клетку и экспрессию нуклеиновых кислот, предоставлены Ausubel F.M. и др. в "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley, 1987-1998, и Sambrook и др. в "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, все из которых включены сюда посредством ссылки. Другим приводимым в качестве примера методом, описанным в патенте США № 5304489, включенном сюда посредством ссылки, является использование трансгенных млекопитающих, имеющих нацеленные на молочную железу мутации, которые приводят к продукции и секреции синтезируемого подобного варианту сплайсинга грелина соединения в молоко трансгенного млекопитающего.

Подобные варианту сплайсинга грелина соединения можно также рекомбинантно получить с использованием обычных методов экспрессии, известных в данной области техники. Полинуклеотид, кодирующий желаемое подобное варианту сплайсинга грелина соединение, функционально связывают с промотором в экспрессирующем векторе, подходящем для какого-либо удобного хозяина. Как эукариотические, так и прокариотические системы-хозяева используют при образовании рекомбинантных подобных варианту сплайсинга грелина соединений. Подобное варианту сплайсинга грелина соединение затем выделяют из

лизированных клеток или из культуральной среды и очищают до степени, необходимой для его намеченного применения.

Соответственно дальнейшим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ продуцирования подобного варианту сплайсинга грелина соединения, включающий стадии (а) обеспечения кДНК, включающей полинуклеотидную последовательность, кодирующую подобное варианту сплайсинга грелина соединение; (b) встраивания указанной кДНК в экспрессирующий вектор так, чтобы кДНК была функционально связана с промотором; и (с) введения указанного экспрессирующего вектора в клетку-хозяина, посредством чего указанная клетка-хозяин продуцирует указанное подобное варианту сплайсинга грелина соединение.

В одном аспекте этого варианта осуществления настоящего изобретения способ, кроме того, включает стадию выделения подобного варианту сплайсинга грелина соединения, полученного на стадии с). Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является подобное варианту сплайсинга грелина соединение, получаемое способом, описанным в предшествующем параграфе. Экспрессирующий вектор представляет собой любую экспрессирующую систему млекопитающих, дрожжей, насекомых или бактерий, известную в данной области техники. Коммерчески доступные векторы и экспрессирующие системы доступны от множества поставщиков, включающих Genetics Institute (Cambridge, Mass), Stratagene (La Jolla, Calif.), Promega (Madison, Wis.) и Invitrogen (San Diego, Calif.). Если желательно увеличение экспрессии и способствование правильной укладке белка, процент кодонов и спаривание кодонов последовательности оптимизируют для конкретного экспрессирующего организма, в который вводят экспрессирующий вектор, как объяснено в патенте США № 5082767, полное содержание которого включено, таким образом, посредством ссылки.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения часто является полезным добавление к рекомбинантному полинуклеотиду дополнительной нуклеотидной последовательности(ей), которая кодирует секреторные или лидерные последовательности, пропоследовательности, последовательности, которые содействуют очистке, такие как множественные остатки гистидина, или дополнительной последовательности для стабилизации во время рекомбинантной продукции.

Введение полинуклеотида, кодирующего подобное варианту сплайсинга грелина соединение, в клетку-хозяина можно осуществить с помощью трансфекции с использованием кальция фосфата, опосредуемой DEAE-декстраном трансфекции, опосредуемой катионными липидами трансфекции, электропорации, трансдукции, трансфекции или других способов. Такие способы описываются во многих стандартных лабораторных руководствах, таких как Davis et al., (1986) Basic Methods in Molecular Biology, ed., Elsevier Press, NY, полное содержание которого включено, таким образом, посредством ссылки. В частности, предусматривается, что подобные варианту сплайсинга грелина соединения, раскрытые здесь, могут между прочим экспрессироваться в клетке-хозяине, в которой отсутствует рекомбинантный вектор, или природно продуцироваться клеткой.

Подобные варианту сплайсинга грелина соединения можно выделить и очистить из культур рекомбинантных клеток с помощью хорошо известных способов, включающих дифференциальное экстрагирование, преципитацию сульфатом аммония или этанолом, экстрагирование кислотой, анионо- или катионообменную

хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, хроматографию на основе гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксилapatите и хроматографию с использованием лектина (смотри, например, “Methods in Enzymology: Aqueous Two-Phase Systems”, Walter H. et al. (eds.), Academic Press (1993), включенный сюда посредством ссылки, для множества способов очистки белков). В одном варианте осуществления настоящего изобретения для очистки используют жидкостную хроматографию высокого разрешения («HPLC»). Рекомбинантно продуцированный вариант подобного варианту сплайсинга грелина соединения можно в значительной степени очистить, используя методы, описанные здесь, или в противном случае известные в данной области техники, такие как, например, одностадийный способ, описанный Smith & Johnson, Gene 67: 31 40 (1988), полное содержание которого включено, таким образом, посредством ссылки. Подобные варианту сплайсинга грелина соединения можно также очистить из рекомбинантных источников с использованием антител, направленных против подобных варианту сплайсинга грелина соединений, например, тех, которые описаны здесь, в способах, которые хорошо известны в области очистки белков.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантно экспрессированное подобное варианту сплайсинга грелина соединение очищают, используя стандартные иммунохроматографические методы. В таких процедурах раствор, содержащий представляющее интерес подобное варианту сплайсинга грелина соединение, такой как культуральная среда или клеточный экстракт, наносят на колонку, содержащую антитела против подобного варианту сплайсинга грелина соединения, присоединенные к хроматографической матрице. Рекомбинантному подобному варианту сплайсинга грелина соединению предоставляют возможность связаться с иммунохроматографической колонкой. Впоследствии колонку промывают для удаления неспецифически связавшихся белков. Специфически связанное секретированное подобное варианту сплайсинга грелина соединение затем снимают с колонки и выделяют с использованием стандартных методов.

В зависимости от хозяина, используемого в процедуре рекомбинантной продукции, подобные варианту сплайсинга грелина соединения могут быть гликозирванными или могут быть негликозилированными. Кроме того, полипептиды настоящего изобретения могут также включать начальный модифицированный остаток метионина, в некоторых случаях в результате опосредуемых хозяином процессов. Так в данной области техники хорошо известно, что N-концевой метионин, кодируемый кодоном инициации трансляции, обычно эффективно удаляется из любого белка после трансляции во всех эукариотических клетках. Хотя N-концевой метионин на большинстве белков также эффективно удаляется в большинстве прокариот, для некоторых белков этот прокариотический процесс удаления является неэффективным, в зависимости от природы аминокислоты, с которой ковалентно связан N-концевой метионин.

Фармацевтические композиции

Хотя соединения или соли настоящего описания можно вводить в виде сырого химического вещества, предпочтительно представить их в форме фармацевтической композиции. Соответственно один аспект относится к фармацевтической композиции, содержащей подобное варианту сплайсинга грелина соединение, определенное в формуле I.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к

фармацевтической композиции, содержащей смесь по крайней мере двух различных подобных варианту сплайсинга грелина соединений, такую как смесь подобного варианту сплайсинга грелина соединения, ацилированного C₈ ацилом, и подобного варианту сплайсинга грелина соединения, ацилированного C₁₀ ацилом.

Высказывается не связанное теорией предположение, что такая смесь будет иметь больший полупериод существования в плазме.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит ацилированные подобные варианту сплайсинга грелина соединения, необязательно имеющие различные длины ацильной цепи, предпочтительно выбираемой из группы, состоящей из C₇ ацильной группы, C₉ ацильной группы и C₁₁ ацильной группы, необязательно в комбинации с дезацилированным подобным варианту сплайсинга грелина соединением.

Другой аспект относится к фармацевтической композиции, содержащей любое усиливающее секрецию средство, такое как любое подобное варианту сплайсинга грелина соединение, описанное выше, или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемые носители и/или наполнители, при этом указанная композиция, кроме того, содержит транспортные молекулы. Транспортные молекулы, главным образом, добавляют для того, чтобы увеличить полупериод существования ацилированного соединения, предотвращая преждевременное дезацилирование, поскольку дезацилированный вариант сплайсинга грелина может быть неактивным в отношении GHS-R 1a.

Транспортные молекулы действуют через включение в соединение, раскрытое здесь, или прикрепление к ним такого соединения. Можно использовать любую подходящую транспортную молекулу, известную квалифицированному специалисту. Примерами транспортных молекул являются транспортные молекулы, описанные в разделе «Конъюгаты» выше. Другими предпочтительными примерами являются липосомы, мицеллы и/или микросферы.

Стандартные липосомы обычно состоят из фосфолипидов (нейтральных или отрицательно заряженных) и/или холестерина. Липосомы являются везикулярными структурами, основанными на липидном бислое, окружающем водные отделы. Они могут варьировать по физико-химическим свойствам, таким как размер, липидный состав, поверхностный заряд и число, и текучесть фосфолипидного бислоя.

Наиболее часто используемыми липидами для образования липосом являются 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DLPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DMPE), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DPPE), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфат (однонатриевая соль) (DMPA), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфат (однонатриевая соль) (DPPA), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфат (однонатриевая соль) (DOPA), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-[фосфо-гас-(1-глицерин)] (натриевая соль) (DMPG), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-[фосфо-гас-(1-глицерин)] (натриевая соль) (DPPG), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-[фосфо-гас-(1-глицерин)] (натриевая соль) (DOPG), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-[фосфо-L-серин] (натриевая соль) (DMPS), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-[фосфо-L-серин] (натриевая соль) (DPPS), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-[фосфо-L-серин] (натриевая соль) (DOPS), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(глутарил) (натриевую соль) и 1,1',2,2'-тетрамиристоилкардиолипид (аммонийная

соль). Предпочтительные являются композиции, состоящие из DPPC в комбинации с другим липидом или модификатором липосом, например, в комбинации с холестерином и/или фосфатидилхолином.

Длительно циркулирующие липосомы характеризуются их способностью проникать из сосудов в ткани в тех местах организма, где проницаемость сосудистой стенки увеличена. Предпочтительным способом получения таких длительно циркулирующих липосом является присоединение гидрофильного полимера полиэтиленгликоля (PEG) ковалентно к внешней поверхности липосомы.

Некоторыми из предпочтительных липидов являются 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (аммонийная соль), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-5000] (аммонийная соль), 1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан (хлорид) (DOTAP).

Возможные применимые для липосом липиды поставляются Avanti Polar Lipids, Inc., (Alabaster, AL). Кроме того, суспензия липосом может включать защищающие липиды средства, которые защищают липиды от повреждений свободными радикалами и в результате перекисления липидов при хранении.

Предпочтительными являются липофильные свободно радикальные гасители, такие как альфа-токоферол, и растворимые в воде железо-специфические комплексоны, такие как ферриоксианин.

Для приготовления липосом имеется ряд способов, описанных, например, Szoka F. & Parahadjopolous D., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467-508 (1990); в патентах США № 4235871, 4501728 и 4837028; все из которых включены сюда посредством ссылки. С помощью другого способа получают многослойные везикулы гетерогенных размеров. В этом способе образующие везикулу липиды растворяют в подходящем органическом растворителе или системе растворителей и сушат под вакуумом или инертным газом для образования тонкого липидного слоя. Если желательно этот слой можно повторно растворить в подходящем растворителе, таком как третичный бутанол, и затем подвергнуть лиофилизации для образования более гомогенной липидной смеси, которая находится в более легко гидратируемой порошкообразной форме. Этот слой покрывают водным раствором специализированного лекарственного средства и нацеливающего соединения, и ему дают возможность гидратироваться обычно на протяжении 15-60 минутного периода с перемешиванием. Распределение по размеру получаемых в результате многослойных везикул можно сдвинуть в направлении меньшего размера с помощью гидратации липидов в условиях более интенсивного перемешивания или с помощью добавления растворяющих детергентов, таких как дезоксихолат.

Мицеллы образуются поверхностно-активными веществами (молекулами, которые содержат гидрофобную часть и одну или несколько ионных или иначе сильно гидрофильных групп) в водном растворе. По мере увеличения концентрации твердого поверхностно-активного вещества, его монослои, адсорбированные на границе раздела воздух/вода или стекло/вода, становятся настолько плотно упакованными, что для дальнейшего заполнения требуется чрезмерное сжатие молекул поверхностно-активных веществ, уже находящихся в двух монослоях. Дальнейшее увеличение количества растворенного поверхностно-активного вещества за пределы этой концентрации вызывает агрегацию количеств, эквивалентных новым молекулам, в мицеллы. Этот процесс начинается при характеристической концентрации, называемой «критическая для мицелл концентрация».

Форма мицелл, образованных в разбавленных растворах поверхностно-активного вещества, является примерно сферической. Полярные группы головок молекул поверхностно-активного вещества располагаются во внешней сферической оболочке, в то время как их углеводородные цепи ориентированы к центру, образуя сферическое ядро мицеллы. Углеводородные цепи случайным образом свернуты и спутаны, и внутренняя часть мицеллы имеет неполярный, подобный жидкости характер. В мицеллах полиоксиэтилированных неионных детергентов полиоксиэтиленовые составляющие ориентированы наружу и проницаемы для воды. Это размещение является энергетически благоприятным, поскольку гидрофильные группы головок контактируют с водой, а углеводородные составляющие удалены от водной среды и частично защищены от контакта с водой полярными группами головок. Углеводородные хвосты молекул поверхностно-активного вещества, расположенные во внутренней части мицеллы, взаимодействуют друг с другом с помощью слабых сил Ван-дер-Ваальса.

Размер мицеллы или его число агрегации регулируется, главным образом, геометрическими факторами. Радиус углеводородного ядра не может превышать длину удлинённой углеводородной цепи молекулы поверхностно-активного вещества. Следовательно, увеличение длины цепи или переход на одну ступень вверх гомологического ряда приводит к увеличению числа агрегации сферических мицелл. Если концентрация поверхностно-активного вещества увеличивается за пределы небольшого процента, и если добавить электролиты (в случае ионных поверхностно-активных веществ), или поднять температуру (в случае неионных поверхностно-активных веществ), размер мицелл увеличится. В этих условиях мицеллы являются слишком большими для того, чтобы оставаться сферическими, и становятся эллипсоидальными, цилиндрическими или, в конечном счёте, пластинчатыми по форме.

В мицеллах настоящего описания можно использовать обычные поверхностно-активные вещества, хорошо известные квалифицированному в данной области техники специалисту. Подходящие поверхностно-активные вещества включают натрия лауреат, натрия олеат, натрия лаурилсульфат, монододециловый эфир октаоксиэтиленгликоля, октоксинал 9 и PLURONIC®F-127 (BASF Corp., Florham Park, NJ). Предпочтительными поверхностно-активными веществами являются неионные полиоксиэтиленовые и полиоксипропиленовые детергенты, совместимые с внутривенными инъекциями, такие как TWEEN®-80, PLURONIC®F-68, н-октил-бета-D-глюкопиранозид и т.п. Кроме того, для образования мицелл можно также использовать фосфолипиды, такие как фосфолипиды, описанные для использования при получении липосом.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения соединения, раскрытые здесь, готовят, как описано в литературе для пути введения, выбираемого из буккальной доставки, сублингвальной доставки, чрескожной доставки, ингаляции и безыгольной инъекции, такой как с использованием способов, разработанных Powderject.

Для ингаляции раскрытые здесь соединения можно приготовить с использованием способов, известных квалифицированным в данной области техники специалистам, например, аэрозоль, сухой порошок или растворённые, например, в микрокаплях, предпочтительно в устройстве, предназначенном для такой доставки (например, коммерчески доступном от Aradigm Corp. (Hayward, Cal.), Alkermes, Inc. (Cambridge, Mass.) или Nektar Therapeutics (San Carlos, Cal.)).

Введение

Подходящие схемы введения различных соединений и способы настоящего описания предпочтительно определяют с учетом факторов, хорошо известных в данной области техники, включающих, например, тип субъекта, которому вводят лекарственное средство; возраст, вес, пол и медицинское состояние субъекта; путь введения; функционирование почек и печени субъекта; желаемый эффект и конкретное используемое соединение. Предпочтительно композиции будут содержать приблизительно 0,5%-75% по весу усиливающего секрецию средства, раскрытого здесь, при этом оставшаяся часть будет состоять из подходящих фармацевтических наполнителей.

Для оптимальной точности в достижении концентраций лекарственного средства в пределах диапазона, который обеспечивает эффективность без токсичности, требуется схема, основанная на кинетиках доступности лекарственного средства для сайтов-мишеней. Это включает принятие во внимание распределения, равновесия и выведения лекарственного средства.

Как описано выше, в одном аспекте усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, вводят подкожно.

В другом аспекте усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, вводят в виде предшествующего приему пищи болюса, причем форма введения может быть любой подходящей парентеральной формой. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, вводят подкожно в виде предшествующего приему пищи болюса.

Усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно также вводить во время приема пищи в виде болюса. Способ введения во время приема пищи включает подкожное введение, такое как подкожно вводимый болюс.

Фармацевтические композиции для парентерального введения включают стерильные водные и неводные инъеклируемые растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии, а также стерильные порошки, восстанавливаемые в стерильных инъеклируемых растворах или дисперсиях перед использованием. Другие подходящие формы введения включают суппозитории, разбрызгиваемые растворы или суспензии, мази, кремы, гели, ингаляторы, кожные пластыри, имплантаты, пилюли, таблетки, лепешки и капсулы.

Типичная доза находится в пределах концентрации, эквивалентной от 10 нг до 10 мг варианта сплайсинга грелина на кг веса тела. Концентрации и количества приводятся здесь в эквивалентах количества варианта сплайсинга грелина, причем вариант сплайсинга грелина представляет собой вариант сплайсинга грелина человека из 22 аминокислот (SEQ ID NO: 2), и/или вариант сплайсинга грелина человека из 29 аминокислот (SEQ ID NO: 5), и/или вариант сплайсинга грелина человека из 24 аминокислот (SEQ ID NO: 3), и/или вариант сплайсинга грелина человека из 24 аминокислот, имеющий остаток Dpr в третьем положении (SEQ ID NO: 4). Эквиваленты можно протестировать, как описано здесь в разделе, озаглавленном «Функциональность».

