



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **286**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(51) **6 A61K 38/27, 38/30**

(12) **Описание изобретения**
К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 96000313
(22) 26.10.93
(31) 07/968,623
(32) 29.10.92
(33) US
(46) 13.12.2000, Бюл.№4 (20)
(86) PCT/US 93/10259, 26.10.93
(72) Кларк Росс Г. (US)
(71)(73) Дженентек, Инк. (US)
(56) US 5126324, 30.06.92
US 4792546, 20.12.88
(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОЖИРЕНИЯ ИЛИ ЕГО
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

(57) В заявке описан способ лечения млекопитающих, страдающих ожирением, или предотвращения наступления ожирения у млекопитающих. Указанный способ включает введение млекопитающему эффективного количества гормона роста в комбинации с эффективным количеством IGF-I. Предпочтительно гормон роста вводят таким образом, чтобы в крови обеспечивалось непрерывное наличие постоянного терапевтически эффективного его количества, например, с помощью непрерывной инфузии либо частых инъекций или путем применения композиций с пролонгированным действием.

Предпосылки создания изобретения
Область техники, к которой относится
изобретение

Настоящее изобретение относится к способу восстановления строения тела, соответствующего идеальным параметрам для данной популяции, у страдающих ожирением млекопитающих или предупреждения ожирения, прежде всего у людей.

Предпосылки создания изобретения и уровень техники

Ожирение представляет собой хроническое заболевание, широко распространенное в современном обществе, и приводящее не только к социальным стигматам, но также к снижению продолжительности жизни и многочисленным медицинским проблемам, включающим неблагоприятное психологическое развитие, расстройства репродуктивной системы, такие, как поликистозные заболевания яичников, дерматологические нарушения, такие, как инфекции, варикозное расширение вен, Acanthosis nigricans, и экзема, неспособность к физической нагрузке, сахарный диабет, устойчивость к инсулину, гипертензию, гиперхолестеринемию, желчнокаменную болезнь, остеоартрит, ортопедические нарушения, тромбозомболическую болезнь, рак и ишемическую болезнь сердца. См., например, Rissanen и др., British Medical Journal, 301: 835-837 (1990).

У страдающих ожирением особей имеется тенденция иметь низкие базальные уровни соматотропного гормона (или гормона роста (GH - growth hormone) и неспособность секретировать достаточные количества GH в ответ на различные стимулы, включающие гормон, высвобождающий гормон роста (GHRH - growth hormone releasing hormone). См., например, Williams, New Engl. J. Med., 311:1403 (1984); Kopelman, Clin. Endocrinol., 23:87 (1985); Kopelman, Clin. Endocrinol., 24:157 (1986); Loche, Clin. Endocrinol., 27:145 (1987); Ghigo и др., Methabolism, 41:560-563 (1992). Чувствительность GH к GHRH у страдающих ожирением крыс обладает половым диморфизмом. См., например, Cossi и др., Pharmacol. Res., 25: Suppl. 2, 336-337 (1992). Было установлено, что неспособность секретировать GH является результатом нарушения функции гипоталамуса (Kopelman, 1986, см. выше), что приводит к хроническому состоянию гиперсекреции соматостатина. См., например, Cordido, J. Clin. Endocrinol. Metab., 68:290 (1989). Это нарушение в секреции GH, по-видимому, является скорее результатом, чем причиной ожирения, так как оно, по крайней мере частично, восстанавливается при снижении веса.

Хотя ранее предполагалось, что неспособность страдающих ожирением особей высвободить GH является следствием ингибирования обратной связи, управляемой повышенными уровнями в плазме инсулиноподобного фактора роста (IGF-I) (Loche и др., Clin. Endocrinol.

27:145-153 (1987)), в действительности не было обнаружено корреляции между IGF-I и индексами избыточного веса. См., например, Cordido и др., Horm. Res. 36:187-191 (1991). Таким образом, тучность не связана с уменьшением уровня IGF-I. См., например, Hochberg и др., Metabolism, 41: 106-112 (1992); Gama и др., Clin. Chim. Acta, 188: 31-38 (1990); Rosskamp и др., Eur. J. Pediatr., 146: 48-50 (1987). Кроме того, ослабленная стимуляция hGH у страдающих ожирением людей не объясняется измененным соотношением hGH и IGF-I. См., например, Jungmann и др., Med. Klin., 86:237-240 (1991). Снижение уровней инсулина в крови не приводит к увеличению способности секретировать GH. См., например, Chalew и др., Inter. J. Obesity, 16: 459-463 (1992).

Некоторые болезни, такие, как сахарный диабет, прежде всего юношеский диабет или диабет типа II, проявляются наиболее часто при ожирении. Было обнаружено, что низкие уровни IGFBP-I при ожирении связаны с повышенными уровнями инсулина, которые в свою очередь связаны с распределением жира в организме и устойчивостью к инсулину. Хронически подавленные уровни IGFBP-I могут стимулировать биологическую активность IGF, а также регуляцию им по типу обратной связи секреции GH, таким образом способствуя метаболическим и митогенетическим последствиям ожирения. См., например, Conover и др., J. Clin. Endocrinol. Metab. 74:1355-1360 (1992).

Существующие способы лечения ожирения включают стандартные диеты и физические упражнения, диеты с очень низкой калорийностью, поведенческую терапию, лекарственную терапию, включающую вещества, подавляющие аппетит, лекарства, усиливающие термообразование, ингибиторы абсорбции пищи, механические устройства, такие, как круговая фиксация челюстей, шнуровка талии и надувные пояса, и хирургические средства. См., например, Jung и Chong, Clinical Endocrinology, 35:11-20 (1991), Bray, Am. J. Clin. Nutr., 55: 538S-544S (1992). В литературе сообщалось, что модифицированная диета с низким содержанием протеинов является эффективной для снижения веса в период полового созревания. См., например, Lee и др., Clin. Pediatr., 31: 234-236 (апрель 1992). Ограничение калорийности в качестве лечения ожирения вызывает разложение запасов протеинов в организме (катаболизм) и приводит к отрицательному азотному балансу. Поэтому диеты с добавлением протеина приобрели популярность в качестве средств уменьшения потерь азота за время питания с ограниченной калорийностью. Поскольку такие диеты дают только небольшую экономию азота, то необходим более эффективный путь для сохранения худобы и запасов протеина. Кроме того, лечение ожирения может быть улучшено, если бы такой режим приводил к ускоренной потере жира в организме. Различные подходы к такому лечению включают, например, описан-

ные у Weintraub и Bray, *Med. Clinics N. Amer.*, 73: 237 (1989); Bray, *Nutrition Reviews*, 49: 33 (1991).

ГН играет важную роль в регуляции соматического роста и метаболизма. Метаболическое воздействие ГН подразделяются на первичные инсулиноподобные воздействия, связанные с повышением утилизации глюкозы и увеличением аминокислотного транспорта, и на антиинсулиноподобные воздействия, связанные со стимуляцией липолиза и подавлением утилизации глюкозы. ГН усиливает сохранение азота. См., например, Bray и др., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33: 293 (1971).

На производство IGF-I доминирующее стимулирующее воздействие оказывает ГН, ГН также оказывает влияние на некоторые протеины, связывающие IGF-I. См. у Tanner и др., *Acta Endocrinol.*, 84: 681-696 (1977); Uthne и др., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39: 548-554 (1974). Общий обзор по IGF-I см. у Baxter, *Advances in Clinical Chemistry*, 25: 49 (1986); Clemmons и Underwood, *Clinics in Endocrin. and Metab.*, 15: 629 (1986). Применение IGF-I и ГН путем инъекции с целью получения прибавления веса и для получения анаболических и усиливающих рост воздействий у млекопитающих, в том числе у больных диабетом пациентов, описано в патенте США 5126324, выданном 30 июня 1992 г.

Известно, что ГН ускоряет липолиз у животных, а также у нормальных и у страдающих ожирением людей. См., например, Raben и Hollenberg, *J. Clin. Invest.* 38: 484 (1959); Mautalen и Smith, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25: 495 (1965); Felig и др., *J. Clin. Invest.*, 50: 411 (1971); Jorgenson, *Endocr. Reviews*, 12, (1991); Martin и др., *Inter. J. Obesity*, 13: 327-335 (1989); Pfadt и Angulo, *Arch. Dis. Child.*, 66:1261 (1991); Jeevanandam и др., *Surgery*, 111: 495-502, (1992). ГН применяли вместе с производным фенилэтана для увеличения прибавления веса и антилипогенной активности у животных. См., например, патент США 4792546, выданный 20 декабря 1988 г. Липолитическая композиция с использованием фактора роста, такого, как фактор роста нервов, эпидермальный фактор роста и фактор роста фибробластов, описана в международной заявке WO 92/11838, опубликованной 23 июля 1992 г. Возможность применения ГН для лечения ожирения также описана у Rivlin, "The Use of Gormones in the Treatment of Obesity", в *Childhood Obesity*, ред. Winick (John Wiley & Sons: New York, 1975), стр. 151-162, и у Rivlin, *Inter. J. Dermatol.*, 15: 446-449 (1976).

Примеры моделей, показывающих, что введение ГН страдающим ожирением особям может стимулировать липолиз, включают крыс с отсеченным гипофизом, с вентромедиальным поражением гипоталамуса, где ГН препятствовал как гиперфагии, так и развитию ожирения (York и Bray, *Endocrinology*, 90: 885-894 (1972)), и генетически страдающих ожирением гомозиготных по гену *fa/fa* крыс линии Zucker, обладающих

пониженным отложением липидов. См., например, Martin и Jeanrenaud, *Int. J. Obesity*, 9: 99-104 (1985). см. также у Williams и Frohman, *Pharmacotherapy*, 6: 311-3189 (1986) и у Rivlin, *New Engl. J. Med.*, 292: 26 (1975).

Некоторые исследования введения ГН детям с дефицитом ГН, многие из которых страдают ожирением, показали, что одним из наиболее ранних и наиболее заметных изменений была потеря жировой ткани. См., например, Novak и др., *Mayo clin. Proc.*, 47: 241-246 (1972); Clin и др., *Metabolism*, 22: 589-595 (1973); Parra и др., *Metabolism*, 28: 851-857 (1979). Кроме того, у страдающих ожирением людей повышалось содержание свободных жирных кислот, свидетельствующее об увеличении липолиза в ответ на инъекцию ГН. См., например, Mautalen и Smith, *J. Clin. Endocrinol.*, 25: 495-498 (1965); Blasse, *Diabetologia*, 4: 20-25 (1968); Bray, *Metab.*, 29:119-122 (1969).

Кроме того, инъекция ГН страдающим ожирением пациентам, находящимся на диете с высоким содержанием углеводов, приводила к большей потере жиров в организме, чем инъекция наполнителем. См., например, Snyder и др., *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 69: 745 (1989). Также было обнаружено, что экзогенный ГН снижал содержание жира в организме и увеличивал массу тела, лишнюю жира, у престарелых женщин с нарушением эндогенного высвобождения ГН (Grist и др., *Metabolism*, 36:1115-1117 [1987]) и у физически здоровых взрослых людей с нормальной секрецией. См., например, Grist и др., *J. Appl. Physiol.*, 65: 579-584 (1988). Эти изменения происходили без модификации диеты или изменений в режимах физиологической активности. В литературе по крайней мере одной группой исследователей сообщалось, что ГН приводит к увеличению окисления жира при нахождении на диете с ограниченной калорийностью. см. Bray, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29:119 (1969). Однако другие исследователи (Clemmons и др., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 64: 878-883 [1987]; Snyder и др., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67: 54-61 [1988]; Snyder и др., *Am. J. Clin. Nutr.*, 52: 431-437 [1990]) не обнаружили индуцируемое ГН увеличение потери жира в организме, когда страдающим ожирением взрослым людям во время программы питания с ограниченной калорийностью назначали гормон. Было обнаружено, что экзогенный ГН снижает содержание жира в организме у страдающих ожирением женщин при очевидном отсутствии значительного ограничения в калорийности пищи, а указанный эффект не связан с эндогенной секрецией ГН или составом тела. См., например, Skaggs и Crist, *Horm. Res.*, 35:19-24 (1991).

Было установлено, что некоторые проявления старения, включающие разрастание массы жировой ткани, уменьшались в результате введения ГН три раза в неделю. См., например, Rudman и др., *N. Eng. J. Med.*, 323:1-6 (1990); Crist и др., *Metabolism*, 36:1115-1117 (1987).

Имеются данные, что IGF-I снижает уровни глюкозы в крови у крыс и людей при использовании для лечения диабета и вторичных эффектов гиперинсулинемии, в том числе и у страдающих ожирением особей. См., например, Froesch и др., *TEM*, май/июнь 1990, стр. 254-260, Guler и др., *N. Eng. J. Med.*, 317:137-140 (1987); патент США 4988675, выданный 29 января 1991 г.; Carlsson и др., *J. Endocrin.*, 122: 661-670 (1989); Zenobi и др., *J. Clin. Invest.*, 89:1908-1913 (1992). В отличие от гормона роста GH инсулиноподобный фактор роста IGF-I и инсулин имеют известный антилиполитический эффект. См., например, Zapf и др., *J. Clin. Invest.*, 77:1768-1775 (1986); Guler и др., *N. Eng. J. Med.*, 317:137-140 (1987); Zapf и др., *Eur. J. Biochem.*, 87: 285-296 (1978); Bolinder и др., *Clin. Endocrinol. Metab.*, 65: 732-737 (1987); Giacca и др., *Diabetes*, 39: 340-347 (1990). Кроме того, было обнаружено, что страдающие ожирением крысы линии Zucker устойчивы к воздействиям IGF-I и инсулина на метаболизм глюкозы и аминокислот. См., например, Jacob и др., *Diabetes*, 41: 691-697 (1992).

Наиболее современное исследование воздействия IGF-I на состав организма проведено Cottam и др., (*Endocrinology*, 130: 2924-2930 [1992]), которые инъецировали рекомбинантный человеческий IGF-I (три раза в день в дозе 150 мкг/кг/день в течение 8 недель) кастрированному самцу овцы, которому была назначена диета, состоящая из пеллетированной и измельченной люцерны. Обработка вызывала увеличение уровня IGF-I в плазме, снижение инсулина в плазме и увеличение веса большой берцовой кости, селезенки и почек. Однако несмотря на выраженную эффективность IGF-I, не было обнаружено его заметного воздействия на содержание жира в организме. Эти авторы полагают, что полученные результаты согласуются с их более ранними исследованиями (Siddiqui и др., *J. Endocrinol.*, 124:151-158 [1990]), показывающими сходный состав тела при одинаковом весе тела у мышей, выбранных из групп с высокими и низкими концентрациями IGF-I в плазме. Они делают заключение, что воздействия GH на снижение жира в организме не медируются только циркулирующим IGF-I.

В другом исследовании катаболическое состояние у молодых крыс вызвали диабетом, дексаметазоном или резекцией кишечника, а затем катаболических животных обрабатывали IGF-I или аналогами IGF-I. См., например, Ballard и др. в *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors*, ред. Spencer, стр. 617-627 (1991). Авторы сообщают, что инсулиноподобные факторы роста IGF вызывали тенденцию к снижению содержания жира в организме.

В продолжительном эксперименте (Guler и др., *Acta Endo.*, 121: 456-464 [1990]) карликовых пуделей обрабатывали в течение 130 дней рекомбинантным человеческим IGF-I дозами по 6 мг/день. Не было обнаружено изменения общих размеров тела, однако наблюдали снижение ин-

декса массы тела, которое, по предположению авторов, обусловлено IGF-I. Тем не менее, они утверждают, что это предположение может быть интерпретировано с большой осторожностью и что рекомбинантный человеческий IGF-I может сильно изменять углеводный и липидный метаболизм в направлении, противоположном действию GH.

В случае обработки крысы с отсеченным гипофизом дозами IGF-I, вызывающими существенное увеличение веса организма и органов, не было обнаружено влияния на химический состав кожи или скелета. В частности, процентное содержание жира не изменялось под воздействием обработки IGF-I. См., например, Clarc и Cronin, *Abstracts D8*, 2-ой International IGF Symposium, San Francisco, CA, 1991 г.