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство вводят в концентрации, эквивалентной от 0,1 мкг до 1 мг

варианта сплайсинга грелина на кг веса тела, например, от 0,5 мкг до 0,5 мг варианта сплайсинга грелина на кг веса тела, например, от 1,0 мкг до 0,1 мг варианта сплайсинга грелина на кг веса тела, например, от 1,0 мкг до 50 мкг варианта сплайсинга грелина на кг веса тела, например, от 1,0 мкг до 10 мкг варианта сплайсинга грелина на кг веса тела.

Как отмечено выше, усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, предпочтительно вводят в виде болюса. Соответственно в одном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство вводят в виде болюса до приема пищи, при этом указанный болюс содержит количество усиливающего секрецию средства или его соли, эквивалентное 0,3 мкг - 600 мг варианта сплайсинга грелина. Более предпочтительно лекарственное средство вводят в виде болюса до приема пищи, при этом указанный болюс содержит количество усиливающего секрецию средства или его соли, эквивалентное 2 мкг - 200 мг варианта сплайсинга грелина, например, 5,0 мкг - 100 мг варианта сплайсинга грелина, например, 10 мкг - 50 мг варианта сплайсинга грелина, например, 10 мкг - 5 мг варианта сплайсинга грелина, например, 10 мкг - 1 мг варианта сплайсинга грелина.

Следует отметить, что нормальный, возможный в случае варианта сплайсинга грелина ответ, который имеет место до приема пищи, является кратковременным скачком в концентрациях в плазме варианта сплайсинга грелина, и что из-за относительно короткого полупериода существования пептида внутривенная инъекция варианта сплайсинга грелина будет обеспечивать возможность получения схожего кратковременного пика в концентрациях варианта сплайсинга грелина. Путь введения должен обеспечивать то, что главной формой в кровообращении будет недеградированная, биоактивная форма пептида, которая будет достигать рецепторы варианта сплайсинга грелина и стимулировать их.

Таким образом, для получения максимального эффекта лекарственного средства его предпочтительно вводить от одного до трех раз ежедневно, при этом каждое введение осуществляют в пределах 45 минут приема пищи, например, в пределах 30 минут приема пищи, например, в пределах 25 минут приема пищи, например, в пределах 20 минут приема пищи, например, в пределах 15 минут приема пищи, например, в пределах 10 минут приема пищи, например, в пределах 5 минут приема пищи. Более предпочтительно лекарственное средство вводят до каждого основного приема пищи, например, вводят три раза ежедневно.

Раскрытые здесь соединения можно также приготовить для назального введения. Растворы или суспензии применяют непосредственно в носовую полость с помощью общепринятого способа, например, с помощью пипетки или разбрызгиваемого раствора или суспензии. Композиции могут быть предоставлены в форме однократного или многократного введения. В последнем случае использования пипетки пациент может этого достигнуть введением соответствующего, заранее определенного объема раствора или суспензии. В случае использования разбрызгиваемого раствора или суспензии этого можно достигнуть посредством дозирующего распылительного насоса.

Раскрытые здесь соединения можно также приготовить для аэрозольного введения, в частности, в дыхательные пути, и, в том числе, интраназального введения. Соединения будут, как правило, иметь небольшой размер частиц, например, порядка 5 микрон или меньше. Такой размер частиц можно получить с

помощью способа, известного в данной области техники, например, с помощью тонкого измельчения. Активный ингредиент помещается в находящуюся под давлением упаковку с подходящим газом-вытеснителем, таким как гидрофторалкан (HFA), например гидрофторалкан-134a и гидрофторалкан-227, углекислый газ или другой подходящий газ. Аэрозоль может подходящим образом также содержать поверхностно-активное вещество, такое как лецитин. Дозу лекарственного средства можно контролировать с помощью контролируемого расхода клапана. В альтернативном случае активные ингредиенты можно предоставить в форме сухого порошка, например, порошковой смеси соединения в подходящей основе для порошка, такой как лактоза, крахмал, производные крахмала, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза и поливинилпирролидин (PVP). Порошковый носитель будет образовывать гель в носовой полости. Порошковая композиция может быть представлена в форме стандартной дозы, например, в капсулах или картриджах, например, из желатина или блистерных упаковок, из которых порошок можно вводить посредством ингалятора.

Композиции, вводимые аэрозольно, можно приготовить, например, в виде растворов в солевом растворе, используя бензиловый спирт или другие подходящие консерванты, усилители абсорбции для увеличения биодоступности, используя фторуглерод и/или используя другие солюбилизующие и диспергирующие агенты.

Соединения, раскрытые здесь, можно также приготовить для введения с помощью ручки для инъекции способом, подобным тому, который используется для размещенного в картридже гормона роста (GH) или инсулина. Картридж содержит раскрытые здесь соединения в растворителях. Ручкой, которая является, в сущности, иглой, шприцом и ампулой в одном целом, управляют с помощью поворота, и делают возможным введение различных доз. Это устройство предлагает простоту, удобство и признаки увеличенной безопасности для доставки соединений. Она обеспечивает простую конструкцию устройства, небольшое число стадий введения и кнопку одностадийного автоматического дозирования. Такую ручку для дозирования можно получить способом, известным в данной области техники. Например, несколько производителей предлагают ручки для введения лекарственных средств разработчиков для использования с соединениями разработчиков в виде лекарственных средств (BD-Medical-Pharmaceutical Systems, Inc.; Owen Mumford Inc. etc.).

Композиции для орального введения

Такие типы усиливающих секрецию средств, которые способны оставаться биологически активными у индивидуума после орального введения, (такие как, например, небольшие молекулы и короткие пептиды) можно приготовить в ассортименте лекарственных форм для орального введения. Фармацевтические композиции и лекарственные формы могут содержать в качестве активного соединения раскрытые здесь соединения или их фармацевтически приемлемые соли, или их кристаллические формы.

Фармацевтически приемлемые носители могут быть либо твердыми, либо жидкими. Препараты твердых форм включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, крахмальные облатки, суппозитории и дисперсные гранулы. Твердый носитель может быть одним или несколькими веществами, которые могут также действовать в качестве разбавителей, корригентов, солюбилизаторов, смазывающих веществ, суспендирующих веществ, связующих веществ, консервантов, увлажняющих средств, дезинтегрирующих таблетки агентов или герметизирующего

материала.

Для орального введения такие наполнители включают, например, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, магния стеарата, натрия сахарина, талька, целлюлозы, глюкозы, желатина, сахарозы, магния карбоната и т.п.

В порошках носитель представляет собой тонко диспергированное твердое вещество, которое является смесью с тонко диспергированным активным компонентом. В таблетках активное соединение смешивают с носителем, имеющим необходимую связывающую способность, в подходящих пропорциях и прессуют в желаемую форму и размер. Порошки и таблетки предпочтительно содержат от одного до приблизительно семидесяти процентов активного соединения.

Подходящими носителями являются магния карбонат, магния стеарат, тальк, сахар, лактоза, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, натрия карбоксиметилцеллюлоза, низкоплавкий парафин, масло какао и т.п. Термин «препарат», как предполагается, включает композицию, содержащую раскрытое здесь активное соединение с герметизирующим материалом в качестве носителя, обеспечивающим капсулу, в которой активный компонент, с носителями или без них, окружен носителем, с которым он связан. Также включаются крахмальные облатки и лепешки.

В качестве твердых форм, подходящих для орального введения могут быть таблетки, порошки, капсулы, пилюли, крахмальные облатки и лепешки.

Капли могут содержать стерильные или нестерильные водные или масляные растворы или суспензии и могут быть приготовлены растворением активного ингредиента в подходящем водном растворе, необязательно включающем бактерицидный и/или фунгицидный агент и/или любой другой подходящий консервант и необязательно включающем поверхностно-активное вещество.

Получаемый в результате раствор можно затем подвергнуть осветлению фильтрацией, перенести в подходящий контейнер, который затем подвергают герметизации и стерилизации автоклавированием или содержанием при 98-100°C в течение получаса. В альтернативном случае раствор можно стерилизовать фильтрованием и перенести асептически в контейнер. Примерами бактерицидных и фунгицидных агентов, подходящих для включения в капли, являются фенилртути нитрат или ацетат (0,002%), бензалкония хлорид (0,01%) и хлоргексидина ацетат (0,01%). Подходящие растворители для приготовления масляного раствора включают глицерин, разбавленный спирт и пропиленгликоль.

Также включены препараты твердых форм, которые, как предполагается, превращают незадолго до применения в препараты жидких форм для орального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии. Эти препараты могут содержать, помимо активного компонента, красители, корригенты, стабилизаторы, буферы, искусственные и природные подсластители, диспергаторы, загустители, солюбилизующие агенты и т.п.

Другие формы, подходящие для орального введения, включают препараты жидких форм, включающие эмульсии, сиропы, эликсиры, водные растворы, водные суспензии, зубную пасту, гелевое средство для ухода за зубами, жевательную резинку или препараты твердых форм, которые, как предполагается, превращают незадолго до применения в препараты жидких форм. Эмульсии можно приготовить в растворах в водных растворах пропиленгликоля, или они могут содержать эмульгатор, такой как лецитин, сорбитмоноолеат или аравийская камедь. Водные растворы можно приготовить растворением активного компонента в воде и

добавлением подходящих красителей, корринентов, стабилизаторов и загустителей. Водные суспензии можно приготовить диспергированием тонко диспергированного активного компонента в воде с вязким материалом, таким как природные или синтетические камеди, полимеры, метилцеллюлоза, натрия карбоксиметилцеллюлоза и другие хорошо известные суспендирующие средства. Препараты твердых форм включают растворы, суспензии и эмульсии и могут содержать, помимо активного компонента, красители, корригенты, стабилизаторы, буферы, искусственные и природные подсластители, диспергаторы, загустители, солюбилизующие агенты и т.п.

Композиции для парентерального введения

Раскрытые здесь соединения можно приготовить для парентерального введения (например, с помощью инъекции, например, болюсной инъекции или непрерывного вливания) или могут быть представлены в форме стандартной дозы в ампулах, наполненных шприцов, инфузии небольшого объема или в упаковках лекарственных средств для многократного введения с добавленным консерватором. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, например, растворы в водном растворе полиэтиленгликоля. Примеры масляных или неводных носителей, разбавителей, растворителей или носителей включают пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла (например, оливковое масло) и инъекируемые органические сложные эфиры (например, этилолеат) и могут содержать входящие в композицию агенты, такие как консерванты, увлажняющие средства, эмульгаторы или суспендирующие средства, стабилизаторы и/или диспергаторы. В альтернативном случае активный ингредиент может быть в форме порошка, полученного асептическим выделением стерильного твердого вещества или лиофилизацией из раствора, для составления до применения с помощью подходящего носителя, например, стерильной апиrogenной воды. Водные растворы следует подходящим образом забуферить, если необходимо, и жидкому разбавителю следует сначала придать изотоничность с помощью достаточного количества соли или глюкозы. Водные растворы, в частности, подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. Все используемые стерильные водные среды легко достижимы с помощью стандартных методов, известных квалифицированным в данной области техники специалистам.

Растворы варианта сплайсинга грелина или подобного варианту сплайсинга грелина соединения, или их фармацевтически приемлемой соли (и, например, антигенных эпитопов и ингибиторов протеаз) можно приготовить в воде или солевом растворе и необязательно смешать с нетоксичным поверхностно-активным веществом. Композиции для внутривенного или внутриартериального введения могут включать стерильные водные растворы, которые могут также содержать буферы, липосомы, разбавители и другие подходящие добавки.

Масла, применимые в парентеральных композициях, включают минеральные, животные, растительные или синтетические масла. Конкретные примеры масел, применимых в таких композициях, включают арахисовое, соевое, кунжутное, хлопковое, кукурузное, оливковое, вазелиновое и минеральное. Жирные кислоты, подходящие для использования в парентеральных композициях, включают олеиновую кислоту, стеариновую кислоту и изостеариновую кислоту. Этилолеат и изопропилмиристит являются примерами подходящих сложных эфиров жирных кислот.

Подходящие для использования в парентеральных композициях мыла включают

соли щелочных металлов, аммония и триэтаноламина жирных кислот, и подходящие детергенты включают (а) катионные детергенты, такие как, например, диметилдиалкиламмония галиды и алкилпиридиния галиды; (b) анионные детергенты, такие как, например, алкил-, арил- и олефинсульфонаты, алкил-, олефин-, моноглицеридсульфаты и простые эфиры сульфаты, и сульфосукцинаты; (с) неионные детергенты, такие как, например, окиси жирных аминов, алканоламида жирных кислот и сополимеры полиоксиэтиленполипропилены; (d) амфотерные детергенты, такие как, например, алкил-бета-аминопропионаты и четвертичные аммониевые соли 2-алкил-имидазолины; и (е) их смеси.

Парентеральные композиции, как правило, будут содержать от приблизительно 0,5 до приблизительно 25% по весу активного ингредиента в растворе. Могут использоваться консерванты и буферы. Для минимизации или исключения раздражения в месте инъекции такие композиции могут содержать одно или несколько неионных поверхностно-активных веществ, имеющих гидрофильно-липофильный баланс (HLB) от приблизительно 12 до приблизительно 17.

Количество поверхностно-активного вещества в таких композициях будет, как правило, находиться в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 15% по весу. Подходящие поверхностно-активные включают эфиры полиэтиленсорбитана и жирных кислот, такие как сорбитмоноолеат и высокомолекулярные продукты присоединения этиленоксида к гидрофобному основанию, образованные конденсацией пропиленоксида с пропиленгликолем. Парентеральные композиции могут быть представлены в герметичных контейнерах для однократного или многократного введения, таких как ампулы и флаконы, и могут храниться в лиофилизированном состоянии, требующем только добавление стерильного жидкого наполнителя, например, воды, для инъекций непосредственно перед применением. Растворы и суспензии для импровизированных инъекций можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток ранее описанного типа.

Фармацевтические лекарственные формы, подходящие для инъекции или инфузии, могут включать стерильные водные растворы или суспензии, содержащие активный ингредиент, которые адаптированы для введения инкапсуляцией в липосомы. Во всех случаях конечная лекарственная форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях производства и хранения.

Стерильные инъеклируемые растворы готовят включением варианта сплайсинга грелина или подобного варианту сплайсинга грелина соединения или их фармацевтически приемлемой соли в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, если требуется, за которым следует, например, стерилизация фильтрацией.

Композиции для местного введения

Соединения, раскрытые здесь, можно также доставить местно. Области для местного введения включают поверхность кожи, а также ткани слизистых оболочек прямой кишки, носа, рта и гортани. Композиции для местного введения через кожу и слизистые оболочки не должны вызывать признаки раздражения, такие как опухание или покраснение.

Композиции для местного введения могут включать фармацевтически приемлемый носитель, адаптированный для местного введения. Таким образом, композиция может принимать форму, например, суспензии, раствора, мази, лосьона, крема, аэрозоля, разбрызгиваемого вещества, суппозитории, имплантата, ингалятора, таблетки, капсулы, сухого порошка, сиропа, бальзама или лепешки.

Способы приготовления таких композиций хорошо известны в фармацевтической промышленности.

Раскрытые здесь соединения можно приготовить для местного введения в эпидермис в виде мазей, кремов или лосьонов или в виде трансдермальных пластырей. Мази и кремы можно, например, приготовить с использованием водной или масляной основы с добавлением подходящих загустителей и/или гелеобразующих агентов. Лосьоны можно приготовить с использованием водной или масляной основы, и они будут, как правило, также содержать один или несколько эмульгаторов, стабилизаторов, диспергаторов, суспендирующих агентов, загустителей или красителей. Композиции, подходящие для местного введения в рот, включают лепешки, содержащие активные ингредиенты в ароматной основе, обычно сахарозе и аравийской или трагакантовой камеди; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Кремы, мази или пасты в соответствии с настоящим описанием являются полутвердыми композициями для внешнего применения, содержащими активный ингредиент. Их можно получить смешиванием активного ингредиента в тонко диспергированной или порошкообразной форме, исключительно или в растворе или суспензии в водной или неводной жидкости, с помощью подходящего механического оборудования, с маслянистой или немаслянистой основой. Основа может включать углеводороды, такие как твердый, мягкий или жидкий парафин, глицерин, пчелиный воск, металлическое мыло; растительный клей; масло природного происхождения, такое как миндалевое, кукурузное, арахисовое, касторовое или оливковое масло; ланолин или его производные; или жирные кислоты, такие как стеариновая или олеиновая кислота, вместе со спиртом, таким как пропиленгликоль, или макроголь. Композиция может включать любое подходящее поверхностно-активное вещество, такое как анионное, катионное или неионное поверхностно-активное вещество, такое как эфир сорбита или его производное полиоксиэтилен. Суспендирующие агенты, такие как природные камеди, производные целлюлозы или неорганические материалы, такие как кремнеземы кремнистых пород, и другие ингредиенты, такие как ланолин, могут также быть включены.

Лосьоны в соответствии с настоящим описанием включают лосьоны, подходящие для нанесения на кожу или для глаз. Лосьон для глаз может включать стерильный водный раствор, необязательно содержащий бактерицидное вещество, и может быть приготовлен способами, схожими со способами приготовления капель. Лосьоны или жидкие мази для нанесения на кожу могут также включать агент, ускоряющий высыхание и охлаждающий кожу, такой как спирт или ацетон, и/или увлажнитель, такой как глицерин или масло, такое как касторовое масло или арахисовое масло.

Описываемые здесь соединения можно вводить чрескожно. Чрескожное введение обычно включает доставку фармацевтического агента для чрескожного прохождения лекарственного средства в системный кровоток пациента. Места кожи включают анатомические области для чрескожного введения лекарственного средства и включают предплечье, живот, грудь, спину, ягодицу, сосцевидную область и т.п.

Чрескожную доставку осуществляют воздействием источника активного компонента на кожу пациента в течение продолжительного периода времени. Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, заключающееся

в обеспечении контролируемой доставки комплекса соединений в организм (смотри Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives, Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); и Transdermal Delivery of
 5 Drugs, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds), CRC Press, (1987)). Такие лекарственные формы можно приготовить растворением, диспергированием или включением иным образом раскрытого здесь соединения в соответствующую среду, такую как эластомерный материал матрицы. Усилители абсорбции могут также использоваться
 10 для увеличения передвижения соединения через кожу. Скорость такого передвижения можно контролировать или с помощью обеспечения контролирующей скорость мембраны, или с помощью диспергирования соединения в полимерной матрице или геле.

В описываемых здесь способах найдут применение разнообразные типы трандермальных пластырей. Например, простой пластырь можно приготовить из материала подложки и акрилатного клея. Готовят композицию активного компонента и любого усилителя в клеевом разливочном растворе, и делают
 15 возможным тщательное перемешивание. Раствор разливают непосредственно по материалу подложки, и растворитель разливочного раствора испаряют в сушильной печи, оставляя клейкую пленку. Для комплектования системы можно прикрепить антиадгезионный защитный материал.

В альтернативном случае для доставки раскрытого здесь соединения можно использовать пластырь с полиуретановой матрицей. Слои этого пластыря включают
 25 подложку, полиуретановую матрицу с лекарственным средством/усилителем, мембрану, клейкое вещество и антиадгезионный защитный материал. Полиуретановую матрицу готовят с использованием затвердения при комнатной температуре форполимера полиуретана. Добавление воды, спирта и комплекса к
 30 форполимеру приводит к образованию липкого устойчивого эластомера, который можно разлить непосредственно на материале подложки.

В дальнейшем варианте осуществления будет использоваться пластырь с матрицей в виде гидрогеля. Как правило, матрица в виде гидрогеля будет включать спирт, воду, лекарственное средство и несколько гидрофильных полимеров. Эту
 35 матрицу в виде гидрогеля можно включить в трансермальный пластырь между подложкой и клейким слоем.

В описываемых здесь способах также найдут применение пластыри с резервуаром жидкости. Этот пластырь включает непроницаемую или полупроницаемую, термосклеиваемую подложку, термосклеиваемую мембрану, чувствительное к
 40 давлению, связывающееся с кожей вещество на основе акрилата и силицированный антиадгезионный защитный материал. Подложку склеивают нагреванием с мембраной с образованием резервуара, который можно затем наполнить раствором комплекса, усилителей, гелеобразующих веществ и других наполнителей.

Пластыри с пористой матрицей схожи по конструкции и компонентам с системами с резервуаром жидкости за исключением того, что загущенный раствор фармацевтический агент - химический модификатор заключают в тонкий пористый
 45 слой, обычно полиуретан. Этот пористый слой располагается между подложкой и мембраной, которые склеивают нагреванием по периферии пластыря.

Для систем пассивной доставки скорость высвобождения обычно контролируется мембраной, размещаемой между резервуаром и кожей, диффузией из полупроводникового устройства или самой кожей, служащей в качестве

контролирующего скорость барьера в системе доставки (смотри, патенты США № 4816258; 4927408; 4904475; 4588580; 4788062 и т.п., все из которых включены сюда посредством ссылки). Скорость доставки лекарственного средства будет зависеть отчасти от природы мембраны. Например, скорость доставки лекарственного средства через мембраны внутри организма, как правило, выше скорости доставки через кожные барьеры. Наиболее преимущественно скорость, с которой активное соединение доставляется из устройства в мембрану, контролируют с помощью использования ограничивающих скорость мембран, которые размещают между резервуаром и кожей. Допуская, что кожа в достаточной степени проницаема для активного компонента (т.е. абсорбция кожей выше скорости прохождения через мембрану), мембраны будут служить для контролирования интенсивности дозы, испытываемой пациентом.

Подходящие материалы для проницаемых мембран можно выбрать на основе желаемой степени проницаемости, природы активного соединения и механических соображений, связанных с конструированием устройства. Примеры материалов для проницаемых мембран включают широкий выбор природных и синтетических полимеров, таких как полидиметилсилоксаны (силиконы-каучуки), сополимеры этиленвинилацетата (EVA), полиуретаны, сополимеры полиуретан-полиэфир, полиэтилены, полиамиды, поливинилхлориды (PVC), полипропилены, поликарбонаты, политетрафторэтилены (PTFE), целлюлозные материалы, например, целлюлозы триацетат и целлюлозы нитрат/ацетат, и гидрогели, например, 2-гидроксиэтилметакрилат (HEMA).

В устройстве могут содержаться другие элементы, такие как другие общепринятые компоненты терапевтических продуктов, в зависимости от желаемых характеристик устройства. Например, раскрытые здесь композиции могут также включать один или более консервантов или бактериостатических агентов, например, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, хлоркрезол, бензалкония хлориды и т.п. Эти фармацевтические композиции также могут содержать другие активные ингредиенты, такие как противомикробные агенты, в частности, антибиотики, анестетики, анальгетики и противозудные средства.

Композиции для введения в виде суппозиториев

Раскрытые здесь соединения можно приготовить для введения в виде суппозиториев. Типичный суппозиторий получают с помощью обеспечения низкоплавкого парафина, например, смеси глицеридов жирных кислот, или масла какао, которое сначала плавят, и в нем гомогенно, например, с помощью перемешивания, распределяют активный компонент. Расплавленную гомогенную смесь затем выливают в формы с удобными размерами, позволяют ей охладиться и затвердеть.

Активный компонент можно приготовить в суппозитории, содержащем, например, приблизительно 0,5% - приблизительно 50% раскрытого здесь соединения, расположенного в носителе полиэтиленгликоле (PEG) (например, PEG 1000 [96%] и PEG 4000 [4%]).

Композиция

Предпочтительный аспект предусматривает фармацевтические композиции, применимые для осуществления на практике терапевтических способов, описанных здесь. Фармацевтические композиции могут содержать физиологически приемлемый носитель вместе с по крайней мере одной разновидностью усиливающего секрецию средства, такого как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга

грелина соединение, описанное здесь, растворенной или диспергированной в нем, в качестве активного ингредиента. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция не является иммунногенной при введении являющемуся человеком индивидууму с терапевтическими целями, если
5 только целью не является индуцирование иммунного ответа.

Один аспект относится к фармацевтической композиции, содержащей по крайней мере одно усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, определенное выше в
10 формуле I. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит по крайней мере два различных подобных варианту сплайсинга грелина соединения, определенных выше в формуле I, для увеличения эффекта лечения. Различие может, например, представлять собой соединения с различными ацилированиями, которые обсуждались выше.

Используемые здесь термины «фармацевтически приемлемый», «физиологически допустимый» и их грамматические вариации, в том случае, когда они относятся к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, используются взаимозаменяемо и представляют собой то, что материалы можно вводить человеку или наносить на
20 него без выработки нежелательных физиологических эффектов, таких как тошнота, головокружение, желудочное расстройство и т.п.

Приготовление фармацевтической композиции, содержащей активные ингредиенты, растворенные или диспергированные в ней, хорошо установлено в данной области техники. Как правило, такие композиции готовят в виде стерильных
25 инъектируемых лекарственных средств или в виде жидких растворов, или в виде суспензий, водных или неводных; однако можно также приготовить твердые формы, подходящие для приготовления раствора или суспензий в жидкости перед применением. Композиция может также быть превращена в эмульсию.

Активный ингредиент можно смешать с наполнителями, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом, и присутствует в количествах, подходящих для применения в терапевтических
30 способах, описанных здесь. Подходящими наполнителями являются, например, вода, солевой раствор, декстроза, глицерин, этанол или т.п. и их комбинации. Кроме того, если желательно, композиция может содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как увлажняющие средства или эмульгаторы, рН-буферные агенты и т.п., которые увеличивают эффективность активного
35 ингредиента. Предпочтительно, чтобы композиция имела рН в пределах диапазона 3,5-8, например, в диапазоне 4,5-7,5, например, в диапазоне 5,5-7, например, в диапазоне 6-7,5, наиболее предпочтительно приблизительно 7,3. Однако, как это понятно квалифицированному в данной области техники специалисту, диапазон рН можно установить в соответствии с подвергаемым
40 лечению индивидуумом и процедурой введения. Например, определенные усиливающие секрецию средства, такие как вариант сплайсинга грелина и гомологи варианта сплайсинга грелина, можно легко стабилизировать при низком рН; так, в другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, композиция имеет рН в пределах диапазона 3,5-7, например, 4-6, например, 5-6,
45 например, 5,3-5,7, например, 5,5.

Раскрытые здесь фармацевтические композиции могут включать в себе фармацевтически приемлемые соли соединений. Эти соли будут солями, которые являются приемлемыми при их применении для фармацевтического использования,

что означает, что соль будет сохранять биологическую активность исходного соединения, и соль не будет оказывать неблагоприятных или вредных эффектов при ее применении и использовании для лечения заболеваний.

Фармацевтически приемлемые соли готовят стандартным образом. Если исходным соединением является основание, его обрабатывают избытком органической или неорганической кислоты в подходящем растворителе. Если исходным соединением является кислота, его обрабатывают неорганическим или органическим основанием в подходящем растворителе.

Раскрытые здесь соединения можно вводить в форме его соли щелочного металла или щелочно-земельного металла одновременно или вместе с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, особенно и предпочтительно в форме его фармацевтической композиции, или, например, перорально, ректально или парентерально (в том числе подкожно), в эффективном количестве.

Примеры фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей для применения в фармацевтической композиции настоящего изобретения включают соли, получаемые из минеральных кислот, таких как, например, хлористоводородная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как, например, винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная кислоты, пара-толуолсульфокислота и арилсульфокислота.

Другие подходящие фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (образованные свободными аминогруппами полипептида). Другие примеры солей включают фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли, фармацевтически приемлемые соли металлов, аммонийные соли и алкилированные аммонийные соли. Кислотно-аддитивные соли включают соли неорганических кислот, а также органических кислот. Характерные примеры подходящих неорганических кислот включают хлористоводородную, бромистоводородную, йодистоводородную, фосфорную, серную и азотную кислоты и т.п. Характерные примеры подходящих органических кислот включают муравьиную, уксусную, трихлоруксусную, трифторуксусную, пропионовую, бензойную, коричную, лимонную, фумаровую, гликолевую, молочную, малеиновую, яблочную, малоновую, миндальную, щавелевую, пикриновую, пировиноградную, салициловую, янтарную кислоты, метансульфокислоту, этансульфокислоту, винную, аскорбиновую, памовую, бисметиленсалициловую кислоты, этандисульфокислоту, глюконовую, цитраконовую, аспарагиновую, стеариновую, пальмитиновую, этилендиаминтетрауксусную (EDTA), пара-аминобензойную, глютаминовую кислоты, бензолсульфокислоту и пара-толуолсульфокислоту и т.п. Дальнейшие примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения неорганических или органических кислот включают фармацевтически приемлемые соли, перечисленные в Berge S.M. et al., J. Pharm. Sci. 66: 1-19 (1977), источнике, который включен сюда посредством ссылки. Примеры солей металлов включают соли лития, натрия, калия и магния и т.п.

Примеры аммонийных и алкилированных аммонийных солей включают соли аммония, метиламмония, диметиламмония, триметиламмония, этиламмония, гидроксиэтиламмония, диэтиламмония, бутиламмония и тетраметиламмония и т.п.

Соли, образованные свободными карбоксильными группами, можно также получить из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как

изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т.п.

В объем соединений или их фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей в контексте настоящего описания также включены их любые гидраты (гидратированные формы).

Для парентерального введения можно использовать растворы соединений настоящего изобретения в стерильном водном растворе, водном растворе пропиленгликоля или сезамовом или арахисовом масле. Такие водные растворы должны быть подходящим образом забуферены, если необходимо, и жидкому разбавителю следует сначала придать изотоничность с помощью достаточного количества соли или глюкозы. Водные растворы, в частности, подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. Все используемые стерильные водные среды легко достижимы с помощью стандартных методов, известных квалифицированным в данной области техники специалистам.

Жидкие композиции могут также содержать жидкие фазы помимо и с исключением воды. Примерами таких дополнительных жидких фаз являются глицерин, растительные масла, такие как хлопковое масло, органические сложные эфиры, такие как этилолеат, и эмульсии типа масла в воде.

Подходящие фармацевтические носители включают инертные твердые разбавители или наполнители, стерильный водный раствор и различные органические растворители. Примерами твердых носителей являются лактоза, каолин, сахароза, циклодекстрин, тальк, желатин, агар, пектин, аравийская камедь, магния стеарат, стеариновая кислота или эфиры целлюлозы и низших алкилов. Примерами жидких носителей являются сироп, арахисовое масло, оливковое масло, фосфолипиды, жирные кислоты, амины жирных кислот, полиоксиэтилен или вода. Аэрозоль для носа или композиции для ингаляции можно приготовить, например, в виде растворов в волевом растворе, используя бензиловый спирт или другие подходящие консерванты, усилители абсорбции для увеличения биодоступности, используя фторуглерод и/или используя другие солюбилизующие или диспергирующие агенты.

Фармацевтические композиции, образованные комбинированием раскрытых здесь соединений и фармацевтически приемлемых носителей, затем без труда вводят во множество лекарственных форм, подходящих для раскрытых путей введения. Композиции могут быть подходящим образом представлены в форме стандартной дозы с помощью способов, известных в области фармации.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения препарат содержит усиливающее секрецию средство или его соль в виде лиофилизата, и препарат, кроме того, содержит растворитель, при этом указанный лиофилизат и указанный растворитель находятся в отдельных отделениях до введения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения препарат представляет собой раствор усиливающего секрецию средства или его соли. В любом из двух вариантов осуществления растворитель может быть любым подходящим растворителем, таким как растворители, описанные здесь, и предпочтительно растворителем является солевой раствор.

Другой аспект относится к способу приготовления лекарственного средства или фармацевтической композиции, содержащей раскрытое здесь соединение, включающему смешивание по крайней мере одного подобного варианту сплайсинга грелина соединения, определенного выше в формуле I, с физиологически приемлемым носителем. Дальнейший аспект относится к фармацевтической

композиции, содержащей в качестве активного ингредиента соединение, описанное выше в формуле I, или его фармацевтически приемлемую соль вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Соответственно композиция может, кроме того, включать, транспортные молекулы, описанные выше.

Комбинаторные лечения

В дальнейшем аспекте соединения настоящего изобретения можно назначать в комбинации с дополнительными фармакологически активными веществами или другим фармакологически активным материалом и/или можно вводить в комбинации с другим терапевтическим способом. Под фразой «в комбинации с другим веществом(ами) и/или терапевтическим способом(ами)» подразумевается здесь, что указанное другое вещество(а) и/или указанный терапевтический способ(ы) назначают индивидууму, таким образом подвергаемым лечению, до, во время (в том числе одновременно) и/или после лечения индивидуума усиливающим секрецию средством. Во всех случаях комбинаторного лечения, описанных здесь, комбинация может быть в форме систем комплектов частей, причем скомбинированные активные вещества можно использовать для одновременного, последовательного или отдельного введения. Во всех случаях предпочтительно назначение любого из упоминаемых здесь лекарственных средств в фармацевтически эффективных количествах, т.е. назначение, включающее общее количество каждого активного компонента лекарственного средства или фармацевтической композиции или способа, которое является достаточным для демонстрации значимой пользы пациенту.

В следующих разделах комбинаторные терапии для использования в предпочтительных вариантах осуществления настоящего группируют следующим образом.

1) Комбинации, в которых все активные ингредиенты являются регулирующими аппетит агентами или иначе применимы для лечения кахексии и/или липодистрофии.

Усиливающее секрецию средство(а) в соответствии с настоящим описанием можно вводить в комбинации с другими регулирующими аппетит агентами, включающими более одного типа усиливающего секрецию гормона роста средства, такого как другое подобное варианту сплайсинга грелина соединение, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединении, включающее структуру, определяемую формулой I, описанной выше. Другие усиливающие секрецию средства, подходящие для комбинированного введения с другим соединением усиливающим секрецию средством, представляют собой любые из соединений усиливающих секрецию средств, описанных здесь. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вариант сплайсинга грелина (наиболее предпочтительно вариант сплайсинга грелина человека) вводят в комбинации с отличным подобным варианту сплайсинга грелина соединением - эта комбинация, как предусматривается, усиливает и/или пролонгирует эффект усиливающих секрецию средств на рецептор грелина. Подобным образом для увеличения эффективности на рецептор грелина индивидууму можно вводить несколько различных усиливающих секрецию средств, например, больше 2 различных типов усиливающих секрецию средств, например, 3, например, 4, например, 5, например, 6, например, 7, например, больше 8 различных типов усиливающих секрецию средств. Усиливающие секрецию средство в соответствии с настоящим описанием, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение(я), можно также вводить в комбинации с фармацевтически эффективным количеством гормона роста, в том числе hGH.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающие секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно вводить в комбинации с IGF-1, IGFBP-3 или ALP, предпочтительно с IGF-1. Обоснованием этого комбинаторного лечения является увеличение уровней IGF-1, IGFBP-3 и/или ALP, которые, как обнаружено, являются низкими у страдающих кахексией индивидуумов.

В дальнейшем варианте осуществления настоящего изобретения усиливающие секрецию средства, такие как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно вводить в комбинации с соединениями, которые, как известно, стимулируют аппетит, такими как грелин, антагонисты рецептора меланокортинов, агонисты рецептора нейропептида Y, в том числе агонисты, избирательные в отношении индивидуальных подтипов рецепторов нейропептида Y, лептин или агонисты рецептора лептина, каннабиноиды, включающие марихуану и производные марихуаны, нейрорептические средства, особенно атипичные нейрорептические средства, такие как сертиндол, суфпирид, клозапин, рисперидон, кветиапин, амисульприд, зипрасидон и оланзапин.