В современном обзоре Froesch и др., *TEM*, 254-260 [май/июнь 1990], обобщающем накопленные к данному моменту знания о воздействии инсулина и IGF-I на различные ткани, на стр. 256 утверждают, что можно ожидать, что небольшие дозы IGF-I не будут оказывать воздействия на жировые ткани, и это наблюдали на крысах. Эти авторы также утверждают, что введение крысе *in vivo* IGF-I оказывало намного более выраженное воздействие на мышечную ткань, чем на жировую ткань, см. Zapf и др., *J. Clin. Invest.*, 77:1768 [1986]. Авторы утверждают, что у людей гипоглициемический потенциал IGF-I значительно выше, чем его анти-липолитический потенциал по сравнению с инсулином, см. Culer и др., *N. Engl. J. Med.*, 317:137 (1987).

Также было обнаружено, что хотя у обработанных инсулином крыс с отсеченным гипофизом потребление пищи возрастало в большей степени, чем у необработанных крыс с отсеченным гипофизом (Salter и др., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35: 913 [1957], на потребление пищи молодыми, нестрадающими ожирением карликовыми крысами не оказывали воздействия инфузии ни GH, ни IGF-I. См. Skottner и др., *Endocrinology*, 124: 2519-2526 (1989).

Данные свидетельствуют о том, что многие воздействия GH на грызунов зависят от режимов введения GH. См., например, Robinson и Clark в *Growth Hormone-Basic and Clinical Aspects*, редакторы Isaksson и др., стр. 109-127 (1987). Животных обрабатывали с помощью многочисленных различных режимов дозировки GH. Было установлено, что непрерывная инфузия GH снижает содержание жира в организме у крыс линии Zucker с генетически обусловленным ожирением. См. Martin и др., апрель 1992, FASEB Meeting, Anaheim CA. У человека были изучены воздействия на рост тела у детей с дефицитом GH режимов введения GH дважды в день и ежедневно, и один раз, дважды и трижды в неделю и "перемежающихся" режимов. Данные свидетельствуют о том, что частые инъекции GH (ежедневно) являются предпочтительным режимом (в настоящее время он является принятым режимом применения в клинике). Данные, полученные на

крысах, также показывают, что частые инъекции GH вызывают больший рост костей и прибавление веса, чем редкие инъекции GH, и что непрерывное подвергание воздействию GH путем инфузии не является столь же эффективным, как частые перемежающиеся инъекции GH. Однако в литературе было опубликовано, что инфузия GH индивидуально или в комбинации с IGF-I в количествах, поддерживающих непрерывную эффективную концентрацию GH в плазме, необходима для стимуляции иммунной системы (лимфоидной ткани, чувствительной к GH) хозяина-млекопитающего или птицы. см. международную заявку WO 93/00109, опубликованную 7 января 1993 г.

Принимая во внимание широкое распространение ожирения в современном обществе и серьезные последствия, связанные с ним, которые представлены выше, любое терапевтическое лекарство, потенциально пригодное для снижения веса у страдающих ожирением людей, должно оказывать выраженное положительное воздействие на их здоровье. В данной области техники существует потребность в лекарстве, которое должно снижать общий вес тела у страдающих ожирением людей, приводя к идеальному весу тела, без существенных вредных побочных эффектов и должно помогать страдающему ожирением человеку поддерживать пониженный уровень веса тела.

Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение режима лечения, приемлемого для возвращения веса тела страдающих ожирением индивидов к нормальному, т.е. идеальному весу тела.

Другой целью изобретения является обеспечение терапии при ожирении, приводящей к поддержанию пониженного веса тела в течение продолжительного периода времени.

Еще одной целью изобретения является предупреждение ожирения и в том случае, если лечение уже начато, прекращение развития или предотвращение наступления болезней, которые являются следствием ожирения или вторичны по отношению к ожирению, таких, как атеросклероз и поликистозное заболевание яичников.

Эти и другие задачи и предметы изобретения очевидны специалисту в данной области техники.

Краткое изложение сущности изобретения

Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ лечения ожирения или предупреждения ожирения у млекопитающих, включающий введение млекопитающему эффективного количества IGF-I и GH. В оптимальном варианте GH вводят таким образом, чтобы в крови млекопитающего непрерывно поддерживалась его терапевтически эффективная концентрация на протяжении всего периода его введения. Такое введение собственно включает использование GH с продолжительным действием либо за счет пролонгирования присутствия GH в

крови, либо за счет медленного высвобождения GH из места инъекции. Такое непрерывное введение GH также включает введение с помощью продолжительной инфузии или путем инъекций с большей частотой, чем один раз в день.

В одной из предпочтительных форм для введения GH ковалентно связывают с помощью максимально десяти аминокислотных остатков, предпочтительно с N - концевыми остатками метионина или лизина, человеческим GH (hGH), с высшими заместителями, обычно увеличивающими циркуляторную жизнь протеина. Предпочтительно такие фрагменты связывают с GH через амидную связь, полученную из 4-гидроксиз-3-нитробензолсульфонатного эфира или N-гидроксисукцинимидного (NHC) эфира полиэтиленгликоля (ПЭГ), монометил-замещенного гомополимера ПЭГ или полиоксиэтиленглицерин-карбоновой кислоты. Наиболее предпочтительным полимером по настоящему изобретению является ПЭГ, присоединенный максимально к 10 остаткам, предпочтительно 2-8 молекулы ПЭГ на молекулу hGH.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано прибавление веса тела у молодых (6-9-недельного возраста) нестрадающих ожирением самок dw/dw-крыс в течение восьми дней, когда им вводили эксципиент (незакрашенный столбец), делали инъекции GH один раз в день (широкие диагональные линии), делали инъекции GH дважды в день (узкие диагональные линии) и вводили GH путем инфузии с помощью мини-насоса (закрашенный столбец). На всех чертежах и в тексте приведены средние значения $\pm$ стандартные отклонения с уровнями статистической достоверности, указанными в описании.

На фиг. 2 показаны уровни IGF-I в сыворотке у крыс, которых в течение 8 дней обрабатывали аналогично описанному для фиг. 1, все обозначения соответствуют фиг. 1.

На фиг. 3 показаны ежедневные совокупные прибавления веса тела у страдающих ожирением dw/dw-крыс в течение 14 -дневного периода обработки. Незакрашенные кружочки обозначают результаты, полученные с эксципиентом, закрашенные кружочки - с hGH - насосом, закрашенные квадраты - с дозой hGH 500 мкг один раз в день и незакрашенные квадраты - с дозой hGH 250 мкг дважды в день.

На фиг. 4 показаны окончательные прибавления веса у страдающих ожирением dw/dw-крыс после 14 -дневного периода обработки, где незакрашенный столбец обозначает результаты, полученные с эксципиентом, закрашенный столбец - с дозой hGH 500 мкг, вводимой с помощью насоса, столбец со штриховыми линиями - с дозой hGH 500 мкг, вводимой один раз в день, и столбец с диагональными линиями - с дозой hGH 250 мкг, вводимой дважды в день.

На фиг. 5 показан вес ретроперитонеальной жировой подушки после 14-дневной обработки страдающих ожирением dw/dw-крыс, где обо-

значения для каждого из столбцов соответствуют таковому по фиг. 4.

На фиг. 6 показано изменение веса тела самок dw/dw-крыс после 14-дневной обработки. Приведены данные для следующих групп крыс: жировая/жировая диета - контроль (незакрашенный столбец), жировая/жировая диета - инъекция hGH (штриховые линии), жировая/жировая диета - hGH-насос (закрашенный столбец), жировая/зерновая диета - контроль (широкие диагональные линии), жировая/зерновая диета - инъекция hGH (узкие диагональные линии), жировая/зерновая диета - hGH-насос (продольные линии) и зерновая/зерновая диета - контроль (точки).

На фиг. 7 показан вес ретроперитонеального жирового депо у dw/dw-крыс после 14 -дневной обработки, где обозначения соответствуют фиг. 6.

На фиг. 8 показаны совокупные изменения веса тела после 14 -дневной обработки страдающих ожирением самок dw/dw-крыс. Приведены данные для следующих групп крыс: контроль (незакрашенные квадраты), ежедневная инъекция hGH (закрашенные кружочки) и инфузия hGH с помощью мининасоса (закрашенные квадраты).

На фиг. 9 показано ежедневное потребление пищи страдающими ожирением самками dw/dw-крыс после 14 -дневной обработки, где обозначения соответствуют фиг. 8.

На фиг. 10 показан вес жирового депо в граммах у страдающих ожирением самок dw/dw-крыс после 14 -дневной обработки. Вес определяли в следующих группах: контроль (незакрашенный столбец), ежедневная инъекция hGH (диагональные линии) и инфузия hGH с помощью мини-насоса (закрашенный столбец).

На фиг. 11 показаны средние совокупные прибавления веса десяти групп страдающих ожирением самок dw/dw-крыс после 14 -дневной обработки. Приведены данные dkz следующих групп крыс (слева направо): страдающий ожирением контроль (незакрашенный столбец), hGH 300 мг - насос (продольные линии), hGH 100 мг - насос (штриховые длинные диагональные линии), hGH 300 мг - инъекция (широкие диагональные линии), hGH 100 мг - инъекция (горизонтальные линии), IGF-I (чередующиеся сплошные и штриховые диагональные линии), hGH с помощью насоса/IGF-I (закрашенный столбец), hGH с помощью инъекции/IGF-I (штриховые короткие диагональные линии), ПЭГ-GH (узкие диагональные линии), худой контроль (точки).

На фиг. 12 показаны совокупные дневные изменения веса страдающих ожирением самок dw/dw-крыс после 14 -дневной обработки. Приведены данные для следующих групп: контроль (незакрашенные квадраты), IGF-I (закрашенные квадраты), ежедневная инъекция GH (незакрашенные кружочки), инфузия GH (закрашенные

кружочки) и инфузия GH плюс IGF-I (закрашенные квадраты).

На фиг. 13 показан вес ретроперитонеальной жировой подушки после 14-дневной обработки десяти групп самок dw/dw-крыс, где обозначения такие же, как и на фигуре 11 выше.

На фиг. 14 показано отношение веса ретроперитонеальной жировой подушки к весу тела ($\times 10$) после 14 -дневной обработки десяти групп самок dw/dw-крыс, где обозначения такие же, как и на фиг. 11 выше.

На фиг. 15 показан вес гонадной жировой подушки после 14 -дневной обработки десяти групп самок dw/dw-крыс, где обозначения такие же, как и на фиг. 11 выше.

На фиг. 16 показаны уровни сывороточного инсулина после 14 -дневной обработки десяти групп самок dw/dw-крыс, где обозначения такие же, как и на фиг. 11 выше.

На фиг. 17 показаны уровни сывороточного IGF-I после 14 -дневной обработки десяти групп самок dw/dw-крыс, где обозначения такие же, как и на фиг. 11 выше.

На фиг. 18 показаны уровни (мг/дл) глюкозы, холестерина и триглицеридов в сыворотке после 14 -дневной обработки десяти групп самок dw/dw-крыс, где обозначения такие же, как и на фиг. 11 выше.

На фиг. 19 показаны уровни (мг/дл) азота мочевины, кальция и фосфора в сыворотке после 14 -дневной обработки десяти групп самок dw/dw-крыс, где обозначения такие же, как и на фиг. 11 выше.

На фиг. 20 показано воздействие IGF-I, GH и комбинации GH и IGF-I на массу жира при введении подкожно пациентам, больным СПИ-Дом. Закрашенный столбец обозначает плацебо, столбец с продольными линиями обозначает GH, столбец со штриховыми линиями обозначает IGF-I и столбец с диагональными линиями обозначает GH и IGF-I. Количество пациентов, подвергнутых лечению в каждой группе, обозначено числами под каждым столбцом, по оси ординат отложены изменения массы жира (кг) по отношению к исходному уровню.

Описание предпочтительных примеров осуществления

А. Определения

Используемое в настоящем описании понятие “ожирение” относится к состоянию, когда млекопитающее имеет индекс массы тела (МТИ), который вычисляют как отношение веса (кг) к росту² (м), равный по меньшей мере 25,9. Обычно особи с нормальным весом имеют показатель МТИ около 19,9, но менее 25,9.

Согласно настоящему описанию ожирение может быть вызвано любой причиной, как генетической, так и связанной с окружающей средой. Примеры нарушений, которые могут привести к ожирению или быть причиной ожирения, включают переедание и булимию, поликистозную болезнь яичников, краниофарингиому, синдром Прадера-Билли, синдром Фролиха, диабет типа

II, дефицит GH, обычные отклонения, связанные с малым ростом, синдром Тернера и другие паталогические состояния, характеризующиеся пониженной метаболической активностью или уменьшенным расходом остаточной энергии в процентах от общей массы тела без учета жира, например, у детей с острым лейкоцитарным лейкозом.

Понятие “лечение” относится к снижению МТИ у млекопитающего до значения меньше приблизительно 25,9 и к поддержанию этого веса в течение по крайней мере 6 месяцев. Лечение обычно приводит к уменьшению потребления млекопитающим пищи или калорий.

Понятие “предупреждение” относится к предупреждению наступления ожирения, если лечение применяют до начала проявления состояния ожирения. Более того, если лечение начинают в отношении уже страдающих ожирением особей, то можно ожидать, что такое лечение предотвратит или будет препятствовать развитию медицинских осложнений, таких, как атеросклероз, диабет типа II, поликистозное заболевание яичников, сердечно-сосудистые заболевания, остеоартриты, кожные заболевания, гипертензия, устойчивость к инсулину, гиперхолестеринемия, глициридимия и желчнокаменная болезнь.

Таким образом, один предмет настоящего изобретения относится к ингибированию и/или полному подавлению липогенеза у страдающих ожирением млекопитающих, т.е. избыточного накопления липидов в жировых клетках, что является одой из основных особенностей ожирения человека и животного, а также уменьшения общего веса тела. Другой предмет изобретения относится к улучшению состояний, являющихся следствием болезни, в том числе к предупреждению или прекращению развития поликистозной болезни яичников таким образом, что пациент перестает страдать бесплодием, и к увеличению чувствительности к инсулину и/или снижению или исключению потребности или употребления инсулина пациентом, больным диабетом, например, в случае юношеского диабета или диабета типа II.

Понятие “млекопитающее” включает животных, имеющих важное с экономической точки зрения значение, таких, как быки, овцы и свиньи, прежде всего тех, которые используются для производства мяса, а также домашних животных, спортивных животных, животных в зоопарках, и преимущественно людей. Понятие “невзрослый” относится к млекопитающим, начиная с перинатального возраста и заканчивая стадией половой зрелости, к последним относятся также таковые, которые еще не достигли полного потенциала роста. К группе склонных к ожирению людей, которые имеют “дефицит GH”, относятся таковые, у которых нарушена функция GH, в том числе таковые, которые имеют гипотизный дефицит, а также те, которые имеют дефицит GH - рецептора или связывающего GH протеина.

Используемое в настоящем описании понятие “GH” относится к гормону роста, полученному из любых видов, включая быков, овец, свиней, лошадей и предпочтительно человека, с естественной последовательностью или в вариантной форме, и из любого источника, в том числе к естественному, синтетическому или рекомбинантному. В предпочтительном варианте для животного применяют форму GH, полученную из тех видов, которые подлежат лечению, так, например, GH из свиней применяют для лечения свиней, овечий GH - для лечения овец, бычий GH - для лечения крупного рогатого скота и т.д.

Для лечения человека предпочтительно используют человеческий с естественной последовательностью зрелый GH с метионина или без него на его N -конце. Также предпочтительным является рекомбинантный hGH, т.е. полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Более предпочтительным является метионильный человеческий гормон роста (met-hGH), полученный в *E.coli*, например, способом, описанным в патенте США 4755465, выданном 5 июля 1988 г., и у Goeddel и др., *Nature*, 282: 544 (1979). Met-hGH, который поставляет на рынок под товарным знаком Pritropin® фирма Genentech, Inc., идентичен естественному полипептиду, за исключением присутствия N - концевой остатка метионина. Эта дополнительная аминокислота образуется в результате процесса синтеза протеина в бактерии. Также предпочтительным является рекомбинантный hGH, производимый в научных исследованиях фирмой Genentech, Inc., под товарным знаком Nutropin® и поставляемый на рынок фирмой Eli Lilly. В указанном последнем hGH отсутствует этот остаток метионина, и он имеет аминокислотную последовательность, идентичную таковой естественного гормона. см. Gray и др., *Biotechnology*, 2:161 (1984). Метионильный hGH, равно как и hGH имеют одинаковую эффективность и фармакокинетические параметры. см. Moore и др., *Endocrinology*, 122: 2920-2926 (1988). Другим приемлемым для использования hGH является вариант hGH, который представляет собой плацентарную форму GH с чистой соматогенетической, а не лактогенетической активностью, как описано в патенте США 4670393, выданном 2 июня 1987 г. Сюда же включены также варианты GH, описанные в Международной заявке WO 90/04788, опубликованной 3 мая 1990 г., и в Международной заявке WO 92/09690, опубликованной 11 июня 1992 г.