2) Комбинации усиливающего секрецию средства, такого как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, с активным ингредиентом или терапией против заболевания, которое вызывает или связано с заболеванием или состоянием, подвергаемым лечению усиливающим секрецию средством, таким как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение.

В частности, в отношении раковой кахексии введение усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно выполнить в комбинации с любой противораковой терапией, включающей антинеопластическую химиотерапию, радиотерапию и хирургическое вмешательство. В частности, его используют в комбинации с химиотерапией и радиотерапией. Таким образом, один вариант осуществления относится к способу лечения рака, включающему назначение эффективного количества радиотерапии и эффективного количества усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение в соответствии с настоящим описанием. Лечение усиливающим секрецию средством, таким как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно начинать до начала радиотерапевтического лечения. Его можно назначать непрерывно во время радиотерапии, или его можно назначать с интервалами, например, между периодами радиотерапевтической терапии.

Другой вариант осуществления относится к способу лечения рака, включающему назначение эффективного количества антинеопластической химиотерапии и эффективного количества усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение в соответствии с настоящим описанием. Лечение усиливающим секрецию средством, таким как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно начинать до начала химиотерапевтического лечения. Его можно назначать непрерывно во время химиотерапии, или его можно назначать с интервалами, например, между периодами химиотерапевтической терапии.

Кроме того, комбинаторное лечение может быть совместной композицией усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, и антинеопластической химиотерапии.

Усиливающее секрецию средство в соответствии с настоящим изобретением, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, можно также назначать в комбинации с фармацевтически эффективным количеством глюкокортикоидных стероидов и прокинетическим лечением, а также другим лечением, используемым при раковой терапии. Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секрецию средство в соответствии с настоящим изобретением, такое как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, назначают в комбинации с фармацевтически эффективным количеством одного или более лекарственных средств: способствующих наступлению или сохранению беременности лекарственных средств, таких как мегэстро́л и/или ципрогептадины (и/или другие антагонисты рецептора 5-HT); и/или аминокислот с разветвленными цепями; и/или оксандралина; и/или анти-TNF- α агентов, таких как инфликсимаб, этанерцепт или адалимумаб; и/или тестостерона; и/или «смеси», включающей лекарственные средства иммунопитания, антиоксиданты и ингибиторы COX2; и/или каннабиноидов; и/или эйкозапентаеновой кислоты; и/или мелатонина; и/или талидомида; и/или β 2-адренергических лекарственных средств, наиболее предпочтительно для лечения кахексии, такой как раковая кахексия.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения усиливающее секрецию средство, такое как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, назначают в комбинации с противовоспалительными соединениями, предпочтительно NSAID, такими как индометацин, и ингибиторами COX1 или ингибиторами COX2; и/или анти-TNF- α агентами, такими как инфликсимаб, этанерцепт или адалимумаб. Другая комбинация может быть с эритропоэтином/EPO. Другая комбинация может быть с понижающими ангиотензин II агентами, такими как витор. Другая комбинация может быть с избирательным модулятором(ами) рецептора андрогена. Другая комбинация может быть с одним или несколькими из лептина, агонистов системы ренин-ангиотензин, агонистов рецепторов опиоидов или агонистов активируемого пролифератором пероксисом гамма-рецептора.

Относительно лечения липодистрофии другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к лечению, при котором усиливающее секрецию средство, такое как вариант сплайсинга грелина, более предпочтительно подобное варианту сплайсинга грелина соединение, назначают в комбинации с лечением против липодистрофии, таким как одно или более лечений или соединений, описанных здесь, подходящих для лечения липодистрофического синдрома.

Таким образом, другие фармакологически активные вещества, которые можно назначать в комбинации с указанным усиливающим секрецию средство, таким как подобное варианту сплайсинга грелина соединение, в способах настоящего описания, включают:

(a) Лептин: Показано, что лептин оказывает положительный эффект на метаболические нарушения, связанные с липодистрофией (Oral E.A. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 91: 621-28 (2006)). Доказано, что это лечение является полезным как для пациентов, страдающих от низкого уровня в плазме лептина, так и для пациентов, имеющих нормальный уровень.

(b) Агонисты активируемого пролифератором пероксисом гамма-рецептора (PPAR- γ): В нескольких исследованиях продемонстрировано, что PPAR- γ является важным для метаболизма в адипоцитах и метаболического синдрома, и высказано предположение, что агонисты PPAR- γ будут уменьшать симптомы

липодистрофии (Semple R.K. et al., J. Clin. Invest. 116: 581-89 (2006)).

(с) Агонисты системы ренин-ангиотензин: Показано, что лечение HAART увеличивает активность ACE в Т-клетках, что означает, что агонисты системы ренин-ангиотензин могут улучшить индуцируемую HAART липодистрофию (Hegele R.A. & Leff T., J. Clin. Invest. 114: 163-65 (2004)).

(d) Агонисты рецепторов опиоидов: Показано, что агонисты рецепторов опиоидов, такие как налоксон и налтрексон, удлиняют период времени от лечения ингибиторами протеаз до развития первых симптомов липодистрофии (AIDS Patient Care STDS 14: 283 (2000)).

(е) Вариант сплайсинга грелина без ацила: обнаружено, что вариант сплайсинга грелина в комбинации с вариантом сплайсинга грелина без ацила снижает инсулинорезистентность, которая является важным признаком липодистрофического синдрома (Koutkia P. et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 286: E296-303 (2004)).

(f) Адипонектин и противодиабетическое лечение, включающее другие соединения для лечения и/или предупреждения инсулинорезистентности и заболеваний, при которых инсулинорезистентность является патофизиологическим механизмом.

(g) Сообщалось, что терапия rhGH вызывает уменьшение размера «горба бизона», жира туловища и увеличивает тощую массу тела у небольшого числа пациентов (Lo J.C. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 3480-87 (2001)). Однако потеря жира и отклонения от нормы липидов не улучшались, а контроль глюкозы в крови ухудшался. Примеры синдромов, подвергаемых лечению hGH, включают ВИЧ, СПИД и рак. Высказывается не связанное теорией предположение, что лечение вариантом сплайсинга грелина или его аналогом будет сохранять и/или увеличивать жир тела у пациентов, подвергаемых лечению hGH, тем самым эффективно противодействуя липодистрофии, вызванной hGH, или по крайней мере уменьшая такую липодистрофию. Таким образом, один предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению варианта сплайсинга грелина или подобного варианту сплайсинга грелина соединения в комбинации с гормоном роста, предпочтительно для индивидуумов, страдающих ВИЧ или СПИДом и/или раковой кахексией. Указанное лечение вариантом сплайсинга грелина или его аналогом может быть до, и/или во время, и/или после того, как индивидуума подвергают лечению гормоном роста. Предпочтительно указанным гормоном роста является hGH.

(h) Лечение комбинациями различных усиливающих секрецию средств, описанных выше в группе 1), ранее.

3) Комбинации усиливающего секрецию средства, такого как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение, с активным ингредиентом или терапией против симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, подвергаемым лечению усиливающим секрецию средством, таким как вариант сплайсинга грелина или подобное варианту сплайсинга грелина соединение.

Один аспект относится к комбинаторному лечению, при котором один из ингредиентов в комбинации используется для лечения симптомов или состояний, которые могут встречаться у индивидуумов, страдающих кахексией. Таким образом, применения и комбинаторные лечения, которые включают назначение усиливающего секрецию средства, такого как подобное варианту сплайсинга грелина соединение в соответствии с настоящим описанием, могут также включать лечение в комбинации с одним или несколькими из

а) профилактики и/или облегчения, и/или лечения клинической депрессии, комбинаторное лечение которой, кроме того, включает назначение антидепрессанта, его пролекарственной формы или фармацевтически приемлемой соли указанного антидепрессанта или указанной пролекарственной формы. При
 5 вышеуказанном комбинаторном лечении антидепрессантом предпочтительно является ингибитор обратного захвата норадреналина (NERI), избирательный ингибитор обратного захвата серотонина (SSRI), ингибитор моноаминоксидазы (MAO), комбинированный NERI/SSRI или атипичный антидепрессант,
 10 пролекарственная форма указанного антидепрессанта или фармацевтически приемлемая соль указанного антидепрессанта или указанной пролекарственной формы. Предпочтительными антидепрессантами являются SSRI, его пролекарственная форма или фармацевтически приемлемая соль указанного SSRI или указанной пролекарственной формы. Предпочтительно SSRI представляет
 15 собой циталопрам, эсциталопрам, фемоксетин, флуоксетин, флувоксамин, индалпин, инделоксазин, милнаципран, пароксетин, сертралин, сибутрамин или зимелдин, пролекарственную форму указанного SSRI или фармацевтически приемлемую соль указанного SSRI или указанной пролекарственной формы. В определенных
 20 вариантах осуществления комбинаторных лечений из вышеуказанного предпочтительными являются циталопрам и эсциталопрам, их пролекарственная форма или фармацевтически приемлемая соль.

б) профилактики и/или облегчения, и/или лечения рвотного состояния, включающего тошноту и рвоту, комбинаторное лечение которого, кроме того,
 25 включает назначение противорвотного средства, его пролекарственной формы или фармацевтически приемлемой соли указанного противорвотного средства или указанной пролекарственной формы. Предпочтительные противорвотные средства, используемые при комбинаторных лечених в соответствии с настоящим описанием,
 30 включают меклизина гидрохлорид, прохлорперазин, прометазин, триметобензамида гидрохлорид и ондансетрона гидрохлорид. В частности, рвота может быть вызвана раком, или вследствие противоракового лечения, или вследствие ракового заболевания как такового.

с) профилактики и/или облегчения, и/или лечения психотического состояния, комбинаторное лечение которого, кроме того, включает назначение нейролептика,
 35 его пролекарственной формы или фармацевтически приемлемой соли указанного нейролептика или указанной пролекарственной формы. Предпочтительные нейролептики, используемые при комбинаторных лечених в соответствии с
 40 настоящим описанием, включают хлорпромазин, галоперидол, клозапин, локсапин, молиндона гидрохлорид, тиотиксен, оланзарин, zipрасидон, zipрасидона гидрохлорид, прохлорперазин, перфеназин, трифлуоперазина гидрохлорид и рисперидон.

д) профилактики и/или облегчения, и/или лечения тревоги, комбинаторное лечение
 45 которой, кроме того, включает назначение седативного средства, его пролекарственной формы или фармацевтически приемлемой соли указанного седативного средства или указанной пролекарственной формы. Предпочтительные седативные средства, используемые при комбинаторных лечених в соответствии с
 50 настоящим описанием, включают алпразолам, клоназепам, лоразепам, оксазепам, хлордиазепоксида гидрохлорид, диазепам, биспирона гидрохлорид, доксепина гидрохлорид, гидроксизин памоат и клоназепам.

Конечно, комбинации вышеуказанных групп (1-3) также находятся в пределах

объема этого описания.

Медицинская упаковка

Раскрытые здесь соединения можно вводить отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями или наполнителями, или для
5 однократного, или многократного введения.

Композиции могут быть подходящим образом представлены в форме стандартной дозы с помощью способов, известных квалифицированным в данной области техники специалистам.

Предпочтительно, чтобы соединения в соответствии с настоящим описанием были предоставлены в наборе. Такой набор, как правило, содержит активное соединение в лекарственных формах для введения. Лекарственная форма содержит количество активного соединения, достаточное для получения желательного эффекта при
15 введении субъекту, предпочтительно до по крайней мере одного приема пищи в день, более предпочтительно до каждого основного приема пищи, например, три раза в день, во время курса из 1 или более дней. Следовательно, предпочтительно, чтобы медицинская упаковка включала количество стандартных доз, соответствующее релевантной схеме введения. Соответственно в одном варианте осуществления настоящего изобретения медицинская упаковка включает
20 фармацевтическую композицию, содержащую соединение, определенное выше, или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемые носители и/или наполнители, при этом указанная упаковка содержит от 7 до 21 стандартной дозы или их множество, таким образом, содержит, стандартные дозы для введения на протяжении одной недели или введения на протяжении нескольких недель.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения медицинская упаковка предназначена для введения один раз в день на протяжении недели и включает 7 стандартных доз, в другом варианте осуществления настоящего изобретения
30 медицинская упаковка предназначена для введения два раза в день и включает 14 стандартных доз. В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения медицинская упаковка предназначена для введения три раза в день и включает 21 стандартную дозу.

Стандартные дозы являются такими, которые определены выше, т.е. стандартная
35 доза предпочтительно содержит количество подобного варианту сплайсинга грелина соединения или его соли, эквивалентное от 0,3 мкг до 600 мг варианта сплайсинга грелина, например, от 2,0 мкг до 200 мг варианта сплайсинга грелина, например, от 5,0 мкг до 100 мг варианта сплайсинга грелина, например, от 10 мкг
40 до 50 мг варианта сплайсинга грелина, например, от 10 мкг до 5 мг варианта сплайсинга грелина, например, от 10 мкг до 1,0 мг варианта сплайсинга грелина.

Медицинская упаковка может быть в любой форме, подходящей для парентерального, в частности, подкожного, введения. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения упаковка имеет форму картриджа, такого
45 как картридж для ручки для инъекции, такой как ручка для инъекции, известная из лечения инсулином или лечения hGH.

Когда медицинская упаковка включает более одной стандартной дозы, предпочтительно, чтобы медицинская упаковка была обеспечена механизмом для
50 установления каждого введения только на одну стандартную дозу.

Предпочтительно набор содержит инструкции, указывающих на применение лекарственной формы для достижения желаемого эффекта и на количество лекарственной формы, которое следует принимать на протяжении точно

определенного периода времени. Соответственно в одном варианте осуществления настоящего изобретения медицинская упаковка включает инструкции в отношении введения фармацевтической композиции. В частности, указанные инструкции могут включать инструкции, направляющие на введение указанной фармацевтической композиции или во время приема пищи, или предпочтительно за самое большее 45 минут до приема пищи, например, за самое большее 30 минут до приема пищи, например, за самое большее 25 минут до приема пищи, например, за самое большее 20 минут до приема пищи, например, за самое большее 15 минут до приема пищи, например, за самое большее 10 минут до приема пищи, например, за самое большее 5 минут до приема пищи.

Способ контролирования эффекта от лечения вариантом сплайсинга грелина и/или подобным варианту сплайсинга грелина соединением

Другой аспект относится к способу контролирования эффекта от введения усиливающего секрецию средства, такого как подобные варианту сплайсинга грелина соединения, раскрытые здесь, в способе настоящего описания, включающему определение одного или нескольких маркеров, в частности, маркеров, выбираемых из GH, IGF-1, IGFBP-3, ALP (с кислотной маркировкой), гормонов щитовидной железы, половых гормонов и альбумина; более предпочтительно выбираемых из IGF-1, IGFBP-3, ALP (с кислотной маркировкой); даже более предпочтительно IGF-1. Все эти маркеры являются низкими у пациентов с кахексией и, как ожидается, увеличатся после лечения вариантом сплайсинга грелина. Другими маркерами, которые, как ожидается, увеличатся после лечения вариантом сплайсинга грелина, являются уровень GH в крови и вес тела. Кроме того, ожидается изменение состава тела, и ожидается увеличение тощей массы тела. Изменения состава тела можно оценить с помощью использования магнитного резонанса (MRI) или ЯМР.

Таким образом, один вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу контролирования эффекта от любого из лечений индивидуума усиливающим секрецию средством, описанным здесь, включающему определение уровня в крови указанного индивидуума одного или более маркеров: выбираемых из (i) IGF-1 и/или (ii) IGFBP-3, и/или (iii) ALP; и/или (iv) одного или нескольких гормонов щитовидной железы, и/или (v) одного или нескольких половых гормонов; и/или (vi) альбумина, или предпочтительнее одного или более маркеров: (i) IGF-1 и/или (ii) IGFBP-3, и/или (iii) ALP; и/или (iv) GH, и/или (v) веса тела; и/или (vi) состава тела.

Способы определения уровня веществ в крови индивидуума хорошо известны в данной области техники. В качестве примера выделенный образец крови можно протестировать с помощью таких способов, как Вестерн-блоттинг или иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA).

ПРИМЕРЫ

Настоящее описание далее описывается в следующих примерах. Следует понимать, что эти примеры, хотя показывающие предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, приведены только ради иллюстрации. Из приведенного выше обсуждения и этих примеров квалифицированный в данной области техники специалист может установить предпочтительные особенности этого описания и, не отступая от его сущности и объема, может осуществить различные изменения и модификации для его адаптации к различным применениям и условиям.

Примеры 2, 5, 6, 7, 8 и 9 являются рабочими примерами. Примеры 1, 3, 4, 10 и 11

являются прогностическими примерами.

Пример 1

Анализы конкурентного связывания

5 Трансфицированные клетки COS-7 переносят в культуральные планшеты через день после трансфекции при плотности 1×10^5 клеток на лунку, с намерением получить на 5-8% связывание радиоактивного лиганда. Через два дня после трансфекции проводят эксперименты по конкурентному связыванию в течение 3 часов при 4°C с использованием 25 пМ [^{125} I]-грелина (GE Healthcare, Piscataway, NJ, США).
 10 Анализ связывания проводят в 0,5 мл 50 мМ буфера Hepes, pH 7,4, дополненного 1 мМ CaCl_2 , 5 мМ MgCl_2 и 0,1% (объем/вес) бычьего сывороточного альбумина, 40 мкг/мл бацитрацина. Неспецифическое связывание определяется как связывание в присутствии 1 микромоля немеченого варианта сплайсинга грелина. Клетки промывают дважды 0,5 мл охлажденного на льду буфера, и добавляют 0,5-1 мл
 15 буфера для лизиса (8 М мочевины, 2% NP40 в 3 М уксусной кислоте), и подчитывают связанную радиоактивность. Определения осуществляют дважды.