Используемое в настоящем описании понятие “IGF-I” относится к инсулиноподобному фактору роста, выделенному из любых видов, включая быков, овец, свиней, лошадей, птиц и предпочтительно человека, с естественной последовательностью или в вариантной форме и из любого источника, в том числе к естественному, синтетическому или рекомбинантному. IGF-I выделяли из сыворотки человека и получали

рекомбинантным путем. См., например, EP 123228 и 128733.

В предпочтительном варианте для животного применяют форму IGF-I, полученную из тех видов, которые подлежат лечению, так, например, IGF-I, выделенный из свиней, применяют для лечения свиней, овец IGF-I - для лечения овец, бычий IGF-I - для лечения крупного рогатого скота и т.д. Для лечения человека предпочтительно используют человеческий с естественной последовательностью зрелый IGF-I, более предпочтительно без метионина на его N-конце, полученный, например, с помощью способа, описанного в EP 230869, опубликованном 5 августа 1987 г.; EP 128733, опубликованном 19 декабря 1984 г.; или EP 288451, опубликованном 26 октября 1986 г. Более предпочтительно этот IGF-I с естественной последовательностью получают рекомбинантным путем, и для клинических исследований его поставляет фирма Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния. Также для применения предпочтителен IGF-I, имеющий удельную активность выше приблизительно 14000 единиц/мг, что определяют с помощью радиорецепторного анализа с использованием плацентарных мембран, таких, как поставляемые фирмой KabiGen AB, Стокгольм, Швеция.

Предпочтительными вариантами IGF-I являются таковые, описанные в патенте США 5077276, выданном 31 декабря 1991 г., в заявке PCT WO 87/01038, опубликованной 26 февраля 1987 г., и в PCT WO 89/05822, опубликованной 29 июня 1989 г., т.е. такие, в которых по крайней мере в положении 3 от N-конца зрелой молекулы отсутствует остаток глутаминовой кислоты, или с делецией до пяти аминокислот на N-конце. В наиболее предпочтительном варианте отсутствуют первые три от N-конца аминокислоты (названные в настоящем описании с целью различения как мозговой IGF, tIGF-I, des(1-3)-IGF-I или des-IGF-I).

Предпочтительный вариант применения GH, при котором "его терапевтически эффективную концентрацию постоянно поддерживают в крови млекопитающего на протяжении всего периода его применения" относится к такому применению GH, независимо от пути введения, композиции, режима, формы, схемы или других факторов, которое приводит к достижению терапевтически эффективной концентрации GH в плазме или сыворотке в течение времени, когда GH вводят млекопитающему. В соответствии с этим определением GH присутствует в концентрации, достаточной и эффективной для лечения ожирения, как это определено в настоящем описании.

Б. Варианты выполнения изобретения

GH в комбинации с IGF-I непосредственно вводят млекопитающему любым приемлемым способом, в том числе парентерально, интраназально, орально или с помощью абсорбции через кожу. Нет необходимости применять их

одинаковым путем, и они могут быть введены локально или системно. Конкретный путь введения каждого агента зависит, например, от анамнеза болезни пациента, включающего любые известные или предполагаемые побочные или пониженные анаболические влияния при применении по отдельности hGH или IGF-I. Примеры парентерального введения включают подкожное, внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное и внутрибрюшинное введение.

GH и IGF-I вводят таким образом, чтобы обеспечить их эффективное количество. GH можно вводить дискретным образом, например, в определенное время (в т.ч. один раз в день) в виде инъекции конкретной дозы, при этом во время инъекции должно быть увеличение концентрации GH в плазме, а затем снижение концентрации GH в плазме до момента следующей инъекции. Другой метод дискретного введения осуществляется при применении многочисленных имплантируемых устройств, пригодных для обеспечения прерывистого высвобождения активного ингредиента, например, начального выброса, и последующего запаздывания перед выбросом активного ингредиента. См., например, патент США 4767628, столбец 2, строки 19-37.

Однако в более предпочтительном варианте GH вводят таким образом, чтобы он постоянно присутствовал в крови для поддержания его наличия на протяжении всего периода применения GH. Наиболее предпочтительно это осуществляют с помощью методов непрерывной инфузии, например, через мини-насос, такой, как осмотический мини-насос. В другом варианте это можно осуществить с помощью применения частых инъекций GH (т.е. более одного раза в день, например, дважды или трижды в день).

Еще в одном примере выполнения изобретения GH может быть введен с использованием композиций GH с продолжительным действием, которые либо задерживают очищение крови от GH, либо вызывают медленное высвобождение GH, например, из места инъекции. Композиция с продолжительным действием, удлинняющая очистку плазмы от GH, может иметь вид комплексного соединения GH или ковалентно связанного (с помощью обратимой или необратимой связи) с макромолекулой, например, с одним или более связывающим его протеинами (Международная заявка WO 92/08985, опубликованная 29 мая 1992 г.) или с водорастворимым полимером, выбранным из гомополимеров ПЭГ и полипропиленгликоля (ППГ) и полиоксэтиленовых полиолов, т.е. такими, которые растворимы в воде при комнатной температуре.

Одним из детально охарактеризованных связывающих GH протеинов является связывающий гормон роста протеин (GHBP) с высоким сродством к GH, образующему внеклеточный домен GH - рецептора, который циркулирует в крови и функционирует в качестве GHBP у неко-

торых видов (Ymer и Herington, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 41:153 [1985]; Smith и Talamantes, *Endocrinology*, 123: 1489-1494 [1988]; Emtner и Roos, *Acta Endocrinologica (Copenh.)*, 122: 296-302 [1990]), включая человека. См., например, Baumann и др., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62:134-141 (1986); EP 366710, опубликованный 9 мая 1990 г.; Herington и др., *J. Clin. Invest.*, 77:1817-1823 (1986); Leung и др., *Nature*, 330: 537-543 (1987). Также был описан второй связывающий протеин (BP - binding protein) с низким сродством к GH, который, по-видимому, не является структурно связанным с GH-рецептором. См., например, Baumann и Shaw, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70: 680-686 (1990).

И, наоборот, GH может входить в комплекс или быть связанным с полимером для увеличения его периода полураспада в крови. Примеры приемлемых для этой цели полиэтиленполиолов и полиоксиэтиленполиолов включают полиоксиэтиленглицерин, полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленсорбит, полиоксиэтиленглюкозу и т.п. Глицериновая основная цепь полиоксизтиленглицерина является такой же основной цепью, которая встречается в моно-, ди- и триглицеридах у животных и людей.

Для полимера не требуется, чтобы он имел какую-либо определенную молекулярную массу, однако предпочтительно, чтобы молекулярная масса составляла от приблизительно 3500 до 100000, более предпочтительно от 5000 до 40000. Предпочтительно, чтобы гомополимер ПЭГ был незамещенным, но он может быть также замещен алкильной группой на одном конце. Предпочтительно алкильная группа представляет собой C₁-C₄ алкильную группу и наиболее предпочтительно метильную группу. Наиболее предпочтительно полимер представляет собой незамещенный гомополимер ПЭГ, монометилзамещенный гомополимер ПЭГ (мПЭГ) или полиоксиэтиленглицерин (ПОГ) и имеет молекулярную массу приблизительно от 5000 до 40000.

GH ковалентно связывают через один или более аминокислотных остатков GH с концевой реакционноспособной группой полимера, в основном в зависимости от условий реакции, молекулярной массы полимера и т.д. Полимер с реакционноспособной(ыми) группой(ами) в настоящем описании назван активированным полимером. Реакционноспособная группа избирательно взаимодействует со свободной аминогруппой или другими реакционноспособными группами GH. Однако очевидно, что для получения оптимальных результатов тип и количество выбранных реакционноспособных групп, так же как и тип применяемого полимера должны зависеть от конкретного применяемого GH, чтобы избежать взаимодействия имеющейся реакционноспособной группы со слишком большим количеством очень активных групп GH. Поскольку этого невозможно избежать полностью, рекомендуется применять обычно приблизительно от 0,1 до 1000 молей, предпочтительно от 2 до 200 молей

активированного полимера на моль протеина в зависимости от концентрации протеина. Окончательное количество активированного полимера на моль протеина представляет собой баланс для поддержания оптимальной активности, в то же время оно позволяет оптимизировать, если возможно, период полувыведения протеина из крови.

Хотя у протеина могут быть остатки любых реакционноспособных аминокислот, например, один или два цистеина или N-концевая аминокислотная группа, предпочтительно, чтобы реактивная аминокислота являлась лизином, связанным с реактивной группой активированного полимера через его свободную эпсилон - аминогруппу, или глутаминовой или аспарагиновой кислотой, связанной с полимером через амидную связь.

Ковалентная реакция модификации может осуществляться с помощью любого приемлемого способа, обычно используемого для взаимодействия биологически активных материалов с инертными полимерами, предпочтительно при значении pH около 5-9, более предпочтительно при 7-9, если реакционноспособные группы GH являются группами лизина. Обычно процесс включает подготовку активированного полимера (по крайней мере с одной терминальной гидроксильной группой), подготовку активного субстрата из этого полимера и последующее взаимодействие GH с активным субстратом для получения GH, пригодного для изготовления композиции. Вышеуказанная реакция модификации может быть проведена несколькими способами, которые могут включать одну или более стадий. Примеры модифицирующих агентов, которые могут быть использованы для получения активированного полимера в одностадийной реакции, включают хлорид циануровой кислоты (2,4,6-трихлор-S-триазин) и фторид циануровой кислоты.

Согласно одному из примеров выполнения изобретения реакция модификации происходит в две стадии, причем полимер сначала взаимодействует с ангидридом кислоты, таким, как янтарный или глутаровый ангидрид для образования карбоновой кислоты, а затем карбоновую кислоту подвергают взаимодействию с соединением, способным взаимодействовать с карбоновой кислотой для образования активированного полимера с реакционноспособной эфирной группой, способной взаимодействовать с GH. Примеры таких соединений включают N-гидроксисукцинимид, 4-гидрокси-3-нитробензолсульфоновую кислоту и т.п. и предпочтительно применяют N-гидроксисукцинимид или 4-гидрокси-3-нитробензолсульфоновую кислоту. Например, монометилзамещенный ПЭГ может быть подвергнут взаимодействию с глутаровым ангидридом при повышенных температурах, предпочтительно приблизительно при 100-110°C в течение 4 часов. Полученную таким образом монометил-ПЭГ-глутаровую кислоту

затем подвергают взаимодействию с N-гидроксисукцинимидом в присутствии карбодиимидного реагента, такого, как дициклогексил или изопропилкарбодиимид, для получения активированного полимера, метоксиполиэтиленгликолил-N-сукцинимидилглутарата, который далее подвергают взаимодействию с hGH. Этот способ подробно описан у Abuchowski и др., *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984). В другом примере монометилзамещенный ПЭГ может быть подвергнут взаимодействию с глутаровым ангидридом с последующим взаимодействием с 4-гидрокси-3-нитробензолсульфоновой кислотой (ГНСК) в присутствии дициклогексилкарбодиимида для получения активированного полимера. ГНСК описана у Bratnagar- и др., *Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium*, Rich и др. (редакторы) (Pierce Chemical Co., Rockford IL, 1981), стр.97-100 и у Nitecki и др., *High-Technology Route to Virus Vaccines* (American Society for Microbiology: 1986), имеющей название "Novel Agent for Coupling Synthetic Peptides to Carriers and its Applications".

Конкретные способы получения hGH, конъюгированного с ПЭГ, включают способы, описанные в патенте США 4179337 в отношении ПЭГ-hGH и в патенте США 4935465, в котором описан ПЭГ, обратимо, но ковалентно связанный с hGH. Другие специфические способы получения ПЭГ-hGH включают следующие.

ПЭГилирование с метоксиполиэтиленгликолем альдегидом (Me-ПЭГ альдегид) путем восстановительного алкилирования, а очистку выполняют, добавляя к 2 мг/мл hGH в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР) при pH 7,0 5 mM Me-ПЭГ альдегида-5000 (молекулярная масса 5000 Да) и 20 mM NaCNBH₃ и осторожно смешивая при комнатной температуре в течение 3 часов. Затем к 50 mM добавляют этаноламин для восстановительного амидирования непрореагировавшего Me-ПЭГ. Смесь разделяют на анионообменной колонке типа Mono Q посредством жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ). Избыточный непрореагировавший Me-ПЭГ не "садится" на колонку и может быть выделен из смеси. Получают две основные фракции ПЭГилированного hGH с точными молекулярными массами 30 кДа и 40 кДа с помощью редуцированного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) по сравнению с молекулярной массой 20 кДа непрореагировавшего hGH. Комплекс hGH с hGH-связывающим протеином ПЭгилируют таким же образом, получая с помощью гель-фильтрации производное с молекулярной массой 150 кДа.

ПЭГилирование с N-гидроксисукцинимидом-ПЭГ (НГС-ПЭГ) и очистку выполняют, добавляя НГС-ПЭГ в молярной концентрации, в 5 раз превышающей общую концентрацию лизина в hGH, к раствору, содержащему 2 мг/мл hGH в 50 mM натрий - боратного буфера при pH 8,5

или в ЗФР при pH 7, и смешивая при комнатной температуре в течение 1 часа. Продукты разделяют на колонке для разделения по размерам с Superose 12 и/или на колонке типа Mono Q для ЖЭХБ. Размеры ПЭГилированного hGH варьируются в зависимости от значения pH реакции от приблизительно 300 кДа в случае реакции, протекающей при pH 8,5, до 40 кДа для pH 7,0, что было измерено с помощью гель-фильтрации. Комплекс hGH с hGH-связывающим протеином ПЭгилируют таким же образом, получая с помощью гель-фильтрации величину молекулярной массы 400-600 кДа.

ПЭГилирование цистеиновых мутантов hGH с ПЭГ-малеимидом выполняют, получая одиночный цистеиновый мутант hGH с помощью сайтнаправленного мутагенеза, выделяя его из штамма E.coli 16C9 (W3110 delta tonA phoA delta E15 delta (argF-lac)169 deoC2, который не обладает способностью производить deoC протеин и описан в заявке на патент США 07/224520, поданной 26 июля 1988 г., в настоящее время абандонированной, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки) и очистки его на анионообменной колонке. ПЭГ-малеимид получают путем взаимодействия монометокси-ПЭГ-амин с сульфамидом в 0,1M натрий-фосфатном буфере с pH 7,5 в течение одного часа при комнатной температуре и заменой буфера на фосфатный буфер с pH 6,2. Затем hGH со свободным дополнительным цистеином смешивают в течение одного часа и конечную смесь разделяют на колонке Mono Q, так же как и в случае ПЭГилированного Me-ПЭГ-альдегидом hGH.

Поскольку сложноэфирные связи являются в химическом и физиологическом отношении лабильными, может оказаться предпочтительным применять в реакции конъюгации ПЭГ-реагент, который не содержит сложноэфирную функциональную группу. Например, карбаматная связь может быть получена путем взаимодействия ПЭГ-монометилового эфира с фосгеном для получения ПЭГ-хлорформиата. Этот реагент затем может быть использован аналогичным образом, как и эфир НГС для функционализации аминокислот боковых цепей лизина. В другом примере мочевиновая связь может быть получена путем взаимодействия аминокислоты-ПЭГ-монометилового эфира с фосгеном. Это приводит к получению ПЭГ-изоцианата, который будет взаимодействовать с аминокислотными группами лизина.

Предпочтительный способ получения ПЭГ-hGH, не включающий использование отщепляемого сложного эфира в ПЭГ-реагенте, состоит в следующем. Метоксиполиэтиленгликоль превращают в карбоновую кислоту путем титрования с натрийнафталином для получения алкоксида, последующей обработки бромэтилацетатом для образования этилового эфира, последующего гидролиза с помощью обработки гидроксидом натрия и водой до соответствующей карбоновой кислоты, как описано у Buckmann и др.,

Macromol. Chem., 182: 1379-1384 (1981). Образовавшуюся карбоновую кислоту затем превращают в ПЭГ-N-гидроксисукцинимидовый эфир, пригодный для ацилирования hGH путем взаимодействия образовавшейся карбоновой кислоты с дициклогексилкарбодиимидом и NГС в этилацетате.

Образовавшийся реагент НГС-ПЭГ затем подвергают взаимодействию с 12 мг/мл GH, используя 30-кратное молярное превышение над GH, в натрий-боратном буфере с pH 8,5 при комнатной температуре в течение одного часа и вносят на Q-сефарозную колонку в трис-буфере и элюируют с помощью солевого градиента. Затем его вносят на вторую колонку (фенил Toyopearl, уравновешенную в 0,3 М натрий-цитратном буфере с pH 7,8. ПЭГилированный hGH затем элюируют с помощью обратного солевого градиента, объединяют в пул и осуществляют замену буфера с помощью обессоливающей колонки G25 в манните, глицине и натрий-фосфатном буфере с pH 7,4 для получения соответствующей композиции ПЭГ7-hGH.

ПЭГилированные молекулы hGH и комплекс hGH с hGH -связывающим протеином может быть охарактеризован с помощью ПААГ-ДСН, гель-фильтрации, ЯМР, триптического картирования, жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии и биологического исследования *in vitro*. Степень ПЭГилирования целесообразно сначала определять с помощью ПААГ-ДСН и гель-фильтрации, а затем анализировать с помощью ЯМР, который имеет специфический резонансный пик для метилированного водорода ПЭГ.

Количество ПЭГ-групп в каждой молекуле может быть подсчитано на основе ЯМР -спектра или масс-спектрометрии. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии 10%-ного ДСН проводят соответственно в 10 mM трис-HCL-буфере с pH 8,0, с использованием в качестве элюирующего буфера 100 mM NaCl. Для определения того, какой остаток ПЭГилирован, можно использовать триптическое картирование. Так, ПЭГилированный hGH разлагают с помощью трипсина при соотношении (в мг) протеина и фермента 100:1 при 37°C в течение 4 часов в растворе, содержащем 100 mM ацетата натрия, 10 mM трис-HCl, 1 mM хлорида кальция, при pH 8,3 и подкисляют до pH<4 для прекращения разложения перед разделением с помощью ЖХВД с использованием колонки Nucleosil C-18 (4,6 мм x 150 мм, 5 мкм, 100 E). Хроматограмму сравнивают с таковой для неПЭГилированного исходного материала. Затем каждый пик анализируют с помощью масс-спектрометрии для определения размера фрагмента в пике. Фрагмент(ы), имеющий(е) ПЭГ-группы, обычно не остаются на колонке для ЖХВР после введения и исчезают из хроматографа. Такое исчезновение из хроматографа свидетельствует о ПЭГилировании этого конкретного фрагмента, который должен содержать по крайней мере один остаток лизина.

ПЭГилированный hGH затем может быть исследован на способность связываться с hGH-связывающим протеином (hGHBP) обычными способами.

Различные использованные способы ПЭГилирования давали различные виды ПЭГилированного hGH дикого типа с точными молекулярными массами 35 кДа, 51 кДа, 250 кДа и 300 кДа, устанавливаемыми с помощью гель-хроматографии, которые должны быть близки к их нативному гидродинамическому объему. Они были обозначены как ПЭГ1-hGH, ПЭГ2-hGH, ПЭГ3-hGH и ПЭГ7-hGH соответственно. По результатам триптического картирования ПЭГ1-hGH и ПЭГ2-hGH оба имели N-концевой 9-аминокислотный фрагмент, отсутствующий на хроматограмме, и вероятно ПЭГилированный, что можно подтвердить масс-спектрометрией больших молекулярных продуктов, обнаруженных в проходящем потоке жидкостного хроматографа. На основе молекулярной массы, полученной с помощью ПААГ-ДСН, ПЭГ1-hGH может иметь одну молекулу ПЭГ на N-концевом амине, а ПЭГ2-hGH может иметь две молекулы ПЭГ на N-концевом амине, образуя третичный амид. На основании данных ЯМР установлено, что ПЭГ3-hGH имеет приблизительно 5 ПЭГ-групп на молекулу, а на триптической карте отсутствуют по крайней мере пять пептидных фрагментов, что позволяет предположить, что они ПЭГилированы. На основании данных масс-спектрометрии можно предположить, что молекула ПЭГ7-hGH имеет 6-7 ПЭГ-групп на молекулу.

Сайтами для включения ПЭГ- групп в hGH являются N-концевой метионин или фенилаланин, лизин 38, лизин 41, лизин 70, лизин 140, лизин 145, лизин 158 и лизин 168, и они являются предпочтительными остатками для такой конъюгации. Два лизина, которые, по-видимому, не ПЭГилировались, представляли собой лизин 115 и лизин 172.

GH также целесообразно вводить с помощью систем с непрерывным высвобождением. Примерами композиций с непрерывным высвобождением, приемлемыми для данного случая, являются полупроницаемые полимерные матрицы в виде изделий определенной формы, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с непрерывным высвобождением включают полилактиды (патент США 3773919; EP 58481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman и др., Biopolymers, 22: 547-556 [1983]), поли(2-гидроксиэтилметакрилата) (Langer и др., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 [1981], и Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 [1982]), этиленвинилацетата (Langer и др., см. выше) или поли-D-(-)-3-гидроксимасляной кислоты (EP 133988), или микросферы PLGA. Композиции с непрерывным высвобождением GH также включают захваченный липосомой GH. Липосомы, содержащие GH, получают известными способами: DE 3218121; Epstein и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang и др.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 134949; EP 142641; заявка на патент Японии 83-118008; патенты США 4485045 и 4544545 и EP 102324. Обычно липосомы являются малыми (примерно 200-800Е) однослойными образованиями, в которых содержание липидов выше, чем приблизительно 30 мол. процентов холестерина, причем выбранные пропорции можно соответствующим образом откорректировать для оптимальной терапии. Кроме того, биологически активная композиция с непрерывным высвобождением может быть получена из аддукта GH, ковалентно связанного с активированным полисахаридом, как описано в патенте США 4857505, выданном 15 августа 1989 г. Кроме того, в патенте США 4837381 описана микросферическая композиция из жира или воска или их смеси, а также GH с медленным высвобождением.

IGF-I может быть введен с помощью любых способов, включая инъекции (однократные или многократные, например, 1-4 раза в день) или инфузии. Так же как и в случае с GH, IGF-I может быть включен в фармацевтическую композицию таким образом, чтобы обеспечивалось непрерывное присутствие в крови в течение курса лечения, как описано выше для GH. В этом случае он может быть ковалентно присоединен к полимеру или включен в композицию с непрерывным высвобождением, как описано выше.

Кроме того, IGF-I вводят соответственно вместе с одним любым или несколькими из связывающих его протеинов, например, с известными в настоящее время, т.е. IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 или IGFBP-6. Для введения IGF-I также может быть связан с рецептором или антителом или фрагментом антитела. Предпочтительным связывающим протеином для IGF-I в настоящем изобретении является IGFBP-3, который описан в Международной заявке WO 89/09268, опубликованной 5 октября 1989 г. и у Martin и Baxter, J. Biol. Chem., 261: 8754-8760 (1986). Этот гликозилированный протеин IGFBP-3, как было установлено с помощью нередуцированного электрофореза в ПААГ-ДСН, является кислотоустойчивым компонентом с молекулярной массой приблизительно 53 кДа гликопротеинового комплекса с молекулярной массой 125-150 кДа, обнаруженного в плазме человека и несущего большую часть эндогенных IGF, и также регулируется GH.

Введение IGF-связывающего протеина вместе с IGF-I может быть осуществлено с помощью способа, описанного в патенте США 5187151, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки. Вкратце IGF-I и IGFBP вводят в эффективных количествах с помощью быстрой подкожной инъекции большого объема в молярном соотношении от приблизительно 0,5:1 до приблизительно 3:1, предпочтительно приблизительно 1:1.

IGF-I, равно как и GH предпочтительно вводить путем непрерывной инфузии с исполь-

зованием, например, внутривенного или подкожного способов введения. Более предпочтительно подкожное введение как для IGF-I, так и для GH.

Для применения в терапии GH в комбинации с IGF-I должен быть приготовлен в виде композиции и дозирован в форме, согласующейся с проверенной медицинской практикой, с учетом клинического состояния конкретного пациента (прежде всего побочных эффектов лечения с применением по отдельности GH или IGF-I или замедления роста после непрерывного лечения с помощью GH), мест введения композиций IGF-I и GH, способов введения, графика введения и других факторов, известных практикующим врачам. "Эффективные количества" каждого компонента по настоящему изобретению, таким образом, определяются с учетом этих обстоятельств и представляют собой количества, которые снижают ожирение индивида в большей степени, чем этого достигают с применением такого же количества IGF-I или GH по отдельности, или прежде всего предотвращает наступление ожирения или связанных с ожирением состояний.

В качестве общей рекомендации можно предложить, чтобы вводимое парентерально суммарное фармацевтически эффективное количество как IGF-I, так и GH на дозу составляло от приблизительно 1 мкг/кг веса тела пациента/день до 10 мг/кг веса тела пациента/день, хотя, как, отмечалось выше, это в основном должно определяться терапевтической целесообразностью. Более предпочтительно эта доза составляет по крайней мере 0,01 мг/кг/день и для людей более предпочтительно она составляет для каждого гормона приблизительно 0,01-1 мг/кг/день. В случае непрерывного введения IGF-I и GH обычно применяют со скоростью дозирования приблизительно от 1 мкг/кг/час до приблизительно 50 мкг/кг/час, либо с помощью 1-4 инъекций в день, либо с помощью непрерывных подкожных инфузий с использованием, например, мининасоса. Можно также применять внутривенный баллон с раствором. Ключевым фактором при выборе приемлемой дозы является результат, полученный при измерении снижения общего веса тела или отношения количества жира к массе тела без жира либо другие критерии, позволяющие оценивать степень контроля или предотвращения ожирения или предупреждения состояний, связанных с ожирением, как это представляется целесообразным лечащему врачу.

Следует отметить, что при назначении лечачими врачами определенных дозировок как IGF-I, так и GH, необходимо принимать во внимание известные побочные эффекты лечения этими гормонами. Для hGH такие побочные эффекты включают задержку натрия и увеличение внеклеточного объема (Ikko и др., Acta Endocrinol. (Copenhagen), 32: 341-361 [1959]; Biglieri и др., J. Clin. Endocrinol. Metab. 21: 361-370 [1961]), равно как гиперинсулинемию и ги-

пергликемию. Одним из основных побочных эффектов IGF-I является гипогликемия. См., например, Guler и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2868-2872 (1989). Поэтому комбинация IGF-I и GH может привести к снижению нежелательных побочных эффектов обоих агентов (например, гипогликемии в случае IGF-I и гиперинсулинизма в случае GH) и к восстановлению уровня GH в крови, секрецию которого подавляет IGF-I.

Согласно одному из примеров выполнения изобретения для парентерального введения обычно готовят композиции IGF-I и GH путем смешения каждого компонента необходимой степени чистоты в виде стандартной дозируемой пригодной для инъекции формы (раствора, суспензии или эмульсии) с фармацевтически приемлемым носителем, т.е. с нетоксичным для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и совместимым с другими ингредиентами композиции. Например, предпочтительно композиция не должна включать окислители и другие соединения, известные своей способностью разрушать полипептиды.

Обычно композиции получают путем смешения каждого из IGF-I и GH до однородности с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями или с ними обоими. Затем при необходимости продукт формируют в виде требуемой композиции. Предпочтительно носитель представляет собой парентеральный носитель, более предпочтительно раствор, изотоничный с кровью реципиента. Примеры таких носителей-наполнителей включают воду, физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Также применимы по изобретению неводные наполнители, такие, как нелетучие масла и этилолеаты, а также липосомы.

Носитель может содержать небольшие количества добавок, таких, как вещества, повышающие изотоничность и химическую стабильность. Такие материалы нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие, как фосфатный, цитратный, сукцинатный, на основе уксусной кислоты и других органических кислот или их солей; антиокислители, такие, как аскорбиновая кислота; полипептиды с низкой молекулярной массой (менее, чем приблизительно десять остатков), например, полиаргинины или трипептиды; протеины, такие, как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие, как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие, как глицин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота или аргинин; моносахариды, дисахариды и другие углеводороды, в том числе целлюлозу и ее производные, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие, как ЭДТК; сахарные спирты, такие, как маннит или сорбит; противоионы, такие, как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие, как полисорбаты, полуксамеры или ПЭГ.

Обычно каждый из IGF-I и GH включают в композицию по отдельности с такими носителями в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 100 мг/мл, предпочтительно 1-10 мг/мл при значениях pH приблизительно от 4,5 до 8. Полномасштабный IGF-I обычно стабилен при значениях pH не выше приблизительно 6,0; des(1-3)-IGF-I стабилен при значениях pH приблизительно от 3,2 до 5; hGH стабилен при более высоких значениях pH, например, при 7,4-7,8. Очевидно, что применение определенных вышеупомянутых эксципиентов, носителей или стабилизаторов будет приводить к образованию солей IGF-I или GH.

Кроме того, IGF-I и GH, предпочтительно полномасштабный IGF-I, могут быть включены в композицию вместе с приемлемым носителем-наполнителем для образования фармацевтической композиции, которая в предпочтительном варианте не содержит клеток. В одном из примеров выполнения изобретения выбор буфера, применяемого для композиции, будет зависеть от того, будет ли композиция использована сразу после смешения либо будет храниться для последующего применения. При использовании сразу после смешения смесь полномасштабного IGF-I и GH может быть включена в композицию с маннитом, глицерином и фосфатным буфером с pH 7,4. Если эта смесь подлежит хранению, ее включают в композицию с буфером, pH которого приблизительно равен 6, таким, как, цитратный буфер, с поверхностно-активным веществом, увеличивающим растворимость GH при таком значении pH, таким, как 0,1%-ный полисорбат 20 или полуксамер 188. Конечный препарат может представлять собой жидкость или лиофилизированный твердый продукт.

IGF-I и GH, применяемые для терапевтического введения, предпочтительно должны быть стерильными. Стерильность легко достигают путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны (например, мембраны с размерами пор 0,2 мкм). Терапевтические композиции IGF-I и GH обычно помещают в контейнер со стерильным приемником, например, в баллон с раствором для внутривенного применения или в пузырек с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Обычно IGF-I и GH должны храниться в контейнерах в виде стандартной дозы или многократной дозы, например, в запечатанных ампулах или пузырьках, в виде водного раствора или лиофилизированной композиции для восстановления. В примере приготовления лиофилизированной композиции пузырьки объемом 10 см³ наполняют 5-ю мл простерилизованных с помощью фильтрации 1%-ных (в отношении массы к объему) водных растворов IGF-I и GH и образовавшуюся смесь подвергают лиофилизации. Раствор для инфузии получают путем восстановления лиофилизированных IGF-I и GH, применяя бактериостатическую воду для инъекций.

Лечение с помощью GH и IGF-I может осуществляться без использования ограниченного рациона питания либо с ним, таким, как ограничение ежедневного потребления пищи или калорий, в той мере, как это требуется для конкретного пациента.