Пример 2

Синтетическая продукция подобного варианту сплайсинга грелина соединения

20 Производные аминокислот и реагенты для синтеза можно получить из коммерческих источников. Удлинение пептидной цепи можно выполнить с использованием синтезатора Applied Biosystem 433A, производимого Perkin Elmer, и смолу-производное защищенного пептида можно сконструировать с помощью Вос-или Fmoc-способа. Со смолы с защищенным пептидом, полученной с помощью Вос-способа, снимают защиту с помощью безводного фтористого водорода (HF) в присутствии пара-крезола, тем самым высвобождая пептид, который затем очищают. Со смолы с защищенным пептидом, полученной с помощью Fmoc-способа, снимают защиту с помощью трифторуксусной кислоты (TFA) или
 25 разбавленной TFA, содержащей различные акцепторы, и высвободившийся пептид очищают. Очистку проводят с помощью HPLC с обратной фазой на колонке C4 или C18. Чистоту очищенного продукта можно подтвердить с помощью HPLC с обратной фазой, а его структуру можно подтвердить с помощью анализа аминокислотного состава и масс-спектрометрии.

35 Раскрытые здесь пептиды можно получить общепринятым способом пептидного синтеза. В частности, синтез ацилированных или алкилированных пептидов приводится в качестве примера ниже.

Сокращения: «НМР-смола» означает 4-гидроксиметилфеноксиметил-смолу»;
 40 «амид Fmoc-смола» означает 4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)феноксиацетилометил-смолу; «РАМ-смола» означает фенилацетилометил-смолу; «НВТУ» означает 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат; «ТВТУ» означает 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония тетрафторборат; «НОВт» означает 1-
 45 гидроксibenзотриазол; «DCC» означает дициклогексилкарбодиимид; «DIPCI» означает диизопропилкарбодиимид; «TFA» означает трифторуксусную кислоту; «DIPEA» означает диизопропилэтиламин; «TIPS» означает триизопропилсилан; «Fmoc» означает флуоренилметоксикарбонил; «Woc» означает трет-
 50 бутилоксикарбонил; «Trt» означает тритил; «Bu» означает трет-бутил; «Pmc» означает 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил; «Prl» означает пропионил; «PhPrl» означает фенилпропионил; «Bzl» означает бензил; «Wom» означает бензилоксиметил; «Tos» означает толуолсульфонил; «Cl-Z» означает 2-хлор-

бензилоксикарбонил; «Pis» означает 2-фенилизопропил; «Mtt» означает 4-метилтритил; «DMF» означает N,N-диметилформамид; «NMP» означает N-метилпирролидон; «DMPA» означает 4-диметиламинопиридин; «HOSu» означает N-гидроксисукцинимид; «Adod» означает 2-аминододекановую кислоту; «Aib»
 5 означает 2-аминоизобутиловую кислоту; «Ape» означает 5-аминопентановую кислоту; «Cha» означает циклогексилаланин; «Dap» означает 2,3-диаминопропионовую кислоту; «Nal» означает нафтилаланин; «Nie» означает норлейцин.

10 В Fmoc-способе синтеза можно использовать следующие защищающие аминокислоты: Boc-Gly, Fmoc-Gly, Fmoc-Ser(Bu), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Glu(OBu), Fmoc-His(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Pro, Fmoc-Leu, Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-Phe, Fmoc-Phe, Fmoc-Ser(n-C₈H₁₇), Fmoc-Ser(n-C₈H₁₇), Fmoc-Cys(n-C₈H₁₇), Fmoc-Asp(OPis), Fmoc-Ser(Bzl), Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Dap(октаноил), Fmoc-2-Nal,
 15 Fmoc-2-Nal, Fmoc-Nle, Fmoc-Lys(Mtt), Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Asp(O-C₇H₁₅). В Boc-способе: Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Ser(Ac), Boc-Ser(Prl), Boc-Glu(OBzl), Boc-His(Bom), Boc-Gln, Boc-Arg(Tos), Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-Val, Boc-Phe, Boc-Cys(n-C₈H₁₇), Boc-Ape, Boc-Ser(n-C₈H₁₇).

20 Используемые единицы оборудования:

(а) Единица аналитической системы HPLC: система Shimadzu LC-10A; колонка: YMC PROTEIN-RP (4,6 мм × 150 мм); температура колонки: 40°C; элюент: линейный градиент от 0 до 50% ацетонитрила в течение 20 минут в 0,1% трифторуксусной
 25 кислоте; скорость потока: 1 мл/мин; детекция: УФ (210 нм); объем инъекции: 10-100 × 10⁻⁹ л.

(b) Единица препаративной системы HPLC: система Waters 600 Multisolvant Delivery; колонки: YMC-Pack-ODS-A (5×10⁻⁹ м, 20 мм × 250 мм), YMC-Pack-PROTEIN-RP (5×10⁻⁹ м, C4, 10 мм × 250 мм), YMC-Pack-PROTEIN-RP (5×10⁻⁹ м, C4, 20 мм × 250 мм),
 30 YMC-PROTEIN-RP (4,6 мм × 150 мм); элюент: подходящий линейный градиент концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте; скорость потока: 10 мл/мин (для колонок с внутренним диаметром 20 мм), 3 мл/мин (для колонок с внутренним диаметром 10 мм), 1 мл/мин (для колонок с внутренним диаметром 4,6
 35 мм); детекция: 210 нм, 260 нм; инъекции: 10-2000 × 10⁻⁹ л (2000×10⁻⁹ л или более вводилось через насос).

(с) Единица масс-спектрометра: Finnigan MAT TSQ700; источник ионов: ESI; способ детекции ионов: положительный разброс; напряжение: 4,5 кВ; капиллярная температура: 250°C; мобильная фаза: смесь 0,2% уксусной кислоты и метанола (1:1);
 40 скорость потока: 0,2 мл/мин; диапазон сканирования: m/z 300-1500.

(d) Единица для анализа аминокислотной последовательности: Applied Biosystem 477A, секвенсер модели 492, производимый Perkin Elmer.

(е) Единица для анализа аминокислотного состава: аминокислотный анализатор модели L-8500, производимый Hitachi, Co., Ltd.; образец: если не указано иное, образец подвергают гидролизу с помощью 6 М HCl при 110°C в течение 24 часов в
 45 запаянной пробирке.

Пример синтеза имеющего ацилсерин производного (Fmoc-способ, производные в виде С-концевых амидов) варианта сплайсинга грелина

50 GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPENQVRVQVRPPHKAHPFmoc-His(Pmc)-HMP-смола (403 мг, 0,25 ммоль, ABI Co., Ltd.) обрабатывают 20% пиперазином в течение 20 минут и повторно подвергают введению Fmoc-аминокислоты с помощью HBTU/HOBt и удалению Fmoc

с помощью пиперазина последовательно для конструирования Fmoc-Ser(Bu)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln-Val(Trt)-Arg(Pmc)-Pro-Pro-His(Boc)-Lys(Boc)-Ala(Boc)-Pro(Boc)-Pro-His(Pmc)-смолы. После введения, в конце концов, Boc-Gly с помощью DCC/HOBt получаемую в результате смолу с

5 защищенным пептидом (1,3 г) обрабатывают раствором 1% TFA-5% TIPS-метиленхлорид (15 мл) в течение 30 минут.

Пептид-смолу фильтруют, промывают несколько раз метиленхлоридом (30 мл) и промывают 5% DIEA (10 мл) и затем метиленхлоридом (30 мл). Получаемую в

10 результате de-Trt-пептид-смолу (приблизительно 1,3 г) подвергают разбуханию под действием NMP (10 мл), и к ней добавляют октановую кислоту (144,2 мг, 1,0 ммоль) и DIPCI (126,2 мг, 1,0 ммоль) в присутствии DMAP (61,1 мг, 0,5 ммоль) и делают возможным взаимодействие в течение 8 часов. Смолу извлекают фильтрацией и промывают NMP и затем метиленхлоридом, а затем сушат под вакуумом с

15 получением приблизительно 1,2 г смолы с защищенным пептидом, причем боковая цепь третьего серина является октаноилированной. К этому продукту добавляют реагент снятия защиты (10 мл), состоящий из 88% TFA - 5% фенола - 2% TIPS - 5% H₂O, и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов. Смолу

20 удаляют фильтрацией, и фильтрат концентрируют с последующим добавлением диэтилового эфира к получаемым в результате остаткам для образования преципитатов. Преципитаты извлекают фильтрацией и сушат с получением приблизительно 550 мг неочищенного пептида. 200 мг этого продукта растворяют в 10 мл воды и наносят на YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 мм × 250 мм) и подвергают

25 элюции линейным градиентом (скорость потока: 10 мл/мин) от 0 до 54% ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте в течение 60 минут. Желаемые фракции собирают и подвергают лиофилизации с получением приблизительно 120 мг желаемого продукта.

30 Пример синтеза имеющего ацилсерин производного (Fmoc-способ, соединения в виде С-концевых амидов) варианта сплайсинга грелина (1-22)-NH₂

GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPENQVRVQVRPPHKAPH-NH₂Fmoc-амид-смолу (403 мг, 0,25 ммоль, ABI Co., Ltd.) обрабатывают 20% пиперазином в течение 20 минут и повторно подвергают введению Fmoc-аминокислоты с помощью HBTU/HOBt и удалению Fmoc

35 с помощью пиперазина последовательно для конструирования Fmoc-Ser(Bu)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(Bu)-Pro-Glu(OBu)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln-Val(Trt)-Arg(Pmc)-Pro-Pro-His(Boc)-Lys(Boc)-Ala(Boc)-Pro(Boc)-Pro-His(Boc)-смолы. После введения, в конце концов, Boc-Gly с помощью DCC/HOBt получаемую в результате смолу с

40 защищенным пептидом (приблизительно 550 мг) обрабатывают раствором 1% TFA-5% TIPS-метиленхлорида (10 мл) в течение 30 минут. Пептид-смолу извлекают фильтрацией, промывают несколько раз метиленхлоридом (30 мл) и промывают 5% DIEA (10 мл) и затем метиленхлоридом (30 мл). Получаемую в результате de-Trt-пептид-смолу (приблизительно 750 мг) подвергают разбуханию с помощью NMP (10

45 мл), и к ней добавляют октановую кислоту (144,2 мг, 1,0 ммоль) и DIPCI (126,2 мг, 1,0 ммоль) в присутствии DMAP (61,1 мг, 0,5 ммоль) и делают возможным взаимодействие в течение 4 часов. Смолу извлекают фильтрацией и промывают NMP и затем метиленхлоридом, а затем сушат под вакуумом с получением

50 приблизительно 800 мг смолы с защищенным пептидом, причем боковая цепь третьего серина является октаноилированной. К этому продукту добавляют TFA (10 мл) и перемешивают при комнатной температуре в течение 30 минут. Смолу удаляют фильтрацией, и фильтрат затем концентрируют с последующим

добавлением диэтилового эфира к получаемым в результате остаткам для образования преципитатов. Преципитаты извлекают фильтрацией и сушат с получением приблизительно 250 мг неочищенного пептида. Приблизительно 200 мг этого продукта растворяют в 10 мл 30% водной уксусной кислоты и наносят на YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 мм × 250 мм) и подвергают элюции линейным градиентом (скорость потока: 10 мл/мин) от 0 до 54% ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте в течение 60 минут. Желаемые фракции собирают и подвергают лиофилизации с получением приблизительно 150 мг желаемого продукта.

Пример синтеза имеющего ацилсерин производного (Вос-способ) варианта сплайсинга [Ser3(пропионил)]-грелина (1-22)

Смолу с защищенным вариантом сплайсинга грелина (4-22) GSS(CO-CH₂CH₃)FLSPENQVRVQVRPPHKA_{PH} конструируют на Boc-His(Tos)-Pam-смоле (0,75 г, 0,5 ммоль) с помощью Вос-химии, и с половиной (1,4 г) смолы конденсируют Boc-Ser(CO-CH₂CH₃)-ОН, Boc-Ser(Bzl)-ОН и Boc-Gly-ОН. Получаемую в результате смолу, 1,5 г, затем обрабатывают смесью HF и пара-крезола (8,5 мл: 1,5 мл) при 0°C в течение 1 часа, и HF испаряют. К остаткам добавляют диэтиловый эфир, посредством чего получают 671 мг неочищенного пептида. Этот образец затем растворяют в 50% уксусной кислоте (AcOH) и наносят на препаративную колонку YMC-Pack-ODS-A (5×10⁻⁹ м, 20 мм × 250 мм) и подвергают элюции при скорости 10 мл/мин градиентом от 0 до 95% концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA в течение 75 минут. Содержащие желаемый продукт фракции подвергают лиофилизации с получением приблизительно 135,8 мг неочищенного пептида. Часть (0,5 мг) этого продукта наносят на колонку YMC-A-302 (C18, 4,6 мм × 150 мм) и подвергают элюции при скорости потока 1 мл/мин градиентом от 15 до 19% концентрации ацетонитрила. Этот процесс очистки затем повторяют, и желаемые фракции объединяют с получением приблизительно 0,41 мг желаемого продукта.

Другие соединения в соответствии с настоящим изобретением можно получить подобным образом.

Вышеуказанный способ использовали для синтеза ацилированных и неацилированных SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

Пример 3

Рандомизированное, четырехпериодное перекрестное испытание с использованием одного центра для исследования абсолютной биодоступности внутривенно вводимого варианта сплайсинга грелина и подкожно вводимого варианта сплайсинга грелина в трех различных однократных дозах здоровым субъектам

Цели

Первичные: исследовать абсолютную биодоступность трех различных доз варианта сплайсинга грелина, вводимых в виде однократных внутривенных и подкожных доз.

Вторичные:

- 1) исследовать степень дозовой пропорциональности (пропорциональность дозы) возрастающих доз,
- 2) исследовать и сравнить фармакодинамические профили между лечениями,
- 3) оценить безопасность и локальную переносимость.

Конструирование испытания: Рандомизированное, четырехпериодное перекрестное испытание несбалансированной блочной конструкции с использованием одного центра для исследования абсолютной биодоступности

внутривенно вводимого варианта сплайсинга грелина и подкожно вводимого варианта сплайсинга грелина в трех различных однократных дозах у здоровых субъектов. Для каждого пути введения будут использоваться три дозы: низкая, средняя и высокая. Для снижения числа дозирования каждому индивидууму и, следовательно, уменьшения продолжительности испытания каждый субъект будет только получать четыре дозы из общего количества, составляющего шесть доз, т.е. два уровня доз, вводимых как внутривенные и подкожные, соответственно.

Несбалансированная блочная конструкция будет гарантировать, что уровни всех трех доз будут обеспечены таким образом, хотя не все субъекты получают все уровни доз. Достаточный период вымывания будет включен между периодами дозирования индивидуума.

Конечные положения

Фармакокинетики варианта сплайсинга грелина: AUC_{0-t} , AUC , C_{max} , t_{max} , t , $C_{1/f}$, $V_{z/f}$, C_l , V_z , $t_{1/2}$

MRT-фармакодинамики: GH: AUC , C_{max} и t_{max} , минутный сердечный выброс, оценка голода, потребление пищи/поступление энергии, степень удовольствия, связанная с потреблением пищи, масса тела, расход энергии, DEXA.

Безопасность: Безопасность и локальную переносимость будут оценивать на протяжении исследования с помощью клинических оценок (физического исследования и признаков жизни), электрокардиографии и лабораторных тестов (гематологии и клинической биохимии).

Популяция для испытания и расчет силы: здоровые, являющиеся мужчинами субъекты возрастом 18-45 лет с показателем массы тела (BMI), составляющим 19-26 kg/m^2 (включающим в себя оба).

Первичной целью этого исследования является исследование абсолютной биодоступности варианта сплайсинга грелина, вводимого внутривенно и подкожно. Несбалансированная блочная конструкция будет использоваться для уменьшения периода времени испытания и уменьшения числа дозирования на субъект. Число субъектов, необходимых для проведения статического анализа абсолютной биодоступности на уровне дозы, а также анализа степени пропорциональности дозы между дозами, будет рассчитываться на основе существующих данных литературы.

Продукты испытания: вариант сплайсинга грелина для внутривенного и подкожного введения.

Пример 4

Функциональные тесты на рецептор грелина

Трансфекции и культуры тканей - клетки COS-7 выращивают в модифицированной Дульбекко среде Игла 1855, дополненной 10% фетальной сыворотки теленка, 2 мМ глутамином и 0,01 мг/мл гентамицина. Клетки трансфицируют с помощью способа преципитации кальция фосфатом с добавлением хлорохина, как ранее описывалось (Holst B. et al., Mol. Pharmacol. 53: 166-175 (1998)). Для экспериментов по дозированию гена используют различные количества ДНК. Количество кДНК (20 $mcg/75\text{ cm}^2$), приводящее к максимальной передаче сигнала, используют для кривых доза-ответ. Клетки HEK-293 выращивают в D-МЕМ, модифицированной Дульбекко среде Игла 31966 с высоким содержанием глюкозы, дополненной 10% фетальной сыворотки теленка, 2 мМ глутамином и 0,01 мг/мл гентамицина. Клетки трансфецируют LipofectamineTM 2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, Cal.).

Круговорот фосфатидилинозита: Через день после трансфекции клетки COS-7 инкубируют в течение 24 часов с 5 мкКи [3H]-миоинозита (GE Healthcare, Piscataway,

NJ) в 1 мл среды, дополненной 10% фетальной сыворотки теленка, 2 мМ глутамином и 0,01 мг/мл гентамицина, на лунку. Клетки дважды промывают буфером - 20 мМ HEPES, pH 7,4, дополненным 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, 10 мМ глюкозой, 0,05% (вес/объем) бычьей сыворотки, и инкубируют в 0,5 мл буфера, дополненного 10 мМ LiCl, при 37°C в течение 30 минут. После стимуляции различными концентрациями пептида в течение 45 минут при 37°C клетки экстрагируют 10% охлажденной на льду хлорной кислотой с последующей инкубацией на льду в течение 30 мин. Получаемые в результате супернатанты нейтрализуют KOH в буфере HEPES, и образуемый [3H]-инозитфосфат очищают на анионообменной смоле Bio-Rad AG 1-X8 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Cal.) в соответствии с инструкциями производителя. Определения проводят дважды.