Кроме того, GH и IGF-I применяют соответственно в комбинации с другими методами лечения, предназначенными для борьбы или предупреждения ожирения. Пригодные для этой цели вещества включают, например, гормоны (катехоламины, глюкагон, адренотропный гормон (АСТН)); клофибрат; галогенат; цинхокаин; хлорпромазин; лекарства, подавляющие аппетит путем воздействия на норадренергические нейромедиаторы, например, мазиндол или производные фенэтиламина, такие, как, фенилпропаноламин, диэтилпропион, фентермин, фендиметразин, бензфетамин, амфетамин, метамфетамин и фенметразин; лекарства, оказывающие воздействие на нейромедиаторы серотонина, например, фенфлурамин, триптофан, 5-гидрокситриптофан, флуокситин и сертралин; лекарства центрального действия, например, налоксон, нейропептид-У, галанин, кортикотропин - высвобождающий гормон и холецистокинин; холинергический агонист, такой, как пиридостигмин; сфинголипид, такой, как лизосфинголипид или его производные (ЕР 321287, опубликованный 21 июня 1989 г.); термогенные лекарства, такие, как тироидный гормон; эфедрин; бета-адренергические агонисты, лекарства, влияющие на желудочно-кишечный тракт, такие, как ингибиторы ферментов, например, тетрагидролипостатин, неперевариваемую пищу, такую, как полиэфир сахарозы, и ингибиторы опорожнения желудка, такие, как треохлорлимонная кислота или ее производные; β -адренергические агонисты, такие, как изопротенерол и йохимбин; аминофиллин для усиления эффектов йохимбина, схожих с действием β -адренергического нейромедиатора, лекарство, являющееся α_2 адренергическим блокатором, такое, как клонидин либо индивидуально, либо в комбинации с гормоном роста, высвобождающим пептид (патент США 5120713, выданный 9 июня 1992 г.); лекарства, которые оказывают влияние на абсорбцию в кишечнике, такие, как бигуаниды, например, метформин и фенформин; наполнители, такие, как метилцеллюлоза; лекарства, блокирующие метаболизм, такие, как гидроксцитрат; прогестерон; агонисты холицистокинина; маленькие молекулы, имитирующие кетокислоты; агонисты гормона, высвобождающего кортикотропин; схожее с алкалоидами спорыньи соединение, ингибирующее пролактин, для снижения накопления жира в организме (патент США 4783469, выданный 8 ноября 1988 г.); бета-3-агонисты; бромкриптин; антагонисты опиодных пептидов; антагонисты нейропептида У; антагонисты глюкостероидного рецептора; агонисты гормона роста, их комбинации и т.д. Они включают все

лекарства, описанные у Bray и Greenway, Clinics in Endocrinol. and Metabol., 5: 455 (1976).

Эти вспомогательные агенты могут применяться одновременно, до или после введения GH и IGF-I и могут применяться тем же самым или другим способом по сравнению с введением GH и IGF-I.

Ниже изобретение более подробно поясняется с помощью примеров. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Все литературные источники и патенты включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Пример I

Разработка новой модели вызванного диетой ожирения на животных и исследование влияния схемы введения GH на липолитическое уменьшение веса

Введение

Предметом данных исследований является разработка новой модели вызванного диетой ожирения у животных и сравнение на такой модели воздействий различных схем введения GH на состав организма, прежде всего на количество жира в организме. Современные обзоры данных, касающихся человека (Jorgenson, см. выше, стр. 190), показывают, что инъекции GH могут вызывать снижение количества жира в организме. Однако для человека не было сделано систематических попыток (сходных с исследованиями по оптимизации стимулирующих рост воздействий GH) определить оптимальные режимы доз для липолитических воздействий GH.

Недавно была обнаружена мутантная линия крыс Dwarf (dw/dw), для которой было установлено, что характеризуется недостатком гипофизного GH, но, по-видимому, имеет нормальные количества других гипофизных гормонов. См., например, Charlton и др., J. Endocr., 119: 51-58 (1988); Skottner и др., Endocrinology, 124: 2519-2596 (1989). Основным интересом при этом представляло определение, будет ли диета с высоким содержанием жира вызывать ожирение у крыс линии Dwarf (dw/dw). Кроме того, представляло интерес определение, было ли ожирение связано с индукцией устойчивости к инсулину и/или IGF-I. Кроме того, страдающие ожирением крысы линии dw/dw могут служить моделью болезни человека, прежде всего диабета типа II, который связан с устойчивостью к инсулину и ожирением.

Линия крыс Dwarf (dw/dw) была выбрана вследствие врожденного недостатка у нее GH, а также потому, что дефицит GH связан с ожирением у животных и человека. Линия крыс dw/dw не является линией с естественной склонностью к ожирению подобно классической модели - склонной к ожирению линии мышей ob/ob. См., например, Mayer и др., Endocrinology, 52: 54-61

(1953). Крысы линии dw/dw имеют низкое содержание GH в крови и, следовательно, низкое содержание в крови IGF-I, поэтому они потенциально являются хорошими животными-моделями для изучения воздействий GH и IGF-I. См., например, Skottner и др., 1989 выше.

Были выбраны самки крыс, т.к. у них поддерживается более высокое процентное содержание жира в организме, и они обычно более склонны к ожирению, чем самцы крыс. См., например, Shemmel и др., *Anal. Rec.*, 166: 437-446 (1969). Традиционные диеты, обычно используемые для кормления лабораторных животных, основаны на использовании зерна и, следовательно, имеют очень низкое содержание жира (приблизительно 5 масс.% жира). Диета с более высоким содержанием жира (и, следовательно, более близкая к диете людей в западных странах) была выбрана для того, чтобы попытаться вызвать ожирение у dw/dw-крыс.

Целью настоящих экспериментов было:

- 1) попытаться вызвать ожирение у dw/dw-крыс или у нормальных крыс с помощью диеты;
- 2) изучить устойчивость к инсулину у страдающих ожирением животных;
- 3) изучить эффективность GH в отношении снижения количества жира в организме страдающих ожирением животных;
- 4) изучить влияние схемы (доза-режим) введения GH на снижение количества жира в организме страдающих ожирением животных;
- 5) изучить влияние совместного режима питания (возвращение от диеты с высоким содержанием жира к диете с низким содержанием жира) в сочетании с различными режимами введения GH, т.е. изучить эффективность GH во время вызванного диетой снижения веса.

Эксперименты I и II

Методы и результаты

В эксперименте I сравнивали воздействие диеты с высоким содержанием жира на вес тела у dw/dw-крыс (с дефицитом GH) и нормальных крыс (с достаточным содержанием GH), а в эксперименте II подтверждали влияние диеты на вес тела и ожирение у dw/dw-крыс. Степень ожирения оценивали по массе выбранных, хорошо выраженных жировых отложений и по наличию устойчивости к инсулину.

Эксперимент I

В первом эксперименте использовали 12 самок крыс линии Dwarf (dw/dw, Simonsen Labs, Gilroy, CA) и 12 самок крыс линии Sprague-Dawley (SD, Charles River, Portage). Крысы линии Dwarf имели установившийся вес тела (100-140 г) и возраст 120 дней. Вес крыс линии SD соответствовал таковому у крыс линии Dwarf. Крысы линии SD были 40 -дневного возраста, не имели установившегося веса и весили 100-140 г.

Крыс случайным образом разделяли на четыре группы по шесть особей в каждой и их веса выравнивали для устранения неравномерности в средних начальных весах. Одну группу каждой линии кормили *ad libitum* (по желанию) в течение

29 дней обычными лабораторными кормовыми гранулами (4,5 масс.% жира и 9,6% жира по калорийности). Для двух других групп была установлена диета без ограничения потребления пищи с высоким содержанием жира (36,3 масс.% жира и 56,2 % жира по калорийности) также в течение 29 дней. Корм для диеты с высоким содержанием жира готовили путем смешения одной части растительного жира с двумя частями измельченных кормовых гранул, получая гомогенную пасту. Крыс взвешивали по крайней мере 5 раз в неделю.

В ходе первого эксперимента у крыс как линии SD, так и линии Dwarf обнаружено существенное прибавление веса. В процессе исследования у обеих групп крыс линии SD обнаружено увеличение веса тела. Однако неожиданно не было обнаружено статистически значимого различия в конечных весах тела у крыс линии SD, находившихся на жировой диете и зерновой диете (жировая диета $102,6 \pm 20,2$ г, зерновая диета $108,1 \pm 18,3$ г, $t=0,83$ по критерию Дункана (Duncan's Multiple Range test); критическое значение 2,90). Поскольку в начале эксперимента крысы линии SD не достигли зрелости или установившегося веса тела, наблюдаемый значимый прирост веса почти наверняка являлся результатом нормального роста, а не просто накопления жировой ткани.

Вес тела в обеих группах крыс линии Dwarf также возрастал в процессе исследования, однако в отличие от крыс линии SD было обнаружено четкое и постоянное различие между группами крыс линии Dwarf, питающимися кормом для жировой и зерновой диеты. Это различие стало очевидным уже в первый день при использовании различных диет (жировая диета $3,2 \pm 1,7$ г, зерновая диета $-1,0 \pm 3,3$ г, $t=4,42$ по критерию Дункана; критическое значение 2,90) и сохранялось через 15 дней (жировая диета $23,3 \pm 12,5$ г, зерновая диета $10,4 \pm 5,3$ г, $t=4,12$ по критерию Дункана; критическое значение 2,90) и до конечного, 29-го дня эксперимента (жировая диета $37,0 \pm 18,7$ г, зерновая диета $13,3 \pm 6,4$ г, $t=3,7$ по критерию Дункана; критическое значение 2,90). Поскольку крысы линии Dwarf имели установившийся вес тела к началу эксперимента, наиболее вероятно, что прибавление их веса тела было следствием накопления жировой ткани.

Эксперимент II

Во втором эксперименте использовали четыре группы по шесть крыс линии Dwarf в каждой для того, чтобы повторить и подтвердить полученные выше результаты и измерить чувствительность к инсулину и массу жира. Крысы, находившиеся на жировой диете, снова начинали сразу же прибавлять в весе. После нахождения на диетах в течение 28 дней крысы, которых держали на жировой диете, имели существенно ($p < 0,001$) больший вес ($155,7 \pm 6,2$ г), чем крысы, которых держали на зерновой диете ($128,4 \pm 11,5$ г). После нахождения в течение 7 дней на различных диетах половину подопытных крыс под-

вергали тесту на толерантность к инсулину, применяя внутривенную инъекцию инсулина (0,4 ед./кг). К этому моменту не было обнаружено различия между двумя группами в отношении содержания глюкозы в крови в ответ на инъекцию инсулина.

Ожиревшим, равно как и худым крысам на 28 день вновь делали внутривенную инъекцию инсулина (0,4 ед./кг) в качестве теста на толерантность к инсулину. Для измерения содержания глюкозы в крови брали образцы крови до и после инъекции. Содержание глюкозы в крови у животных, питавшихся кормом для зерновой диеты, оказалось существенно пониженным после первой инъекции инсулина, через 20 минут оно понизилось от начального уровня $162,7 \pm 22$ мг% до $94,0 \pm 25,0$ мг%, что составило 56,9% начального содержания. Максимальное падение содержания глюкозы в крови наблюдали через 20 минут, и ее уровни начали подниматься через 40 минут. Животные, питавшиеся кормом для жировой диеты, оказались устойчивыми к указанной дозе инсулина. У них концентрация глюкозы в крови снизилась только до $89,4 \pm 2\%$ начальной концентрации (210 ± 23 мг%), причем максимальное падение отмечали к 20-й минуте. Эти различия в реакциях на инсулин между двумя группами оказались статистически значимыми, показывая, что у крыс, питавшихся кормом для жировой диеты, индуцировали выраженную устойчивость к инсулину не к 7-му, а к 28-му дню нахождения на диетах. Таким образом, по-видимому, устойчивость к инсулину зависит не от диеты, а скорее от развития ожирения.

Степень ожирения измеряли непосредственно после умерщвления животных (спустя 29 дней после нахождения на диетах с высоким или низким содержанием жира); отсекали параметриальные и ретроперитонеальные жировые подушки, взвешивали и сравнивали полученные значения между группами. Жировые подушки животных, находившихся на жировой диете, были существенно крупнее, чем жировые подушки животных, находившихся на зерновой диете. Средний вес параметриальных жировых подушек (среднее значение $\pm$ среднее квадратичное отклонение) составил $2,3 \pm 0,6$ г для животных, питавшихся кормом для зерновой диеты, и $5,2 \pm 1,4$ г для животных, питавшихся кормом для жировой диеты. Односторонний анализ расхождения для этих данных дал значение F, равное 25,57, с 1/17 степенями свободы, т.е. очень значительное различие ($p < 0,001$). Аналогичным образом средний вес ретроперитонеальных жировых подушек составил $0,9 \pm 0,4$ г для животных, питавшихся кормом для зерновой диеты, и $2,39 \pm 0,7$ г для животных, питавшихся кормом для жировой диеты. Односторонний анализ расхождения дал значение F, равное 24,67, с 1/14 степенями свободы, что снова представляет собой статистически очень большое различие.

Выводы по экспериментам I и II

Целью первого эксперимента было сравнение тенденции к развитию ожирения у крыс линии Dwarf и крыс линии SD. У крыс линии Dwarf выражено развивалось ожирение, а у крыс линии SD нет. Вероятно, нормальные эндогенные уровни GH у крыс линии SD препятствовали развитию ожирения, а низкие его уровни у dw/dw-крыс позволяли развиваться ожирению. Следовательно, можно предположить, что профилактическое лечение крыс с помощью GH будет препятствовать развитию ожирения.

Целью второго эксперимента было показать, что страдающие ожирением dw/dw -крысы со временем становились устойчивыми к инсулину вследствие развития ожирения.

Калорийность жира в диете с высоким содержанием жира была выбрана на уровне 56%, поскольку это представлялось приемлемым максимумом. По-видимому, более высокий уровень мог бы привести к нарушению белкового питания вследствие недостатка протеина в диетическом корме. Консистенция диеты при соотношении жира к зерну 1:2 также позволяла получить смесь, удобную для приготовления и питания.

Вышеприведенные исследования показали, что дефицит GH делает животных склонными к развитию ожирения. В следующей серии экспериментов исследовали, может ли GH оказать обратное воздействие на это ожирение.

Эксперименты III и IV

Условия опытов

Перед исследованием воздействия различных режимов лечения с помощью GH на страдающих ожирением dw/dw-крыс изучали воздействия такого лечения на нестрадающих ожирением dw/dw-крыс. В первом опыте использовали молодых самок dw/dw-крыс; во втором опыте использовали более взрослых зрелых самцов dw/dw-крыс.

Молодые самки крыс

У молодых (6 - 9 - недельного возраста) не страдающих ожирением самок dw/dw-крыс схема введения GH определяет анаболическую реакцию на GH. На фиг. 1 показано прибавление веса тела в течение 8 дней у таких крыс ($n=5$ особей в группе), получавших рекомбинантный hGH марки Nutropin® (5 мг на пузырек, с концентрацией 2 мг/мл в 18 мг/мл маннита, 0,68 мг/мл глицина и 5 мМ фосфатного буфера, pH 7,4) в дозе 240 мкг/день, подкожно в трех различных режимах, или получавших эксципиент для hGH (буфер на основе маннита без hGH). При данной дозе GH режим, включающий две инъекции GH в день, оказал наиболее сильное анаболическое действие, непрерывные инфузии были следующим по эффективности режимом лечения, а ежедневные однократные инъекции обладали наименьшим анаболическим действием. Уровни 20 IGF-I в сыворотке этих молодых крыс (фиг. 2), определенные через 24 часа (однократные ежедневные инъекции) или 16 часов (двукратные ежедневные инъекции) после последней инъекции GH, оказались либо подавленными (одно-

кратные ежедневные инъекции), либо увеличенными (двукратные ежедневные инъекции и инфузия с помощью мини-насоса).

Следовательно, наибольшие прибавления веса (фиг.1) были получены с помощью инфузий или двукратных ежедневных инъекций hGH и сопровождались увеличением содержания IGF-I в сыворотке.

Зрелые самцы крыс

Существенно более старых, 30 - недельного возраста, самцов dw/dw-крыс использовали для изучения воздействия схемы применения hGH на прибавление веса тела и вес жирового депо. Половое созревание крыс происходит на 5-6-й неделях, и вес тела устанавливается приблизительно к 15 - недельному возрасту, так что к 30-й неделе крыса уже достигает половой зрелости и имеет пропорции тела, присущие зрелому животному. 30-недельный самец крысы также имеет большие запасы жира в организме по сравнению с 8 - 10 - недельной крысой. Поэтому трем группам 30 - недельных самцов dw/dw-крыс вводили hGH (hGH марки Nutropin®, 5 мг на пузырек) либо путем ежедневной инъекции, либо с помощью мини-насоса или вводили эксципиент для hGH. Всех крыс кормили кормом для стандартной гранулированной зерновой диеты с низким содержанием жира. Не было обнаружено подтверждения того, что режимы лечения оказывали влияние на потребление пищи у этих молодых или более взрослых, не страдающих ожирением крыс.