Анализ репортеров CRE, SRE и NF-κB: Клетки HEK293 (30000 клеток/лунку), засеянные в 96-луночные планшеты, временно трансфецируют. В случае анализа репортера CRE клетки трансфецируют смесью pFA2-CREB и репортерной плазмиды pFR-Luc (PathDetect CREB tran-Reporting System, Stratagene, La Jolla, Cal.) или SRE-Luc (PathDetect SRE Cis-Reporting System, Stratagene, La Jolla, Cal.) и указанными количествами ДНК рецептора. После трансфекции клетки сохраняют в низкой сыворотке (2,5%) на протяжении экспериментов и обрабатывают соответствующим ингибитором внутриклеточных путей передачи сигнала. Через день после трансфекции клетки обрабатывают соответствующими лигандами в объеме анализа, составляющего 100 мкл среды, в течение 5 ч. Анализ завершают промывкой клеток дважды PBS и добавлением 100 мкл реагента для анализа Luciferase® (LucLite®, PerkinElmer, Inc., Wellesley, Mass). Люминесценцию измеряют в настольном счетчике (Top Count NETT, Packard Instrument Co., Meriden, Conn.) в течение 5 сек. Значения люминесценции приводят в относительных единицах света (RLU).

Анализ киназы MAP: Клетки COS 7 (плотность засеивания 150000 клеток/лунку) трансфицируют в планшетах для анализа. Через два дня после трансфекции указанную концентрацию лиганда добавляют в исследуемую среду без какой-либо сыворотки и инкубируют в течение 10 мин при 37°C. Реакцию останавливают с помощью удаления среды и двух стадий промывок охлажденным на льду PBS. Клетки лизируют в буфере для образца и разделяют с помощью электрофореза в 10% SDS-ПААГ в соответствии с Laemmli U.K., Nature 227: 680-85 (1970). Белки переносят на нитроцеллюлозу, и Вестерн-блоттинг проводят с использованием разведения 1:5000 мышинового моноклонального антитела против фосфо-ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Cal.). Общий белок ERK определяют с использованием разведения 1:10000 антитела против ERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Cal.). Блоты исследуют с помощью антимышиных вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, визуализируют с использованием хемилюминесцентного реагента (GE Healthcare, Piscataway, NJ) и подвергают количественной оценке с помощью денситометрического анализа. Фосфорилирование ERK1/2 нормализуют в соответствии с загрузкой белка путем выражения данных в виде отношения фосфо-ERK1/2 к общему ERK1/2. Результаты выражают в процентах величины, полученной в не стимулированных фиктивно трансфецированных клетках.

Пример 5

Эффективность подкожного введения ацилированного варианта сплайсинга грелина на увеличение веса и потребление пищи

Ацилированный вариант сплайсинга грелина (20 мкг (фиг. 1А и 1В) или 180 мкг (фиг. 2А и 2В)) или носитель (1,6% маннита) вводили один раз в день на протяжении 14 последовательных дней (фиг. 1А и 1В) или 7 последовательных дней (фиг. 2А и 2В) подкожно группам, включающим n=10 (фиг. 1А и 1В) или n=8 (фиг. 2А и 2В) самцам мышей 129Sv. На протяжении всего периода исследования летальность не встречалась ни у одного из животных. На протяжении всего периода исследования не наблюдались клинические признаки ни у одного из животных. Все животные подвергались конечному кровозвлечению, под анестезией CO₂, непосредственно перед эвтаназией. Конечный сбор крови проводили последовательно согласно номеру животного, а не согласно группе.

Биохимия: Для биохимического анализа кровь собирали в не покрытые заранее маркированные пробирки. Пробирки были заранее маркированы и содержали следующую информацию: номер исследования, номер группы, номер животного и дату. После свертывания кровь от каждого животного центрифугировали, и сыворотку собирали в две заранее маркированные пробирки и предоставляли для анализа следующим образом: сыворотку, 250 мкл, держали при 2-8°C до анализа. Образцы подвергали следующим перечисленным тестированиям, используя систему Hitachi 917, на: креатинин, общий билирубин, глюкозу, триглицериды, холестерин, HDL, LDL, общий белок, глобулин, альбумин, мочевины, калий, фосфор, кальций, натрий, хлорид, sGOT, sGPT, ALP.

Анализ мочи: Мочу собирали в заранее маркированные пробирки (как выше) от всех животных (если возможно) до и/или после эвтаназии. Для всех выживающих животных сбор мочи проводили последовательно согласно номеру животного, а не согласно группе. Предпринималась попытка получить максимально возможное количество для проведения перечисленных ниже тестирований. Анализ мочи проводили, используя коммерческий зонд для тестирования (Bayer, Multistix®, 10SG), применяемый к образцу мочи, и оценивая следующие параметры: глюкозу, кетон, величину pH, лейкоциты, кровь, плотность, нитрит, билирубин, уробилиноген и белок.

Процедуры аутопсии и макроскопическое исследование: Всех животных подвергали полной детальной аутопсии. Для всех выживающих животных аутопсии проводили последовательно согласно номеру животного, а не согласно группе, непосредственно после запланированного конечного кровозвлечения. При аутопсии проводят тщательное исследование, и любую аномальность или большие патологические изменения в тканях и/или органах замечали и протоколировали.

Сбор органов/тканей: Следующие органы и ткани: головной мозг, печень, почку, желудок, поджелудочную железу, легкие, селезенку, сердце, эпидидимальный WAT, ретроперитонеальный WAT, интеркапсулярный BAT - удаляли и определяли вес как можно быстрее после иссечения и удаления прикрепленного жира и других соединительных тканей. Все органы от одного животного собирали в один контейнер, заранее снабженный следующей информацией: номер исследования, номер группы, номер животного и дата.

Оценка состава тела: В первый и последний день лечения использовали ЯМР для анализа изменений или жировой, или тощей массы тела (фиг. 4).

Результаты: кумулятивное увеличение веса тела у мышей 129Sv, подвергнутых лечению ацилированным вариантом сплайсинга грелина, было значительно выше ($p=6E^{-0.5}$), чем у контролей, обработанных носителем (2,2 г и 0,7 г, соответственно). См. фиг. 1А. Кумулятивное потребление пищи мышами 129Sv, подвергнутыми

лечению ацилированным вариантом сплайсинга грелина, было значительно выше ($p=0,04$), чем контролями, обработанными носителем (53,2 г и 47,21 г, соответственно). Смотри фиг. 1В. На протяжении всего периода исследования не отмечались события смертности и данные относительно очевидных клинических признаков при ответе на лечение среди любых проверяемых животных. На основе вышеуказанных результатов исследования ацилированный вариант сплайсинга грелина человека значительно активизирует увеличение веса тела и потребление пищи.

Пример 6

Эффективность подкожного введения ацилированного варианта сплайсинга грелина на высвобождение GH

Ацилированные варианты сплайсинга грелина (20 мкг) или носитель (1,6% маннита) вводили с помощью подкожной болюсной инъекции (соответствующей 0,3 мкмоль/кг) каждой из 5 мышей. Образцы крови отбирали через 10 и 20 минут после инъекции. Образцы сыворотки хранили при -70°C и анализировали с использованием набора для ELISA гормона роста крыс/мышей DSL-10-72100 ACTIVE® (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas).

Результаты: Концентрация гормона роста в сыворотке через 10 минут после подкожного введения ацилированного варианта сплайсинга грелина или носителя была в 2-14-раз выше в группе, подвергнутой лечению вариантом сплайсинга грелина, по сравнению с группой, обработанной носителем (смотри фиг. 3).

Пример 7

Фармакокинетики локатора ацилированного варианта сплайсинга грелина в крысе

Подкожное введение вариантов сплайсинга грелина осуществляли на трех уровнях доз, составляющих 0,5, 2,5 и 10 мг/кг, соответствующих концентрациям 0,1, 0,5 и 2 мг/мл, соответственно, и при постоянной объемной дозе 0,5 мл/кг. Внутривенное введение осуществляли на одном уровне дозы, составляющем 0,5 мг/кг, соответствующем концентрации 0,1 мг/мл, и при постоянной объемной дозе 0,5 мл/кг. Исследование включало 9 самцов и 9 самок крыс Sprague-Dawley™ (SD™) на каждый уровень дозы и путь введения.

План взятия образцов крови был ограничен 9 моментами времени кровоизвлечения для каждого уровня дозы: до введения дозы, 5, 15, 30, 60 и 90 мин, 3, 5 и 24 часа после введения дозы. Каждую группу делили на 3 подгруппы, при этом каждой подгруппе назначалось 3 конкретных момента времени кровоизвлечения для получения образцов 3 индивидуумов/момент времени/группу (всего 27 индивидуальных образцов/группу). Средние значения веса тела в группе в начале исследования были схожими среди всех групп и не превышали $\pm 20\%$ среднего веса для каждого анатомического пола. Образцы цельной крови держали на льду от момента сбора крови до момента центрифугирования. Полученные образцы плазмы быстро замораживали в жидком азоте и держали в сухом льду до перемещения на -70°C .

Концентрации определяемого элемента в плазме определяли с помощью LC/MS/MS (жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии/масс-спектрометрии). Фармакокинетический анализ варианта сплайсинга грелина был основан на профилях средняя концентрация в плазме - время для каждой группы доз, полученных с помощью нераздробленного фармакокинетического анализа, полученных с помощью использования компьютерного программного обеспечения «PK Solutions 2.0» (Summit Research Services, CO, США).

Фармакокинетический анализ для подкожного пути показал, что значения

$AUC_{0-\infty}$ были схожи для самцов и самок, которым вводили низкую дозу (6,1 и 5,2 мкг · мин/мл, соответственно) и среднюю дозу (18,8 и 20,8 мкг · мин/мл, соответственно). При высокой дозе значения AUC у самок были значительно ниже (49,1 мкг · мин/мл), чем у самцов (79,2 мкг · мин/мл). T_{max} наступало через 5 минут после введения дозы для всех групп доз. Значения $T_{1/2}$ находились в диапазоне от 17,4 до 26,4 минут для самцов крыс и от 10,7 до 28,9 минут для самок крыс.

Пример 8

Эффект однократного экстренного подкожного введения ацилированного варианта сплайсинга грелина на токсичность у крыс

Ацилированный вариант сплайсинга грелина (2,5; 15 и 75 мкг) или носитель (солевой раствор) вводили один раз подкожно группам, включающим $n=6$ крысам Sprague-DawleyTM (SDTM). На протяжении всего периода исследования летальность не встречалась ни у одного из животных. На протяжении всего периода исследования не наблюдались клинические признаки ни у одного из животных. Все животные подвергались конечному кровозвлечению, под анестезией CO_2 , непосредственно перед эвтаназией.

Клинические признаки:

Животных наблюдали индивидуально после введения дозы по крайней мере один раз на протяжении первых 30 минут, периодически во время первых 24 часов, при этом специальное внимание уделялось во время первых 4 часов, и клинические признаки протоколировали. Впоследствии животных обследовали, и клинические признаки протоколировали один раз в день на протяжении в целом 14 дней. Наблюдения включали изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, возникновение секретов и экскреций (например, диареи) и активность вегетативной нервной системы (например, лакримацию, слюноотделение, пилоэрекцию, размер зрачков, необычный характер дыхания). Также включались изменения походки, позы и ответ на манипулирование, а также наличие аномального поведения, тремора, конвульсий, сна и комы.

Вес тела:

Определение веса тела индивидуумов осуществляли незадолго до введения варианта сплайсинга грелина (день 0), через 2, 7 и 14 дней после введения дозы. Измерения веса неподвижного тела осуществляли прямо перед аутопсией.

Клиническая патология:

Гематологические, биохимические параметры и показатели коагуляции, перечисленные ниже, определяли у всех выживающих животных до запланированной эвтаназии.

Гематология: Образцы крови получали после лишения пищи в течение ночи. Образцы крови (по крайней мере 500 мкл цельной крови) собирали в заранее маркированные, покрытые EDTA пробирки, содержащие следующую информацию: номер исследования, номер группы, номер животного и дату. Образцы держали до анализа при 2-8°C. Гематологическими параметрами, которые определяют, используя гематологическую систему ADVIA 120 (Bayer), являются количество лейкоцитов (WBC), количество эритроцитов (RBC), гемоглобин (HGB), гематокритное число (HCT), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина (MCH), средняя концентрация корпскулярного гемоглобина (MCHC), тромбоциты, лейкоцитарная формула. Ретикулоциты подсчитывали вручную.

Биохимия: Для биохимического анализа кровь собирали в не покрытые заранее маркированные пробирки. Пробирки были заранее маркированы и содержали

следующую информацию: номер исследования, номер группы, номер животного и дату. После свертывания кровь от каждого животного центрифугировали, и 300 мкл сыворотки собирали в две заранее маркированные пробирки и предоставляли для анализа, все время держа при 2-8°C до анализа. Образцы подвергали следующим

5 перечисленным тестированиям, используя систему HITACHI MODULAR P-800, на: креатинин, кальций, глюкозу, холестерин, общий белок, глобулин, LDH, калий, аспартат, аминотрансферазу (AST), креатинфосфокиназу (СРК), фосфор, мочевины, альбумин, общий билирубин, аланин, аминотрансферазу (ALT), натрий, γ-

10 глутамилтранспептидазу (GGT), хлорид, триглицериды, липопротеин высокой плотности (HDL), липопротеин низкой плотности (LDL), щелочную фосфатазу (ALP).

Показатели коагуляции: Для анализа коагуляции кровь собирали с помощью кровоизвлечения сзади глазничной впадины под анестезией CO₂ в покрытые

15 тринатрия цитратом пробирки. По окончании сбора крови все образцы крови и сыворотки держали при 2-8°C до дальнейшего анализа. Используя систему Sysmex SA-1500, образцы подвергали следующим перечисленным тестированиям на: протромбиновое время (PT), АРТТ.

Анализ мочи:

20 Индивидуальные образцы опорожненной мочи собирали от всех животных (если возможно) до запланированного окончания исследования или до умерщвления в случае удаления из исследования по причинам состояния животного, или путем надавливания на абдоминальную область над мочевым пузырем, или сбора

25 опорожненной мочи, в противном случае, непосредственно из мочевого пузыря с помощью прокола мочевого пузыря. Анализ проводили, используя коммерческий набор для тестирования (Bayer, Multistix®, 10 SG), применяемый к образцу опорожненной мочи, и оценивая следующие параметры: глюкозу, кетон, величину рН, лейкоциты, кровь, плотность, нитрит, билирубин, уробилиноген и белок.

30 Процедуры аутопсии и макроскопическое исследование: Всех животных подвергали полной аутопсии после запланированной эвтаназии. При аутопсии всех животных подвергали тщательному исследованию, в том числе внешнюю поверхность тела, все проходы, черепную, грудную и брюшную полости и их содержимое. Отмечали и протоколировали любую аномальность или большие

35 патологические изменения в тканях и/или органах. Отмечали, происходит ли большое патологическое отклонение на внешней поверхности тела, которая находится в месте инъекции или около него. В 4% растворе формальдегида сохраняли следующие ткани и/или органы, в том числе ткани и/или органы с макроскопическими изменениями: надпочечники, грудную аорту, головной мозг, слепую кишку, ободочную кишку, двенадцатиперстную кишку, придаток яичка, глаза, слюнные железы, являющиеся добавлением к слезным железам, сердце, тазобедренный и коленный сустав, подвздошную кишку, тощую кишку, почки, слезные железы, печень, легкие, лимфатические узлы - поверхностные цервикальные,

45 лимфатические узлы - мезентериальные, молочную железу + кожу, пищевод, зрительные нервы, яичники, поджелудочную железу, гипофиз, предстательную железу, прямую кишку, слюнные железы, седалищный нерв, семенные пузырьки, скелетную мышцу (бедро), кожу в месте инъекции, селезенку, спинной мозг

50 (цервикальный, торакальный, поясничный), грудину (костный мозг), желудок, яички, тимус, щитовидную железу (с парашитовидной железой, если применимо), язык, трахею, мочевой пузырь, матку с шейкой матки, влагалище.

Взвешивание органов/тканей и фиксация органов/тканей:

Для всех животных проводили взвешивание и фиксацию органов/тканей. Вес во влажном состоянии перечисленных выше органов/тканей определяли как можно быстрее после рассечения и удаления прикрепленных жировой и соединительной тканей (в случае парных органов определяли индивидуальный вес, но его представляли как средний вес органа). Все органы/ткани затем фиксировали и сохраняли в 4% растворе формальдегида (за исключением глаз, зрительных нервов и сальных желез, являющихся добавлением к слезным железам, которые фиксировали в растворе Давидсона) в течение по крайней мере периода фиксации в течение 48 ч до доставки тканей. Кроме того, любые другие органы/ткани с большими макроскопическими изменениями сохраняли также в 4% растворе формальдегида. Органы/ткани каждого животного упаковывали в пластиковые контейнеры, каждый из которых был маркирован номером исследования, номером группы, номером животного и датой аутопсии. Костный мозг получали из одной бедренной кости, увлажняли фетальной бычьей сывороткой для того, чтобы сделать возможным соответствующий мазок, и делали мазки на чистое и маркированное предметное стекло с помощью использования второго предметного стекла. Впоследствии предметные стекла оставляли на открытом воздухе для высыхания и погружали в метанол на приблизительно 5 минут для соответствующей фиксации. Готовили по крайней мере 2 предметных стекла/животное.