Результаты (таблицы I и II) в отношении этих более взрослых, находившихся на зерновой диете не страдающих ожирением самцов крыс были сходными с таковыми для молодых крыс, т.е. инфузия hGH вызывала более сильное увеличение веса, чем ежедневные инъекции hGH (прежде всего на ранних стадиях после начала инфузии). Обработка с использованием hGH не оказывала существенного влияния на жировые депо (эпидидимальные и ретроперитонеальные). Средние веса депо фактически увеличились в количественном отношении после лечения с помощью hGH, но статистически значимых различий не было достигнуто. см. патент США 5126324 выше.

Следовательно, у зрелых, но не страдающих ожирением животных, находившихся на диете с низким содержанием жира, hGH при введении с помощью инъекции или инфузии приводил к прибавлению веса без изменения массы жировой ткани, причем при обеих схемах введения hGH, вызывающих прибавление веса, не наблюдали различного влияния на состав тела.

Кроме того, как видно из таблицы II, инфузии hGH приводили к увеличению концентраций hGNBP и IGF-I в сыворотке по сравнению с инъекциями hGH. Содержание глюкозы в сыворотке осталось без изменения, но концентрации холе-

стерина и триглицеридов существенно возросли

после инфузии hGH по сравнению с контрольными или инъектированными hGH животными.

Таблица I

Параметры тела взрослых самцов dw/dw-крыс: обработка эксципиентом, hGH (500 мкг, подкожно) путем ежедневной инъекции или инфузии

Группа	Прибавление веса тела (г) (день 4)	Прибавление веса тела (г) (день 14)	Все ретроперитонеального жира (г)	Вес эпидидимального жира (г)
Эксципиент	-7,8±5,6	-3,7±2,5	3,1±1,2	2,6±1,0
Инъекция hGH	4,0±3,4	28,1±9,2	3,5±1,8	2,9±1,1
Инфузия hGH	12,9±4,4*	31,2±13,0	4,0±1,8	3,3±1,2

Таблица II

Параметры крови взрослых самцов dw/dw-крыс: обработка эксципиентом, hGH (500 мкг, подкожно) путем ежедневной инъекции или инфузии

Группа	Сывороточный IGF-I (нг/мл)	Сывороточный hGNBP (нг/мл)	Сывороточная глюкоза (мг/дл)	Сывороточный холестерин (мг/дл)	Сывороточный триглицерид (мг/дл)
Эксципиент	154±43	11±1	130±9	75±8	118±19
Инъекция hGH	202±31	14±3	130±5	83±10	119±25
Инфузия hGH	285±41*	78±17*	134±6	133±27*	185±47*

Данные в обеих таблицах представляют собой средние значения ± средние квадратичные отклонения, n=7-8 особей в группе.

*p<0,05 в сопоставлении с hGH при введении путем инъекции.

Введение

В двух следующих исследованиях (эксперименты III и IV) самки dw/dw-крыс находились на диете с высоким содержанием жира в течение 8 недель. Оказалось, что диета с высоким содержанием жира вызывала быстрое первоначальное прибавление веса, и крысы после нахождения на жировой диете приобретали стабильное, но характеризующееся ожирением строение тела. Это заключение было сделано на основе относительно небольшого прибавления веса между 6-й и 8-й неделями с использованием диеты с высоким содержанием жира, а не на основе детального анализа состава тела. В этих исследованиях предполагается, что изучение животных, характеризующихся стабильным ожирением, а не животных, находящихся в динамической фазе возрастающего ожирения, может отражать характерное для человека состояние продолжительного стабильного ожирения (когда, как мож-

но ожидать, будет использоваться липолитическое действие лечения с применением hGH).

Следовательно, в двух последующих исследованиях получали страдающих ожирением крыс и затем обрабатывали их hGH для того, чтобы оценить его воздействие на прибавление веса тела, вес органов и размер жирового депо. Схему применения GH изучали для того, чтобы определить, является ли она важным фактором при определении липолитической активности GH.

На начальной стадии эксперимента страдающим ожирением dw/dw - крысам давали GH путем инфузии или с помощью одной или двух инъекций в день. Полагают, что так же, как в случае анаболического действия GH, липолитическое действие различных схем применения GH будет иметь сходную относительную эффективность, т.е. что две инъекции GH в день должны обладать более высокой эффективностью по сравнению с инфузией GH, которая должна быть более эффективной, чем одна инъекция GH в день. На следующей стадии изучения была сделана попытка продублировать начальную стадию (обрабатывая крыс GH и выдерживая на диете с высоким содержанием жира), а также изучить воздействие совместного режима питания (возвращая крыс к диете с низким содержанием жира) и режимов обработки с применением GH.

Эксперимент III

Шестьдесят самок dw/dw-крыс (весом 105-150 г, 90 -дневного возраста) размещали группами и кормили ad libitum диетой с высоким содержанием жира в течение 8 недель, вода также была доступна ad libitum. Через 8 недель выдерживания на этой диете наиболее тяжелых (наиболее ожиревших) 40 крыс (средний вес 185 г) выбирали для использования в последующих опытах. Затем крыс анестезировали (с помощью кетамина/ксилазина, внутривентрально) и вводили подкожно два осмотических мини-насоса типа Alza® (2002, скорость накачивания 0,46 мкл/час, фирма Alza Corporation, Palo Alto, Калифорния). Насосы наполняли либо рекомбинантным hGH (5 мг/пузырек, марка Nutropin®), либо эксципиентом для hGH. Разбавляли hGH до 22,6 мг/мл таким образом, чтобы 2 насоса могли бы поставлять 22 мкл/день с концентрацией 22,6 мкг/мкл или приблизительно 500 мг hGH в день. Для введения hGH путем инъекций готовили растворы с концентрацией hGH 5 мг/мл и 2,5 мг/мл, так что ежедневно можно было инъектировать по 100 мкл раствора с концентрацией 5 мг/мл (500 мкг/день) или можно было инъектировать дважды в день по 100 мкл раствора с концентрацией 2,5 мг/мл (2 раза по 250 мкг, также получая дозу 500 мкг/день).

Обработку нижеприведенных групп продолжали в течение 14 дней, после чего крыс умерщвляли (n=10 особей в группе):

- 1) насосы с эксципиентом, инъекции эксципиента
- 2) насосы с hGH, инъекции эксципиента
- 3) насосы с эксципиентом, одна инъекция hGH (500 мкг/день)
- 4) насосы с эксципиентом, две инъекции hGH (2x250 мкг/день)

Эксперимент IV

Самок dw/dw-крыс 70 -дневного возраста размещали группами и давали корм для диеты с высоким содержанием жира ad libitum в течение 7 недель, вода также была доступна ad libitum. Отдельную группу, состоящую из 10 крыс, выдерживали на их обычной зерновой диете. Через 7 недель выдерживания на диете с высоким содержанием жира выбирали самых тяжелых (наиболее ожиревших) 42 крысы для использования в последующих опытах. Затем крыс анестезировали (с помощью кетамина/ксилазина, внутривентрально) и вводили подкожно осмотический мини-насос типа Alza® (2ML2, скорость накачивания 5,12 мкл/час, фирма Alza Corporation, Palo Alto, CA). Насосы наполняли либо рекомбинантным hGH (5 мг/пузырек, марка Nutropin®), либо эксципиентом для hGH. Разбавляли hGH до 4,1 мг/мл. Насос 2ML2 поставлял 5,12 мкл/час или 5,12x24=122,88 мкл/день, так что при концентрации hGH 4,1 мкг/мкл количество поставляемого hGH составляло 122,88x4,12= приблизительно 500 мкг/день. Для введения hGH путем инъекций готовили раствор с концентрацией hGH 5 мг/мл, так что ежедневно можно было инъектировать по 100 мкл раствора с концентрацией 5 мг/мл (500 мкг/день).

Обработку нижеприведенных групп продолжали в течение 14 дней (n=7 особей в группе):

Диета с высоким содержанием жира в течение 7 недель и последующее содержание на диете с высоким содержанием жира:

- 1) насосы с эксципиентом, инъекции эксципиента
- 2) насосы с hGH, инъекции эксципиента
- 3) насосы с эксципиентом, одна инъекция hGH в день

Диета с высоким содержанием жира в течение 7 недель и последующий перевод на диету с низким содержанием жира (зерновую):

- 4) насосы с эксципиентом, инъекции эксципиента
- 5) насосы с hGH, инъекции эксципиента
- 6) насосы с эксципиентом, одна инъекция hGH в день

Зерновая диета в течение 7 недель и последующее содержание на зерновой диете:

- 7) насосы с hGH, инъекции эксципиента

Умерщвление и вскрытие трупов производили через 14 дней, при этом отделяли органы, включая жировые подушки, взвешивали и брали анализ крови для измерения количества метаболитов и гормонов.

Результаты экспериментов III и IV

Эксперимент III

На фиг. 3 и 4 и в таблице III показаны прибавления веса страдающих ожирением dw/dw-крыс через 14 дней. На фиг. 3 показаны прибавления веса в зависимости от времени; на фиг. 4 и в таблице III показаны окончательные прибавления веса. Статистическая значимость получен-

ных данных указана в таблице III. Обработанные эксципиентом крысы сохраняли свой вес (-5 г); если крыс ежедневно подвергали инъекциям GH, то они прибавляли в весе (21 г). Однако если GH вводили путем инфузии или с помощью двух инъекций в день, то наблюдали снижение веса (-34 или -24 г соответственно). Эти выраженные различия в весе тела в ответ на различные схемы применения GH оказались неожиданными. В частности, потеря веса тела при обработке GH оказалась противоположной ожидаемым результатам, показанным на фиг. 1 и таблице I.

На фиг. 5 и в таблице III показан вес ретроперитонеальной жировой подушки у dw/dw-крыс. Введение GH путем ежедневных инъекций в течение 14 дней в дозе 500 мкг/день/на особь несущественно снижало количество жира в организме, в том числе в ретроперитонеальном, мезентериальном или овариальном/гонадном депо, однако если крыс обрабатывали GH путем инфузии или с помощью двух инъекций GH в день, то во всех трех депо наблюдали снижение количества жира (таблица III). Такое резкое снижение количества жира в организме также отличается от результатов, показанных в таблице I для нестрадающих ожирением крыс. Следовательно, изменения в жировых депо организма проявили такие же тенденции, как и изменения веса тела в ответ на различные схемы применения GH у страдающих ожирением dw/dw-крыс.

Уровни IGF-I, GHBP, глюкозы, холестерина и триглицеридов в сыворотке dw/dw-крыс при умерщвлении приведены в таблице IV. Сывороточные уровни IGF-I у страдающих ожирением крыс возрастали в результате ежедневных однократных инъекций GH, но не изменялись в результате инфузий или двукратных ежедневных инъекций GH. Содержание GHBP в сыворотке в результате обработки осталось без изменения. Инфузии GH или ежедневные двукратные инъекции GH по сравнению с ежедневными однократными инъекциями GH оказали различные воздействия на концентрации глюкозы и триглицеридов в сыворотке.

Представляет интерес сравнить результаты обработки с помощью GH нестрадающих ожирением dw/dw-крыс (таблицы I и II) с результатами обработки страдающих ожирением крыс (таблицы III и IV). У нестрадающих ожирением крыс (таблица I) GH независимо от схемы доставки увеличил прибавление веса тела и не оказал влияния на запасы жира в организме. У страдающих ожирением крыс (таблица III) наблюдали либо прибавление веса, либо потерю веса. У нестрадающих ожирением крыс инфузия hGH увеличила уровни IGF-I, GHBP, холестерина и триглицеридов по сравнению с инъекцией hGH (таблица II). Однако у страдающих ожирением крыс уровни IGF-I и глюкозы под воздействием инфузии GH снизились по сравнению с инъекцией GH и не происходило повышения уровней GHBP, холестерина или триглицеридов (таблица IV). Очевидно, что разные режимы применения hGH

оказывают различные воздействия на ряд параметров у не страдающих ожирением и страдающих ожирением крыс.

Таблица III

Параметры тела у страдающих ожирением, находящихся на жировой диете самок dw/dw-крыс, обработанных: эксципиентом, hGH (500 мкг, подкожно) путем либо инфузии, либо однократными или двукратными ежедневными инъекциями

Группа	Прибавление веса тела (г) (день 14)	Вес ретроперитонеального жира (г)	Вес мезентериального жира (г)	Вес овариального жира (г)
Эксципиент	-5±8	4,9±1,6	2,5±0,9	4,5±2,0
Инфузия hGH	-34±21*	1,1±0,7*	1,6±0,9*	2,1±1,1
Инъекция (1 раз в день) hGH	21±13	4,5±1,7	2,8±0,9	4,6±2,1
Инъекция (2 раза в день) hGH	-24±22*	1,8±0,6*	2,1±0,9	2,6±1,0*

Таблица IV

Параметры крови у страдающих ожирением, находящихся на жировой диете самок dw/dw-крыс, обработанных: эксципиентом, hGH (500 мкг, подкожно) путем либо инфузии, либо однократными или двукратными ежедневными инъекциями

Группа	Сывороточный IGF-I (нг/мл)	Сывороточный GHBP (нг/мл)	Сывороточная глюкоза (мг/дл)	Сывороточный холестерин (мг/дл)	Сывороточный триглицерид (мг/дл)
Эксципиент	143±24	14±4	158±27	82±13	93±30
Инфузия hGH	124±72*	16±9*	93±30*	73±22	90±43*
Инъекция hGH (1 раз в день)	210±66	17±13	164±29	76±6	130±18
Инфузия hGH (2 раза в день)	103±58*	10±3	138±21*	88±19	118±28

Данные в обеих таблицах представляют собой средние значения ± среднеквадратичные отклонения, n=10 особей в группе.

*p<0,05 в сопоставлении с hGH при введении путем инъекции.

Эксперимент IV

На фиг. 6 показаны совокупные прибавления веса у dw/dw-крыс через 14 дней. Первые три группы (жировая/жировая диета) выдерживали на диете с высоким содержанием жира в течение всего опыта, три следующие группы переводили с диеты с высоким содержанием жира на зерновую диету в момент времени, когда начинали обработку GH (жировая/зерновая диета) и седьмую группу (зерновая/зерновая диета)

выдерживали на зерновой диете в течение всего опыта. GH вводили путем ежедневной инъекции или инфузии с помощью мини-насоса в течение 14 дней в дозе 500 мкг/день/особь. Крысы, которым давали корм для диеты с высоким содержанием жира или для зерновой диеты на протяжении всего эксперимента, сохранили свой вес тела в течение 14 дней, однако если крыс, которых держали на жировой диете, переводили на зерновую диету, они теряли вес (как и ожидалось). Если крыс обрабатывали с помощью ежедневных инъекций GH, то они набирали вес независимо от диеты. Следовательно, эффект перехода от диеты с высоким содержанием жира к зерновой терялся, если GH применяли путем инъекции. Однако если GH применяли при помощи инфузии, то потерю веса наблюдали независимо от диеты.

У крыс, находившихся на жировой/жировой диете и подвергавшихся инъекциям GH, вес тела увеличился (14 ± 25 г), в то время как крысы, подвергавшиеся инфузии GH, теряли вес (-44 ± 18 г, $p < 0,001$ по сравнению с инъектированными GH). У крыс, находившихся на жировой/зерновой диете и подвергавшихся инъекциям GH, вес тела также увеличился (27 ± 17 г), а крысы, подвергавшиеся инфузии GH, теряли вес (-21 ± 36 г, $p < 0,01$ по сравнению с инъектированными GH). В данном случае также обнаружены выраженные различия в весе тела в ответ на различные режимы применения GH у страдающих ожирением крыс даже в том случае, когда имел место местный режим питания.

На фиг. 7 показан вес ретроперитонеальной жировой подушки у dw/dw-крыс. Ожирение у крыс, находившихся на жировой диете, можно обнаружить при сравнении столбцов 1 и 7; средний вес депо крыс, находившихся на жировой диете, составляет 5806 мг, в то время как вес депо крыс, находившихся на зерновой диете, составляет в среднем 1137 мг (5-кратная разница в ожирении). Реакции на обработку GH оказались особенно неожиданными. Применение GH путем ежедневных инъекций в течение 14 дней в дозе 500 мкг/день/особь несущественно снижает количество жира в организме, однако если крыс обрабатывали GH путем инфузии, то происходило статистически значимое уменьшение количества жира независимо от диеты.

При жировой/жировой диете веса ретроперитонеальных подушек у подвергавшихся инъекциям GH крыс (6110 ± 3400 мг) были существенно больше ($p < 0,001$), чем веса подушек при жировой/жировой диете у крыс, подвергавшихся инфузии GH (1542 ± 1168 мг). При жировой/зерновой диете веса ретроперитонеальных подушек у подвергавшихся инъекциям GH крыс (4444 ± 2570 мг) был также больше ($p < 0,05$), чем веса подушек при жировой/зерновой диете у крыс, подвергавшихся инфузии GH (2040 ± 1075 мг). Как и в отношении изменения веса тела, обнаружены выраженные различия в количестве

жира в организме в ответ на различные режимы применения GH у страдающих ожирением крыс.

Вывод

Первый вывод, вытекающий из этих исследований, состоит в том, что воздействие GH на состав тела неожиданно оказалось зависящим от режима применения GH. Эти исследования позволяют предположить, что у людей только непрерывное присутствие GH в крови может быть эффективным для снижения количества жира в организме и для достижения потери веса у страдающего ожирением человека, что может быть достигнуто, например, с помощью частых (дважды в день или больше инъекций GH, а также с помощью непрерывной инфузии или других способов, позволяющих пролонгировать присутствие GH в крови (включая инкапсулирование GH в композицию с непрерывным высвобождением, присоединение полимера к GH, для того, чтобы пролонгировать его активность, или применение GH, соединенного со связывающим его протеином).

Выраженная реакция сывороточного IGF-I на инфузию GH, обнаруженная у не страдающих ожирением крыс, отсутствовала у страдающих ожирением крыс. Кроме того, уровни сывороточного GHBP не увеличивались при инфузии GH. Следовательно, по-видимому, у страдающей ожирением крысы при непрерывном введении GH должна быть некоторая степень устойчивости к GH (при использовании IGF-I и сывороточного GHBP в качестве маркеров). Однако липолитическая реакция на GH показывает, что устойчивость к GH не является всеобщей.

Насколько известно заявителю, данные исследования влияния кормления крыс с наследственным дефицитом GH (GHD) пищей для диеты с высоким содержанием жира выполнены впервые. Люди с GHD имеют измененную конституцию тела с увеличенным содержанием жира. См., например, Rudman, J. Amer. Geriatr. Soc., 33: 800-807 (1985). Питание кормом определенных диет страдающих ожирением самок крыс (dw/dw) представляет собой полезную модель для изучения дефицита GH, в определенной степени схожую со страдающим ожирением человеком с GHD. Следует также отметить, что с возрастом у людей развивается дефицит GH (см. Rudman, [1985], стр. 804), поэтому можно предположить, что использованная в данном случае модель с применением грызунов, может быть близка к человеку с избыточным весом, имеющим дефицит GH. Неизвестно, связано ли ожирение у людей или с относительным дефицитом GH (вследствие снижения секреции GH), или с относительной недостаточностью реактивности GH (сокращение количества GH-рецепторов или способности связывания GH-рецептора). В настоящем описании показано, что животное с генетической предрасположкой к ожирению может быстро потерять вес при соответствующем лечении с применением GH. Можно предположить, что и другие млекопитающие, которые имеют

организацию генома, обуславливающую их ожирение, также могут реагировать на соответствующее лечение с применением GH уменьшением количества жира в организме.

Пример II

Исследование влияния различных схем введения GH на липолитическое уменьшение веса

Введение

Данное исследование было проведено для определения того, могут ли различные схемы применения hGH влиять на потребление пищи страдающими ожирением самками dw/dw-крыс.

Методы

Девяносто пяти самкам dw/dw-крыс 12 - 16 - недельного возраста (Simonsen Labs, Gilroy, Калифорния) давали корм для диеты с высоким содержанием жира, состоящей из одной части растительного жира Crisco™ и 2-х частей измельченного корма для грызунов Purina®. Крыс держали на этой диете с высоким содержанием жира в целом в течение 11 недель до начала данного эксперимента. В исследовании, описанном ниже в примере III, использовали пятьдесят четыре крысы. Из оставшихся животных 23 крысы, которые приобрели наибольший вес, использовали в данном исследовании.

За 3 дня (день -3) до первой обработки (день 0) крыс сажали на диету из измельченного корма для грызунов и помещали в метаболические садки NALGE для акклиматизации перед обработкой. В данном исследовании не использовали худых контрольных животных. В день 0 крыс анестезировали с применением кетамина/ксилазина, внутривенно (125:25 мг/кг), делали дорзальный подкожный разрез и помещали подкожно один осмотический мини-насос типа Alza™ 2002 (фирма Alza Corporation, Palo Alto, Калифорния), содержащий либо hGH, либо эксципиент. Вторую группу крыс инъецировали подкожно либо hGH, либо эксципиентом, помещали на подушку с подогревом до появления способности передвигаться и затем перемещали в их исходный садок. После этого крыс инъецировали ежедневно, взвешивали ежедневно и умерщвляли на 14 день.

Использовали следующие группы: *

Группы	Инъекции	Насос
1	эксципиент	эксципиент N=7
2	hGH300мкг	эксципиент N=7
3	эксципиент	hGH300мкг N=8

*Дозы представляют собой суммарные дневные дозы

Применяли следующие реагенты: hGH марки Nutropin®, 5 мг на пузырек, и эксципиент для hGH (буфер, применяемый в hGH марки Nutropin®, эквивалент 5 мг/мл).

На 15-й день крыс умерщвляли с использованием CO₂ и собирали сыворотку и жировые депо для дальнейшего анализа и установления сырого веса.

Результаты

Вес тела

Всех крыс переводили на зерновую диету в день -3, когда их помещали в метаболические садки, что могло позволить объяснить потерю веса у контрольных животных. Изменение веса тела, как видно на фиг. 8, оказалось постоянным до дня 5. В этот момент времени крысы, которым вводили hGH путем инъекций, начинали прибавлять в весе, а те, которым вводили путем инфузии, начинали терять вес. Группа животных, которым вводили GH путем инфузий, теряла вес до приблизительно 9 дня и затем начинала снова прибавлять в весе. На 14 день контрольные крысы имели потерю веса (-12±11 г). И опять инъекции GH приводили к прибавлению веса (18,8±15 г) по сравнению с потерей веса крысами, которым вводили GH путем инфузии (-5±30 г, p<0,05 по отношению к инъекции GH).

Потребление пищи

Потребление пищи группой, подвергавшейся инфузии, как показано на фиг. 9, имеет одинаковый характер с изменением веса тела, заключающийся в том, что эти животные, как видно на чертеже, до 8 дня потребляют существенно меньше пищи, чем животные, подвергавшиеся инъекции, и животные контрольной группы. На 8 день контрольные крысы съели 8,6±3,1 г. Крысы, подвергавшиеся инъекции GH, съели существенно (p<0,05) больше пищи (9,4±4,3 г), чем крысы, подвергавшиеся инфузии GH (2,6±3,8 г). С этого момента времени крысы, подвергавшиеся инфузии GH, начали потреблять корм и к 15 дню съели количество пищи, равное таковому для группы, подвергавшейся инъекции. Следовательно, обнаружено выраженное различие между двумя режимами обработки hGH у страдающих ожирением крыс: hGH, вводимый путем инфузии, уменьшал потребление пищи, тогда как hGH, вводимый с помощью ежедневных инъекций, приводил к увеличению потребления пищи.

Жировое депо

Веса жировых депо, показанные на фиг. 10, свидетельствуют о том, что потеря веса вследствие инфузий GH, вероятно, обусловлена потерей жира. Веса жировых подушек у контрольных крыс (2,9±1,2 г) были существенно выше (p<0,05), чем таковые у крыс, подвергавшихся инфузии GH (1,5±1,2 г), но не отличались от таковых у крыс, подвергавшихся инъекции GH (2,6±0,6 г).

Физические проявления

Крысы, подвергавшиеся инфузиям hGH, быстро теряли вес, и у них снижалось потребление пищи, воды, мочеиспускание и дефекация в течение ряда дней. По-видимому, некоторые крысы были подвержены воздействию в большей степени, чем другие, но не было обнаружено выраженной зависимости между степенью первоначального ожирения или весом тела и степенью снижения аппетита или потерей веса.

Вывод

Данные об изменении веса тела показывают, что схема доставки hGH оказывает сильное

воздействие на прибавление веса тела, жировых депо и потребление пищи. Ежедневные инъекции hGH вызывали прибавление веса тела, а инфузии hGH вызывали потерю веса. Инфузия hGH также приводила к уменьшению потребления пищи до тех пор, пока вес тела и/или жировых запасов тела не достигал нового уровня, после чего возобновлялось потребление пищи. Количество потребляемой пищи животными, подвергавшимися инфузии, было значительно более низким до 8 дня. С этого момента времени крысы, подвергавшиеся инфузии GH, начали потреблять корм и к 15 дню съели количество пищи, равное таковому для группы, подвергавшейся ежедневной инъекции и незначительно отличавшееся от такового для контрольной группы. Такой же характер изменения был обнаружен для данных по прибавлению веса тела.

В противоположность сниженному поглощению пищи крысами, подвергавшимся инфузиями GH, у крыс, подвергавшихся инъекциям GH, не обнаружено изменения в потреблении пищи по сравнению с контрольными (обработанными эксципиентом) крысами. В этом случае жировые депо также уменьшались в результате инфузии GH, но не в результате инъекции GH. В целом, инфузии GH привели к снижению веса тела, анорексии и снижению количества жира в организме, в то время как ежедневные инъекции GH (при такой же дозе GH) привели к увеличению веса тела и не оказали воздействия на потребление пищи или запасы жира в организме.

Пример III

Применение GH, IGF-I или GH и IGF-I для лечения ожирения у крыс

Введение

Данное исследование было проведено с целью подтверждения воздействий различных схем применения GH и изучения их зависимости от дозы. Кроме того, данное исследование выполняли для выявления воздействий IGF-I при его применении индивидуально или совместно с GH на строение организма, общий вес тела и органов, химический состав сыворотки и уровни эндокринных гормонов у страдающих ожирением dw/dw-крыс.

Методы

Дозируемые растворы

ПЭГ7-hGH, как он определен в настоящем описании ранее, получали следующим образом. Метоксиполиэтиленгликоль превращали в соответствующий этиловый эфир путем титрования натрийнафталином для получения соответствующего алкоксида с последующим взаимодействием с этилбромацетатом. Сложный эфир обрабатывали гидроксидом натрия и водой, получая соответствующую карбоновую кислоту, α -карбоксиметил-омега-карбоксиметоксиполи(оксиэтилен). Этот процесс подробно описан у Bückmann и др., см. выше.

Очистку карбоновой кислоты осуществляли путем растворения в теплом этаноле (20 мл/г) и кристаллизации при 4°C. Продукт выделяли с

помощью фильтрации, промывали эфиром (трижды) и сушили под вакуумом. Степень функционализации определяли с помощью титрования образца в водном растворе с раствором 1N KOH и фенолфталеина в качестве индикатора. Тонкослойную хроматографию проводили в следующих условиях: элюирование с помощью метанола/ CH_2Cl_2 (3:17) и визуализация в парах йода. Соединение проявлялось в виде полосы с Rf от 0 до 0,3.

Кислоту (15 г, 3 ммоль) растворяли в этилацетате (150 мл) при нагревании. Добавляли N-гидроксисукцинимид (0,86 г, 7,5 ммоль) и дициклогексилкарбодимид (1,55 г, 7,5 ммоль) и раствор перемешивали при 30°C в течение ночи (18 часов). Продукт иногда мог осаждаться в ходе реакции, в таком случае плотную белую суспензию нагревали до тех пор, пока в растворе не оставалась только хлопьеобразная дициклогексилмочевина. Реакционную смесь фильтровали через материал для фильтрации типа Celite® для удаления мочевины и раствор выдерживали при 4°C до следующего утра, когда продукт собирали путем фильтрации, промывали холодным этилацетатом (трижды) и сушили под вакуумом, получая

омега-метоксиполи(оксиэтилен)оксиэтил-N-гидроксисукцинимид (14,7 г, 98%).

Образовавшийся в результате НГС-ПЭГ добавляли в 30 - кратном молярном избытке по сравнению с hGH к раствору, содержащему 12 мг/мл hGH в 50 mM натрий-боратном буфере с pH 8,5, и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение одного часа. Затем реакционную смесь вносили в Q-сепарозную колонку (фирма Pharmacia) в 30 mM трис-буфере с pH 7,8 и элюировали с помощью градиента NaCl. Затем полученный продукт вносили в колонку типа фенил - Toyopearl 650S, уравновешенную 0,3 M натрий-цитратным буфером с pH 7,8. ПЭГилированный hGH элюировали из колонки с помощью обратного солевого градиента от 0,3 молярного цитрата натрия с pH 7,8 до 0 молярного цитрата натрия и собирали в пул фракции, содержащие ПЭГилированный hGH соответствующего размера. Затем пул подвергали замене буфера, используя обессоливающую колонку типа G25, меняя на буфер, содержащий 0,25 M маннита, 0,02 M глицина и 5 mM фосфата натрия с pH 7,4 так, чтобы получить концентрацию 1,75 мг/мл. Далее ПЭГ7-hGH растворяли в маннитном буфере таким образом, чтобы получить окончательную концентрацию 1 мг/мл, которую использовали для крыс в данном исследовании.

Рекомбинантный человеческий GH представлял собой hGH марки Nutropin®, 5 мг на пузырек. Во всех экспериментах с IGF-I, подробно описанных в примерах, применяли рекомбинантный человеческий IGF-I [поставляемый на рынок фирмой KabiGen AB, Стокгольм, Швеция (удельная активность > 14000 ед./мг по данным радиорецепторного анализа с использованием

плацентарных мембран) или поставляемого для клинических исследований фирмой Genetech, Inc., [Южный Сан-Франциско]. В этом примере IGF-I растворяли, доводя до концентрации 18 мг/мл, в 10 mM цитратном буфере и 126 mM NaCl с pH 6,0, в то время как эксципиентом для hGH служил 5 mM фосфатный буфер.

Животные

Девяносто пять самок dw/dw-крыс 12-16-недельного возраста (Simonsen Labs, Gilroy, Калифорния) сажали на диету с высоким содержанием жира, состоящую из одной части растительного жира Crisco™ и 2 частей измельченного корма для грызунов Purina®. Десять подобранных по возрасту крыс оставляли на диете из корма для грызунов с низким содержанием жира для того, чтобы они служили в качестве контрольных худых животных. Все крысы находились на своих соответствующих диетах на протяжении всего эксперимента. Животных взвешивали еженедельно. Через 8 недель отбирали 54 животных, наиболее прибавивших в весе.

План эксперимента: *

Группы	Ежедневные инъекции	hGH-насос	IGF-I-насос
1	эксципиент	эксципиент	эксципиент
2	эксципиент	hGH, 300 мкг	эксципиент
3	эксципиент	hGH, 100 мкг	эксципиент
4	hGH 300 мкг	эксципиент	эксципиент
5	hGH 100 мкг	эксципиент	эксципиент
6	эксципиент	эксципиент	IGF-I, 216 мкг
7	эксципиент	hGH, 300 мкг	IGF-I, 216 мкг
8	hGH 300 мкг	эксципиент	IGF-I, 216 мкг
9	ПЭГ7- hGH, 100 мкг	эксципиент	эксципиент

худые 10

* Дозы указаны в мкг/день

В день -1 крыс случайным образом разделяли на 9 групп по шесть особей в каждой. В день 0 страдающих ожирением крыс анестезировали с использованием кетамина/ксилазина, внутрибрюшинно (125:25 мг/кг). Дорзальную лопаточную область выстригали и готовили к хирургическому вмешательству, используя тампон, смоченный 70%-ным изопропиловым спиртом. Делали небольшой подкожный дорзальный разрез и вводили подкожно два осмотических мини-насоса типа Alza 2002, содержащие hGH, IGF-I или эксципиент. Рану зажимали с использованием 9-миллиметровых автоматических зажимов.

Животным инъектировали подкожно либо hGH, либо эксципиент, помещали на подушки с подогревом до появления способности передвигаться и затем возвращали в их исходный садок. Крыс инъектировали, взвешивали ежедневно и умерщвляли на 14 день. Худых контрольных крыс анестезировали и подвергали имитационному хирургическому вмешательству, но не вводили мини-насосы и не подвергали инъекциям.