Результаты: На протяжении всего периода исследования не отмечались события смертности и данные относительно очевидных клинических признаков при ответе на лечение среди любых проверяемых животных.

Пример 9

Эффект однократного экстренного подкожного введения ацилированного варианта сплайсинга грелина на токсичность и токсикокинетику у мини-свиней

В целях установления максимальной переносимой дозы (MTD), представляющей собой наибольшую дозу, не вызывающую неприемлемой токсичности, или максимальной допустимой дозы (MFP) 2 минисвиньям Siwine/HsdScr:Sinclair группы предварительного испытания вводят увеличивающиеся дозы вплоть до максимума, составляющего 75 мг/кг ацилированного варианта сплайсинга грелина. На основе эффектов, наблюдаемых в предварительном испытании, наибольшую однократную дозу соответствующим образом выбирают и вводят животным основного исследования подкожно группам, включающим n=2 минисвиньи. В 1 день (день введения дозы) собирают образцы крови для биоаналитических анализов в общем 9 моментах времени: «0» - базовая линия предварительного испытания, через 5, 15, 30, 60, 90 мин, 3, 5 и 24 часа после введения дозы. Получают оценку данных стандартных РК-параметров (C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$, AUC). Минисвиней в дальнейшем наблюдают в течение дополнительного 14-дневного периода наблюдения.

Были получены все фармакокинетические параметры, и на протяжении всего периода исследования летальность не встречалась ни у одного из животных. На протяжении всего периода исследования не наблюдались клинические признаки ни у одного из животных. Все животные подвергались конечному крововыведению, под анестезией CO₂, непосредственно перед эвтаназией.

Клинические признаки:

Животных наблюдают индивидуально после введения дозы по крайней мере один раз на протяжении первых 30 минут, периодически во время первых 24 часов, при этом специальное внимание уделяется во время первых 4 часов, и клинические признаки протоколируют. Впоследствии животных обследуют, и клинические

признаки протоколируют один раз в день на протяжении в целом 14 дней.

Наблюдения включают изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, возникновение секретов и экскреций (например, диареи) и активность вегетативной нервной системы (например, лакримацию, слюноотделение, пилоэрекцию, размер зрачков, необычный характер дыхания). Также включают изменения походки, позы и ответ на манипулирование, а также наличие аномального поведения, тремора, конвульсий, сна и комы.

Вес тела:

Определение индивидуального веса тела животных осуществляют незадолго до введения проверяемого элемента (день 0), через 2, 7 и 14 дней после введения дозы. Измерения веса неподвижного тела осуществляют прямо перед аутопсией. В случае умерших животных вес тела измеряют как можно ближе к смерти.

Клиническая патология:

Гематологические, биохимические параметры и показатели коагуляции, перечисленные ниже, определяют у всех выживающих животных до запланированной эвтаназии.

Гематология: Образцы крови получают после лишения пищи в течение ночи.

Образцы крови (по крайней мере 500 мкл цельной крови) собирают в заранее маркированные, покрытые EDTA пробирки, содержащие следующую информацию: номер исследования, номер группы, номер животного и дату. Образцы держат до доставки и анализа при 2-8°C. Гематологическими параметрами, которые определяют, используя гематологическую систему ADVIA 120 (Bayer), являются количество лейкоцитов (WBC), количество эритроцитов (RBC), гемоглобин (HGB), гематокритное число (HCT), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина (MCH), средняя концентрация корпускулярного гемоглобина (MCHC), тромбоциты, лейкоцитарная формула. Ретикулоциты подсчитывали вручную.

Биохимия: Для биохимического анализа кровь собирают в не покрытые заранее маркированные пробирки. Пробирки заранее маркируют и содержат следующую информацию: номер исследования, номер группы, номер животного и дату. После свертывания кровь от каждого животного центрифугируют, и по крайней мере 300 мкл сыворотки собирают в две заранее маркированные пробирки и предоставляют для анализа, все время держа при 2-8°C до анализа. Образцы подвергают следующим перечисленным тестированиям, используя систему HITACHI MODULAR P-800, на: креатинин, кальций, глюкозу, холестерин, общий белок, глобулин, LDH, калий, аспартат, аминотрансферазу (AST), креатинфосфокиназу (CPK), фосфор, мочевины, альбумин, общий билирубин, аланин, аминотрансферазу (ALT), натрий, γ -глутамилтранспептидазу (GGT), хлорид, триглицериды, липопротеин высокой плотности (HDL), липопротеин низкой плотности (LDL), щелочную фосфатазу (ALP).

Показатели коагуляции: Для анализа коагуляции кровь собирают помощью кровоизвлечения сзади глазничной впадины под анестезией CO₂ в покрытые тринатрия цитратом пробирки. По окончании сбора крови все образцы крови и сыворотки держат при 2-8°C до дальнейшего анализа. Используя систему Sysmex CA-1500, образцы подвергают следующим перечисленным тестированиям на: протромбиновое время (PT), АРТТ.

Анализ мочи: Индивидуальные образцы опорожненной мочи собирают от всех животных (если возможно) до запланированного окончания исследования или до умерщвления в случае удаления из исследования по причинам состояния животного, или путем надавливания на абдоминальную область над мочевым пузырем, или

сбора опорожненной мочи, в противном случае, непосредственно из мочевого пузыря с помощью прокола мочевого пузыря. Анализ проводят, используя коммерческий набор для тестирования (Bayer, Multistix®, 10 SG), применяемый к образцу опорожненной мочи, и оценивая следующие параметры: глюкозу, кетон, величину рН, лейкоциты, кровь, плотность, нитрит, билирубин, уробилиноген и белок.

Процедуры аутопсии и макроскопическое исследование:

Всех животных подвергают полной аутопсии после запланированной эвтаназии.

При аутопсии всех животных подвергают тщательному исследованию, в том числе внешнюю поверхность тела, все проходы, черепную, грудную и брюшную полости и их содержимое. Отмечают и протоколируют любую аномальность или большие патологические изменения в тканях и/или органах. Отмечают, происходит ли большое патологическое отклонение на внешней поверхности тела, которая находится в месте инъекции или около него. В 4% растворе формальдегида сохраняют следующие ткани и/или органы, в том числе ткани и/или органы с макроскопическими изменениями: надпочечники, грудную аорту, головной мозг, слепую кишку, ободочную кишку, двенадцатиперстную кишку, придаток яичка, глаза, слюнные железы, являющиеся добавлением к слезным железам, сердце, тазобедренный и коленный сустав, подвздошную кишку, тощую кишку, почки, слезные железы, печень, легкие, лимфатические узлы - поверхностные цервикальные, лимфатические узлы - мезентериальные, молочную железу + кожу, пищевод, зрительные нервы, яичники, поджелудочную железу, гипофиз, предстательную железу, прямую кишку, слюнные железы, седалищный нерв, семенные пузырьки, скелетную мышцу (бедро), кожу в месте инъекции, селезенку, спинной мозг (цервикальный, торакальный, поясничный), грудину (костный мозг), желудок, яички, тимус, щитовидную железу (с паращитовидной железой, если применимо), язык, трахею, мочевой пузырь, матку с шейкой матки, влагалище.

Взвешивание органов/тканей и фиксация органов/тканей:

Для всех животных проводят взвешивание и фиксацию органов/тканей. Вес во влажном состоянии перечисленных выше органов/тканей определяют как можно быстрее после рассечения и удаления прикрепленных жировой и соединительной тканей (в случае парных органов определяют индивидуальный вес, но его представляют как средний вес органа). Все органы/ткани затем фиксируют и сохраняют в 4% растворе формальдегида (за исключением глаз, зрительных нервов и слюнных желез, являющихся добавлением к слезным железам, которые фиксируют в растворе Давидсона) в течение по крайней мере периода фиксации в течение 48 ч до доставки тканей. Кроме того, любые другие органы/ткани с большими макроскопическими изменениями сохраняют также в 4% растворе формальдегида. Органы/ткани каждого животного упаковывают в пластиковые контейнеры, каждый из которых маркируют номером исследования, номером группы, номером животного и датой аутопсии. Костный мозг получают из одной бедренной кости, увлажняют фетальной бычьей сывороткой для того, чтобы сделать возможным соответствующий мазок, и делают мазки на чистое и маркированное предметное стекло с помощью использования второго предметного стекла. Впоследствии предметные стекла оставляют на открытом воздухе для высыхания и погружают в метанол на приблизительно 5 минут для соответствующей фиксации. Готовят по крайней мере 2 предметных стекла/животное.

Результаты: На протяжении всего периода исследования не отмечались события

смертности и данные относительно очевидных клинических признаков при ответе на лечение среди любых проверяемых животных.

Пример 10

Пример повторного на протяжении 7, 10, 28 дней или 3, 6, 9 месяцев подкожного введения дозы ацилированного варианта сплайсинга грелина крысам/собакам/мини-свиньям

Ацилированный вариант сплайсинга грелина в различных дозах (0,2, 1,0 и 5 мкмоль/кг, все в 100 мкл носителя) или носитель (в солевом растворе) вводят один раз в день на протяжении различного числа последовательных дней (7, 10, 28 дней или 3, 6, 9 месяцев) подкожно группам, включающим =10 субъектов, являющихся крысами или биглами, или людьми, с кахексией. На протяжении 20 ч после инъекции определяют потребление пищи, увеличение веса и самопроизвольную двигательную активность.

Пример 11

Примеры оценки с помощью дневников/анкет качества жизни пациентов

EORTC QLQ-C30 (Aaronson et al., J. Natl. Cancer Inst. 85: 365-76 (1993)), смотри сайт National Institutes of Health и смотри, например, образец EORTC QLQ-C30 (версии 3.0), доступный на сайте EORTC и включенный сюда посредством ссылки.

Авторов настоящего изобретения интересует информация, касающаяся Вас и Вашего здоровья. Пожалуйста, ответьте на следующие вопросы, отмечая число, которое лучше всего применимо к Вам. Не существует «правильных» или «неправильных» ответов. Вся информация будет обрабатываться конфиденциально.

Вопросы: Смотри образец EORTC QLQ-C30 (версии 3.0), доступный на сайте EORTC и включенный сюда посредством ссылки.

Пример 12

Примеры подходящих составов для приготовления фармацевтических композиций, используемых в настоящем описании

4% раствор маннита готовят растворением D-маннита в воде для инъекции с достижением конечной концентрации, составляющей 40 мг/мл. Маточный раствор варианта сплайсинга грелина готовят растворением варианта сплайсинга грелина в соли TFA или в ацетате (5 мг) в 10 мл 4% раствора маннита, делят на аликвоты и хранят замороженным (-70°C) до момента использования.

Раствор для дозирования варианта сплайсинга грелина: В каждый день введения дозы требуемое количество каждого проверяемого элемента оттаивают и разводят физиологическим раствором до концентрации, составляющей 0,2 мг/мл.

Раствор для дозирования контрольного элемента: Готовят в каждый день введения дозы путем разведения 4% раствора маннита физиологическим раствором в той же пропорции, что и раствор для дозирования варианта сплайсинга грелина.

Пациенты: Пациенты с документированной раковой кахексией и документированной раковой кахексией со значительной потерей веса в предшествующем периоде и уменьшенным аппетитом. Кахексия может быть вызвана любым типом рака, в том числе, например, пищевода, легкого, груди, желудка, поджелудочной железы, нервной системы и мочевых путей, кости, гематологическим раком, раком половых путей, железы внешней секреции, железы внутренней секреции, множественными эндокринологическими неоплазмами, раком яичка, предстательной железы, неврологическим раком, раком кожи, щитовидной железы, печени и ободочной кишки.

Эффективность действия варианта сплайсинга грелина будет оцениваться в

соответствии с клиническими оценками:

(1) Экстренное потребление пищи: Оцениваемое специалистом в области диетотерапии потребление пищи во время инфузии.

(2) Постоянное потребление пищи: Ежедневное сообщение о количестве пищи, потребленной в течение дня, и оценка удовольствия, связанного с потреблением пищи. Правильность этого будет подтверждаться экскрецией азота в моче, на основе дневника, касающегося питания на протяжении 4 дней.

(3) Вес тела: Стандартная и градуированная шкала будет использоваться в клинике.

(4) Расход энергии покоя (REE) является очень важным показателем, поскольку на него оказывает влияние и состояние заболевания, и размер тела.

(5) Тест на физическую нагрузку: Регистратор активности используется в соответствии со стандартным протоколом, описанным на сайте регистратора активности.

(6) Связанное с состоянием здоровья QOL с использованием стандартных форм, как описано выше.

(7) Параклинические оценки:

(i) Экскреция азота в моче: Сбор мочи на протяжении 24 ч должен использоваться в качестве подтверждения сообщаемого потребления пищи.

(ii) Глюкоза в плазме, FFA в плазме, триглицериды в плазме, глицерин в плазме и аминокислоты в плазме: Вещества в плазме, измеряемые для гарантии то, что сообщаемое потребление пищи находится в соответствии с поглощенным количеством принятой пищи.

(iii) Тощая масса тела и жировая масса, оцениваемые по толщине TSF и средней длине окружности руки, в качестве показателя состава тела.

(iv) Жир всего тела (и жировая неуравновешенная масса) будут оцениваться сканированием DEXA, используя программное обеспечение 1.31 для Lunar DPX-L (Scanexport Medical Helsingborg, Швеция).

(v) Лептин в плазме: Лептин продуцируется жировой клеткой и секретируется из нее. Уровень лептина в плазме предоставляет оценку общей жировой нагрузки клетки.

(vi) Грелин в плазме: Уровень основного грелина имеет тенденцию к увеличению у пациентов с кахексией.

(vii) GH в плазме: В предшествующих исследованиях GH измеряли в качестве контроля эффекта введения грелина (Enomoto M. et al., Clin. Sci. (Lond). 105: 431-35 (2003)).

(viii) IGF-1: Одно определение IGF-I подводит итог секреции GH на протяжении 24 ч. На здоровых добровольцах продемонстрировано, что уровни циркулирующих IGF-I коррелируют со спонтанной секрецией GH (Rose S.R. et al., N. Engl. J. Med. 319: 201-07 (1988). IGF-I может также увеличиваться независимо от увеличения GH с помощью улучшения состояния питания.

(ix) IGFBP-3: Один из белков-носителей для IGF-I. Он увеличивается параллельно IGF-I, но с меньшей скоростью ответа.

(x) Альбумин: является индикатором состояния питания.

(xi) Преальбумин: индикатор состояния питания, с более быстрым ответом на изменения, чем альбумин.

(xii) Кортизол: Показано, что введение грелина увеличивает уровень кортизола в сыворотке (Broglia F. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 1537-42 (2003)). Показано, что

кортикостероиды оказывают значительный противорвотный эффект и уменьшают астению и увеличивают снятие боли, что может быть благоприятно для раковых пациентов с кахексией. Однако никогда не было показано, что кортикозол увеличивает вес у раковых пациентов с кахексией.

(xiii) CRP и ESR: Белки острой фазы и ESR часто являются хорошими индикаторами системного воспаления, связанного с раковым процессом (Inui A., CA Cancer J. Clin. 52: 72-91 (2002)).

Пример 13

Лечение пациентов со связанной с раком анорексией/кахексией

Пациентам с запущенным раком, страдающим синдромом анорексии/кахексии (ACS), таким как пациенты с любым типом ухудшений, неизлечимого рака, как полагают, поможет настоящее описание в отношении улучшения качества жизни, увеличения аппетита, увеличения потребления пищи, сохранения или увеличения веса, удовольствия от пищи и или жирового отложения.

Пациенты будут получать подкожное введение 10 мкг/кг дозы варианта сплайсинга грелина и плацебо. Протокол будет начинаться в 08.00 после ночного голодания. В находящуюся спереди от локтевого сустава вену будет вставлен катетер размером 22 для отбора проб крови. После периода установления равновесия, составляющего 30 мин, подкожно будет вводиться вариант сплайсинга грелина (10 мкг/кг) или плацебо (0,9% солевого раствора).

Проходящее клиническое испытание лечение: Вариант сплайсинга грелина будет доступен GMP-качества в приготовленных ампулах 10 мкг/кг от BACHEM AG, Швейцария или NeoMPS Inc., США. Плацебо состоит из нормального солевого раствора (или носителя, используемого для растворения исследуемого вещества), который будет предоставляться больничной аптекой. Вариант сплайсинга грелина растворяют в солевом растворе, и дозу 10 мкг/кг варианта сплайсинга грелина будут вводить пациенту.

Оценки эффективности:

(1) Связанные с потреблением пищи симптомы: оценивающиеся с использованием адаптированной версии анкеты «Функциональная оценка терапии аппетита и кахексии» (FAACT); касающейся анорексии/кахексии анкеты EORTC-QLQ-30 (смотри, например, образец EORTC QLQ-C30 (версии 3.0), доступный на сайте EORTC и включенный сюда посредством ссылки); касающейся анорексии/кахексии анкеты NCCTG (смотри сайт National Institutes of Health) и/или шкалы оценки симптома Эдмонта (смотри Bruera E. et al., J. Palliat. Care 7: 6-9 (1991)).

(2) Качество жизни: будет оцениваться с использованием анкеты EORTC-QLQ-C30 (смотри пример 9).

(3) Потребление пищи и предпочтение пищевым продуктам: определение потребления пищи будет осуществляться расчетом в процентах пищевых продуктов, потребленных пациентом при каждом приеме пищи, специалист клиники в области диетотерапии будет оценивать предпочтения пищевым продуктам в виде части их обычных оценок.

(4) Удовольствие от пищи: будет оцениваться после второго завтрака с использованием визуальной аналоговой шкалы, следуя установленным привязкам.

(5) Воспринимаемый аппетит, голод, тошноту и насыщение: будут оценивать утром, до инфузии и до и после второго завтрака с использованием визуальной аналоговой шкалы, следуя установленным привязкам. Заявитель будет также использовать укороченную анкету, специально подобранную для вкусовых

ощущений.

(6) Гормон роста (GH): поскольку GH отражает напрямую биологическую функцию грелина, при этом после инъекций грелина GH быстро увеличивается, заявитель будет также контролировать уровни GH в те же моменты времени, что и грелин. Будет использоваться стандартный анализ грелина.

(7) Состав тела: составы тела будут оцениваться с помощью BMI, анализа биосопротивления и измерения поглощения двух фотонов/измерения поглощения рентгеновских лучей с двумя энергиями (DEXA).

(8) Уровни альбумина и трансферрина будут определяться в качестве параметров состояния питания.

(9) Сердечно-сосудистая вегетативная функция: для скринирования вегетативных нарушений будет записываться 20-минутная электрокимограмма Холтера и определяться значение SDNN.

(10) Медиаторы синдрома первичной анорексии/кахексии: медиаторы провоспалительной реакции (CRP, IL-6, TNF- α), активированного метаболизма (свободные жирные кислоты, триглицериды, инсулин, глюкоза, лептин), оси кишечника-головной мозг (грелин) и соматотропной оси (IGF-1, свободный тестостерон) будут определяться в виде базовой линии в первую неделю. Образец мочи будет резервировать для оценки индуцирующего протеолиз фактора (PIF), медиатора синдрома паранеопластической анорексии/кахексии.

Формула изобретения

1. Подобное варианту сплайсинга грелина соединение, активирующее увеличение веса тела и потребление пищи и/или стимулирующее высвобождение гормона роста, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, и которое может быть необязательно модифицировано химически активной группой, не изменяющей биологической функции указанного соединения.

2. Подобное варианту сплайсинга грелина соединение по п.1, где вторая или третья аминокислота соединения модифицирована октаноильной группой.

3. Подобное варианту сплайсинга грелина соединение по п.1 или 2, где соединение модифицировано химически активной группой.

4. Применение подобного варианту сплайсинга грелина соединения для производства лекарственного средства для лечения или предупреждения кахексии, причем подобное варианту сплайсинга грелина соединение имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

5. Применение подобного варианту сплайсинга грелина соединения для производства лекарственного средства для лечения или предупреждения липодистрофии, причем подобное варианту сплайсинга грелина соединение имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

6. Применение подобного варианту сплайсинга грелина соединения для производства лекарственного средства для лечения или предупреждения мышечного истощения, причем подобное варианту сплайсинга грелина соединение имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Mintz, Liat

<120> Применение варианта сплайсинга трелина для лечения кахексии и/или анорексии, и/или анорексии-кахексии, и/или нарушения питания, и/или липодистрофии, и/или мышечного истощения, и/или стимуляции аппетита

<130> 28238-022

<150> US 60/781,860

<151> 2006-03-13

<160> 8

<170> Патент в версии 3.3

<210> 1

<211> 94

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Val Arg Pro
1 5 10 15

Pro His Lys Ala Pro His Val Val Pro Ala Leu Pro Leu Ser Asn Gln
20 25 30

Leu Cys Asp Leu Glu Gln Gln Arg His Leu Trp Ala Ser Val Phe Ser
35 40 45

Gln Ser Thr Lys Asp Ser Gly Ser Asp Leu Thr Val Ser Gly Arg Thr
50 55 60

Trp Gly Leu Arg Val Leu Asn Gln Leu Phe Pro Pro Ser Ser Arg Glu
65 70 75 80

Arg Ser Arg Arg Ser His Gln Pro Ser Cys Ser Pro Glu Leu
85 90

<210> 2

<211> 22

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Val Arg Pro
1 5 10 15

Pro His Lys Ala Pro His
20

<210> 3

<211> 24
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Val Arg Pro
 1 5 10 15

Pro His Lys Ala Pro His Val Val
 20

<210> 4
 <211> 24
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> РАЗНЫЙ ПРИЗНАК
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa is Dpr

<400> 4

Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Val Arg Pro
 1 5 10 15

Pro His Lys Ala Pro His Val Val
 20

<210> 5
 <211> 29
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Val Arg Pro
 1 5 10 15

Pro His Lys Ala Pro His Val Val Pro Ala Leu Pro Leu
 20 25

<210> 6
 <211> 91
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Val Arg Pro Pro His Lys
 1 5 10 15

Ala Pro His Val Val Pro Ala Leu Pro Leu Ser Asn Gln Leu Cys Asp
 20 25 30

Leu Glu Gln Gln Arg His Leu Trp Ala Ser Val Phe Ser Gln Ser Thr
35 40 45

Lys Asp Ser Gly Ser Asp Leu Thr Val Ser Gly Arg Thr Trp Gly Leu
50 55 60

Arg Val Leu Asn Gln Leu Phe Pro Pro Ser Ser Arg Glu Arg Ser Arg
65 70 75 80

Arg Ser His Gln Pro Ser Cys Ser Pro Glu Leu
85 90

<210> 7
<211> 181
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 7

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

Ser Val Ser Leu Ser Pro His Ile Tyr Pro Asp Leu Cys Val Cys Val
20 25 30

Arg Glu Arg Glu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Phe Gln Gln Arg Lys Glu
35 40 45

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp
50 55 60

Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Thr Glu Glu Glu Leu
65 70 75 80

Glu Ile Arg Val Cys Thr Gln Ala Pro Ala Cys Ser Tyr Asn Ser Lys
85 90 95

Gly Val Gly Val Trp Arg Val Ser His Met Leu Ala Phe Gln Ala Thr
100 105 110

Gln Gly Leu Glu Ser Ser Thr Asn Ser Ser Thr Arg Gly Ser Glu Ser
115 120 125

Pro Ser Gln Glu Val Thr Val Ser Arg Val Ala Arg Glu Gln Gln Thr
130 135 140

Cys Ala Gln Lys Thr Lys Gln Ile Glu Gly Ser Gln Glu Pro Gly Ser
145 150 155 160

Thr Asp Gly Tyr Arg Asn Arg Arg Lys Pro Cys Leu Ser Gln Asp Leu
165 170 175

Ser Gly Leu Pro Trp
180

<210> 8
<211> 90
<212> Белок
<213> Rattus norvegicus

<400> 8

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

Ser Pro Gln Val Pro His Leu Ser Trp Ser Val Val Cys Ser Phe Pro
20 25 30

Phe Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro
35 40 45

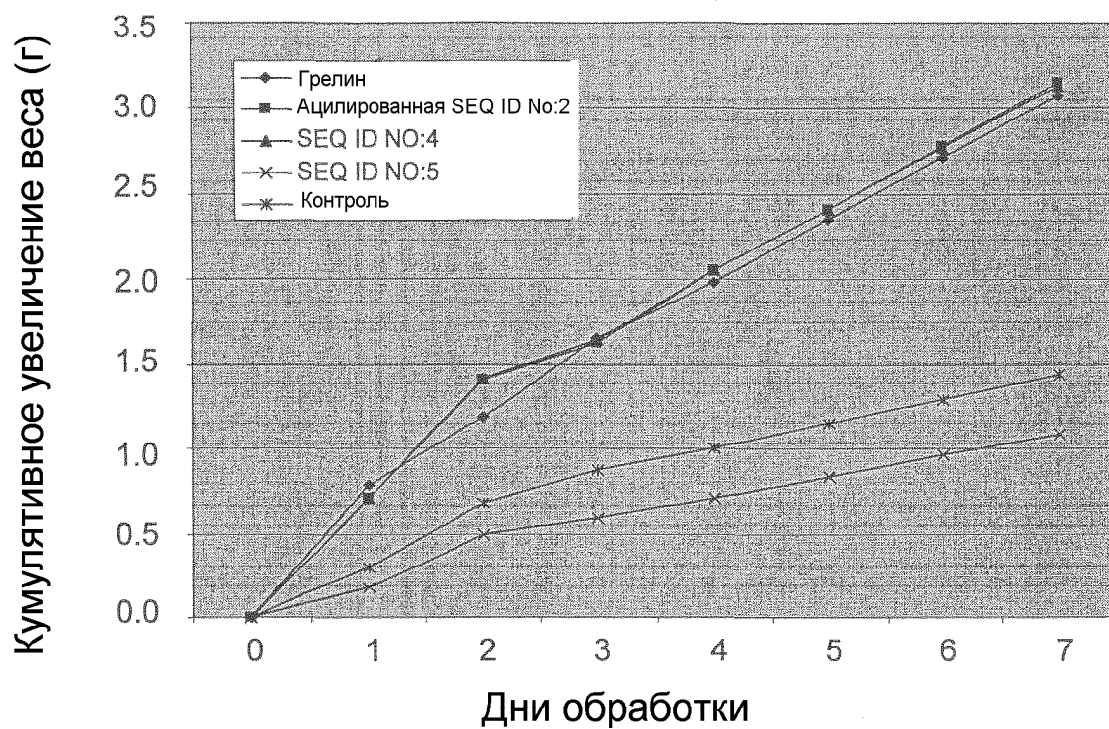
Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu
50 55 60

Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Val Gly Pro Arg Ala Pro Ala
65 70 75 80

Tyr Ser Cys Asn Ser Lys Gly Phe Gly Val
85 90

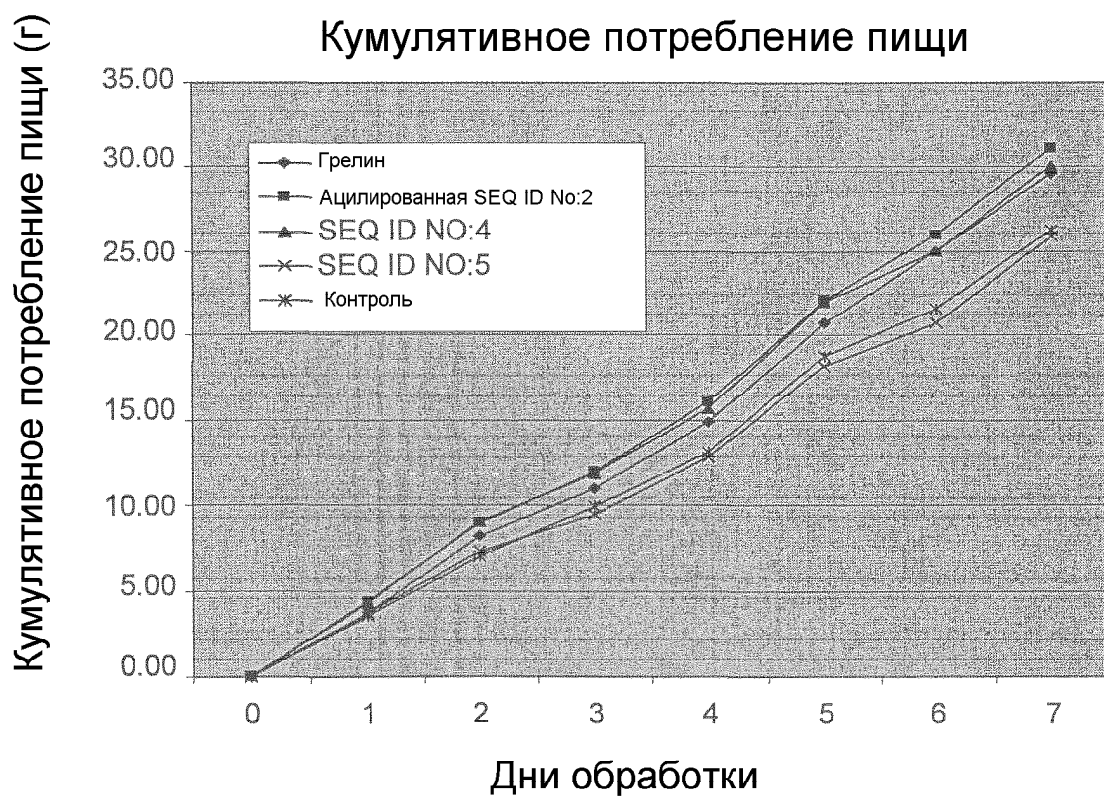
А.

Кумулятивное увеличение веса



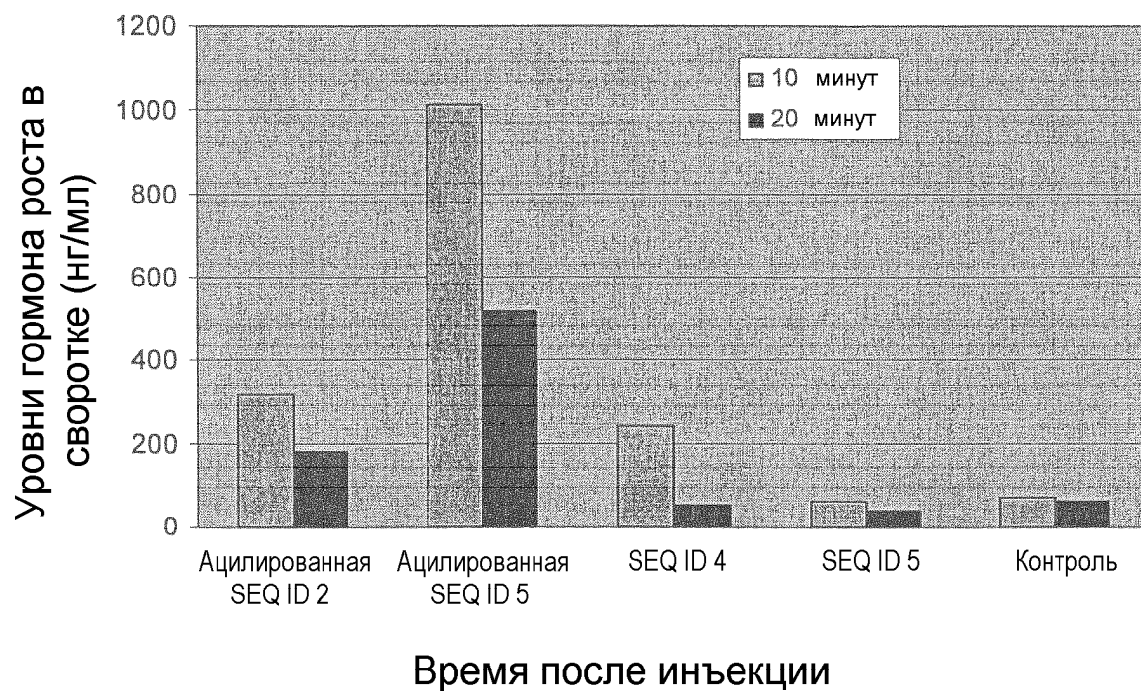
В.

Кумулятивное потребление пищи



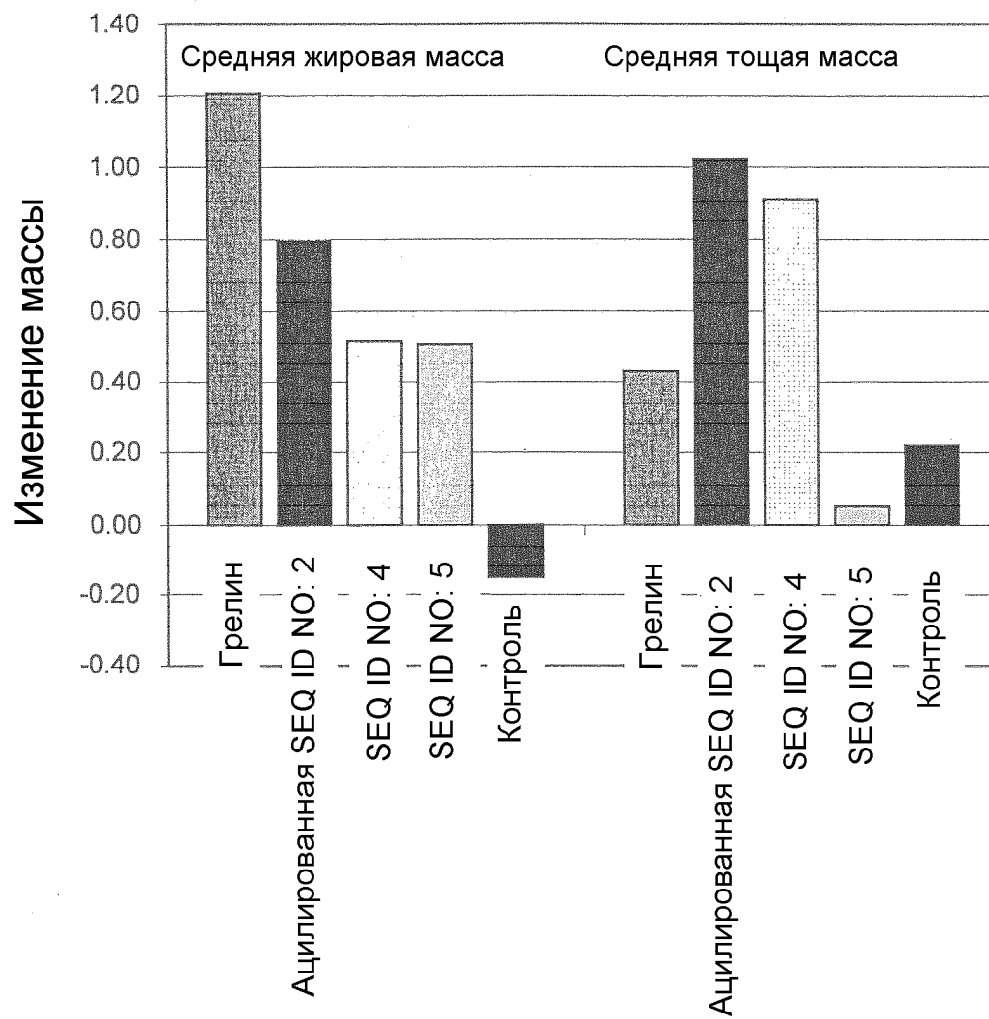
Фиг. 2

Эффект вариантов сплайсинга грелина на высвобождение гормона роста



Фиг. 3

Эффект вариантов сплайсинга грелина на состав тела



Фиг. 4