На 14-й день всех крыс умерщвляли с использованием CO₂ и отбирали сыворотку, селезенку, почку, печень, сердце, овариальные и

ретроперитонеальные жировые подушки и большую берцовую кость. Сыворотку, печень, овариальные жировые подушки, кожу и тушку сохраняли и замораживали. Сердце и большую берцовую кость помещали в формалин для гистологического исследования. Химический состав сыворотки определяли с помощью клинического химического анализатора типа Monarch. Содержание сывороточного инсулина измеряли с помощью радиоиммунного анализа. Общее содержание IGF-I в сыворотке измеряли с помощью радиоиммунного анализа после экстракции образцов с использованием кислоты/этанола.

Результаты

Вес тела

Крысы, которым давали корм для диеты с высоким содержанием жира, быстро прибавляли в весе в течение первых четырех недель с момента начала кормления пищей для диеты с высоким содержанием жира, однако затем прибавление веса тела имело тенденцию выходить на постоянный уровень. После 8 недель нахождения на диете с высоким содержанием жира dw/dw - крысы значительно прибавили в весе, что позволило отобрать 54 животных, которые прибавили в весе на 42-83% от их первоначального веса, в среднем на 59%, по сравнению с соответствующим диапазоном для крыс, питавшихся кормом для зерновой диеты, составлявшим 18-32%, в среднем 23%, от их первоначального веса.

На фиг. 11 показаны средние значения прибавления веса 10-ти групп крыс на 14-й день. Крысы, обработанные эксципиентом, сохранили свое состояние ожирения при отсутствии прибавки в весе или его потери (1,5±9,0 г). После 14-дневной обработки hGH путем инфузии и в комбинации с IGF-I был обнаружен очень стойкий и очень выраженный катаболический эффект сопровождавшийся средней потерей веса в течение 14 дней, составлявшей 50,2±10,0 г, что значительно больше ($p<0,05$), почти в два раза, чем в группе, получавшей путем инфузии 300 мкг только hGH (-23,8±31,1 г). IGF-I не оказал существенного воздействия на прибавление веса, хотя через 14 дней наблюдали скорее прибавление веса (10,0±4,5 г), чем потерю веса. В этом варианте инфузии низкой дозы hGH, равной 100 мкг/день, также давали прибавление веса, несущественно отличающееся от контроля, но которое было незначительным (13,2±16,1 г) по сравнению с большим прибавлением веса при введении 100 мкг/день hGH путем инъекции (30,1±18,1 г). Две дозы hGH, вводимые путем инъекции, не отличались друг от друга, но оказывали анаболический эффект, значительно отличающийся ($p<0,05$) от такового для контрольных животных. На 14-й день прибавление веса крысами, получавшими ежедневные инъекции по 100 мкг/день ПЭГ7-hGH (2,6±20 г) было значительно ниже ($p<0,05$), чем таковое у крыс, получавших ежедневные инъекции hGH.

На фиг. 12 показано прибавление веса в зависимости от времени для некоторых из этих групп. На этом чертеже заметны резкие различия между двумя режимами применения hGH и между воздействием одного GH и GH, применяемого вместе с IGF-I.

Вес органов

А. Вес сердца: Не обнаружено существенного различия между группами ни в абсолютной величине веса сердца, ни в весе сердца, выраженном в процентах от веса тела (относительный вес).

Б. Вес почек: Инфузии высоких доз hGH обнаружили тенденцию к увеличению абсолютного веса почек и резкому увеличению относительного веса почек по сравнению с контролями или животными, обработанными GH путем инъекции. Крысы, обработанные IGF-I, имели значительно более крупные почки, чем таковые у страдающих ожирением контрольных животных, но не отличались значительно от таковых у худых контрольных животных. Была обнаружена зависимость эффекта от дозы в отношении относительного размера почек у группы, подвергавшейся инфузии hGH. ПЭГ7-hGH не оказывал существенного влияния на размер почек.

В. Вес печени: Крысы, получавшие 300 мкг hGH путем инфузии, имели значительно более крупную печень по сравнению с контрольными. IGF-I не оказывал значительного воздействия по сравнению с контролем и не обладал дополнительным эффектом при введении в комбинации с hGH по сравнению с группой, обрабатываемой высокой дозой hGH путем инфузии. Инъекция hGH не оказывала значительного воздействия на размер печени.

Г. Вес селезенки: Веса селезенок крыс, получавших только IGF-I, были значительно выше, чем таковые у животных, получавших IGF-I в комбинации с инфузией hGH. Это позволяет предположить, что рост селезенки, вызванный IGF-I, блокировали путем инфузии hGH. Эти данные оказались неожиданными, поскольку ранее не было обнаружено, что воздействия IGF-I могут так резко блокироваться с помощью инфузии hGH.

Д. Вес жировых подушек: На чертежах представлены данные об абсолютном весе ретроперитонеальной жировой подушки (фиг. 13), относительном весе (фиг. 14) и абсолютном весе гонадной жировой подушки (фиг. 15). Крысы, получавшие 300 мкг hGH путем инфузии, резко теряли вес и имели значительно меньшие ($p < 0,01$) запасы жира в депо по сравнению с контролем. Инфузия 100 мкг hGH оказывала меньшее воздействие на массу жира, а жировые подушки весили существенно больше ($p < 0,01$), чем жировые подушки при инфузии высокими дозами. В противоположность этому крысы, получавшие GH путем инъекции в дозе либо 100, либо 300 мкг/день, не имели изменений в абсолютном весе ретроперитонеальных или гонадных депо.

Индивидуально IGF-I и ПЭГ7-hGH не оказывали существенного воздействия на массу жировых подушек.

Инфузия IGF-I, когда она проводилась в комбинации с инъекциями hGH, приводила к значительно ($p < 0,05$) большей потере массы жировых подушек, чем в контроле, а наиболее сильное воздействие на состав тела наблюдали при совместных инфузиях GH и инфузиях IGF-I. В этой последней группе жировая масса резко снизилась по сравнению с таковой у контрольных, питавшихся зерном крыс и была пониженной ($p < 0,05$) по сравнению с группой, получавшей только инфузию GH.

Е. Химический состав сыворотки:

1. Крысинный инсулин: В соответствии с данными, полученными с помощью дисперсионного анализа, уровни инсулина не различались статистически во всех случаях. См. фиг. 16. Однако следует заметить, что в группе, подвергавшейся совместной обработке hGH-инфузия/IGF-I, большинство животных имело концентрации инсулина $\leq 0,2$ нг/мл, что находилось на уровне разрешающей способности данного метода. Следовательно, представляется вероятным, что IGF-I снижал уровни инсулина и что инфузии GH плюс инфузии IGF-I снижали уровни инсулина даже в большей степени.

2. Сывороточный IGF-I: Инфузии GH не оказывали воздействия на концентрации сывороточного IGF-I у страдающих ожирением крыс (что подтверждают данные, приведенные в таблице IV). См. фиг. 17. Как и ожидалось, инфузии IGF-I увеличивали концентрации сывороточного IGF-I. Но эти концентрации снижались при совместном введении GH.

3. Глюкоза: Уровни глюкозы были существенно более низкими в группе, подвергавшейся hGH/IGF-I-инфузии ($59,6 \text{ мг/дл} \pm 6,3$) по сравнению с уровнями глюкозы в группе, подвергавшейся инфузии с высокой дозой hGH ($98,2 \text{ мг/дл} \pm 48,9$). См. фиг. 18. В соответствии с данными примера II потребление пищи в группе, подвергавшейся инфузии GH, вернулось к норме к 14-му дню, но уровни глюкозы остались пониженными. ПЭГ7-hGH не оказывал воздействия на сывороточную глюкозу.

4. Триглицериды: Содержание сывороточных триглицеридов оказалось существенно сниженным при совместной инфузии hGH и IGF-I. Инфузия IGF-I или только hGH не оказывали существенного воздействия на сывороточные триглицериды. Ежедневные инъекции hGH существенно повысили содержание сывороточных триглицеридов; однако когда IGF-I вводили путем инфузии совместно с инъекциями hGH, содержание сывороточных триглицеридов незначительно отличалось от такового в контроле. См. фиг. 18. ПЭГ7-hGH не оказывал воздействия на сывороточные триглицериды.

5. Холестерин: Не обнаружено существенного различия между группами. См. фиг. 18.

6. Азот мочевины: Страдающие ожирением крысы имели пониженные уровни азота мочевины крови (АМК). См. фиг. 19. Этих крыс выдерживали на диете с высоким содержанием жира, поэтому худые крысы поглощали больше протеина с точки зрения калорийности. Группы, получавшие IGF-I, имели более низкие уровни АМК, по сравнению с группами, получавшими только hGH.

7. Кальций: Содержание кальция возрастало при инфузии hGH и под воздействием ПЭГ7-hGH, но понижалось, если IGF-I давали отдельно или в комбинации с hGH. См. фиг. 19.

8. Фосфор: Содержание фосфора было высоким у всех страдающих ожирением крыс. У худых контрольных животных оно было существенно более низким. См. фиг. 19.

Вывод

Результаты, полученные в этих исследованиях, подтверждают данные примеров I и II о том, что непрерывное ведение hGH животным, страдающим ожирением в результате определенной диеты, обладает липолитическим действием и приводит к резкой потере веса тела. В противоположность этому такая же доза GH, вводимая путем ежедневной инъекции, приводит к увеличению веса тела и не обладает чисто липолитическим действием. Данные исследования показывают, что эффект зависит от дозы.

Кроме того, IGF-I применяли в комбинации с hGH, чтобы определить, будет ли IGF-I обладать антагонистическим действием по отношению к липолитическому эффекту инфузий hGH. Неожиданно было обнаружено, что указанная комбинация оказалась даже более эффективной с точки зрения липолитического действия, чем только GH, прежде всего при применении GH путем инфузии.

На не страдающих ожирением животных инфузии IGF-I и инъекции GH оказывают аддитивное анаболическое действие, но комбинация IGF-I с инфузиями GH не обладает аддитивным анаболическим действием. См. патент США 5126324 выше. Следовательно, оказалось неожиданным, что комбинация IGF-I и GH (инфузии IGF-I и инфузии GH или инъекции GH) вызывала липолитическое действие у страдающих ожирением млекопитающих. Особенно неожиданным оказалось выраженное синергистическое действие инфузии GH и инфузии IGF-I на потерю веса и массу жировой ткани, обнаруженное у страдающих ожирением крыс.

В примере I показано, что страдающие ожирением dw/dw - крысы становятся устойчивыми к инсулину. GH считается "диабетогенным", т.е. приводящим к устойчивости к инсулину. Следовательно, введение GH, прежде всего вместе с IGF-I, страдающим ожирением животным, у которых падает уровень глюкозы в крови (а не поднимается) и падает уровень инсулина (а не поднимается), оказывает противоположное воздействие по сравнению с ожидаемым для лечения болезни.

Исходя из полученных в данном случае неожиданных результатов, можно ожидать, что снижение количества жира в организме до уровня, близкого к уровню, предшествующему ожирению, восстановит чувствительность к инсулину, так что страдающим ожирением людям, подвергающимся лечению инсулином, соответствующее введение GH и IGF-I, как описано в настоящей заявке, может позволить уменьшить или прекратить введение инсулина. Следовательно, можно ожидать, что лечение с помощью GH и IGF-I будет предупреждать или предотвращать развитие человеческого диабета типа II у страдающего ожирением пациента.

Правомерно предположить, что данные, полученные в данном случае на крысах, можно экстраполировать на лошадей, коров и других млекопитающих, корректируя вес тела этих млекопитающих в соответствии с признанными ветеринарными и клиническими характеристиками. Используя стандартные протоколы и методики, ветеринар или лечащий врач должен быть способен регулировать дозы, режимы и способ введения IGF-I и GH и их вариантов, чтобы достичь максимальных эффектов у конкретного подлежащего лечению млекопитающего. Вероятно, люди должны реагировать подобным же образом и проявлять реакцию, аналогичную описанной ниже в примере IV.

Пример IV

Применение GH, IGF-I или GH и IGF-I для лечения пациентов-людей

Клинические данные были получены на больных СПИДом мужчинах, средний возраст которых составлял 39 лет, при использовании только IGF-I, только GH и совместно GH и IGF-I по сравнению с контролем. В этих исследованиях IGF-I, полученный и приготовленный аналогично описанному в примере III, вводили подкожно пациентам, больным СПИДом, в дозе по 5 мг дважды в день (примерно 80 мкг/кг дважды в день в расчете на средний вес 60 кг). GH, полученный и приготовленный аналогично описанному в примере I, вводили подкожно пациентам, больным СПИДом, в дозе по 1,4 мг в день (примерно 23 мкг/кг/день в расчете на средний вес 60 кг). Пациентов лечили в соответствии с этим протоколом в течение 6-12 недель.

После лечения изменения массы жира (кг) по сравнению с исходным состоянием каждого пациента измеряли с использованием метода двойной энергетической абсорбциометрии в рентгеновских лучах (сокращенно англ. DEXA), хорошо зарекомендовавшего себя метода измерения состава тела человека. Вначале в каждой группе было по 15 больных, однако количество пациентов, оставшихся на лечении спустя 12 недель, уменьшилось до 9 в контрольной группе, до 6 в GH-группе, до 4 в IGF-I-группе и до 6 в GH/IGF-I-группе.

Это исследование показало, что после 12-ти недель лечения комбинацией IGF-I и GH оно привело к увеличению в среднем массы тела без

учета жира приблизительно на 7 фунтов при одновременной потере жира. В наиболее выраженном случае пациент прибавил 3 кг к массе тела без учета жира, но потерял 1 кг жира. Лечение с помощью только IGF-I не привело к изменениям по сравнению с плацебо, в то время как лечение с помощью только GH привело к небольшому увеличению массы тела без потери жира. Результаты, приведенные на диаграмме на фиг. 20, и необработанные данные, представленные в таблице 5, показывают, что при использовании комбинированного лечения получали наибольшую потерю массы жира, что позволяет предположить наличие синергистического эффекта в отношении потери веса, когда hGH и

IGF-I применяют совместно в течение 12 недель. Подобный эффект наблюдали после 6 недель лекарственной терапии.

Таблица V

Масса жира после 12 - недельного гормонального лечения

Плаце- бо±CO*	GH±CO	IGF-I±CO	GH-IGF-I±CO
0,00±0,81	0,00±0,83	-0,20±0,80	-1,8±1,94

* CO обозначает среднеквадратичное отклонение.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения ожирения у млекопитающего или его предупреждения, включающий введение млекопитающему эффективного количества инсулиноподобного фактора роста IGF-I и гормона роста.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что млекопитающим является человек.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что человек болен диабетом типа II и потребность человека в инсулине снижается благодаря применению гормона роста и IGF-I.

4. Способ по п.2, отличающийся тем, что гормон роста представляет собой человеческий с естественной последовательностью зрелый гормон роста.

5. Способ по п.2, отличающийся тем, что IGF-I представляет собой человеческий с естественной последовательностью зрелый IGF-I.

6. Способ по п.4, отличающийся тем, что IGF-I представляет собой человеческий с естественной последовательностью зрелый IGF-I.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что введение IGF-I осуществляют с помощью непрерывной инфузии.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что IGF-I содержится в композиции с непрерывным высвобождением.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что введение гормона роста осуществляют путем инъекции.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что гормон роста вводят таким образом, чтобы в течение периода его введения в крови млекопитающего поддерживать постоянной его терапевтически эффективную концентрацию.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что введение гормона роста осуществляют путем непрерывной инфузии.

12. Способ по п.10, отличающийся тем, что гормон роста содержится в композиции с непрерывным высвобождением.

13. Способ по п.10, отличающийся тем, что гормон роста ковалентно связан через максимум 10 аминокислотных остатков с водорастворимым полимером, выбранным из группы, состоящей из гомополимеров полиэтиленгликоля и полиоксиэтиленполиолов.

14. Способ по п.10, отличающийся тем, что гормон роста ковалентно связан с полиэтиленгликолем через 2-8 остатков лизина гормона роста.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что гормон роста применяют со связывающим гормоном роста протеином.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что эффективное количество гормона роста составляет по меньшей мере 0,01 мг/кг/день.

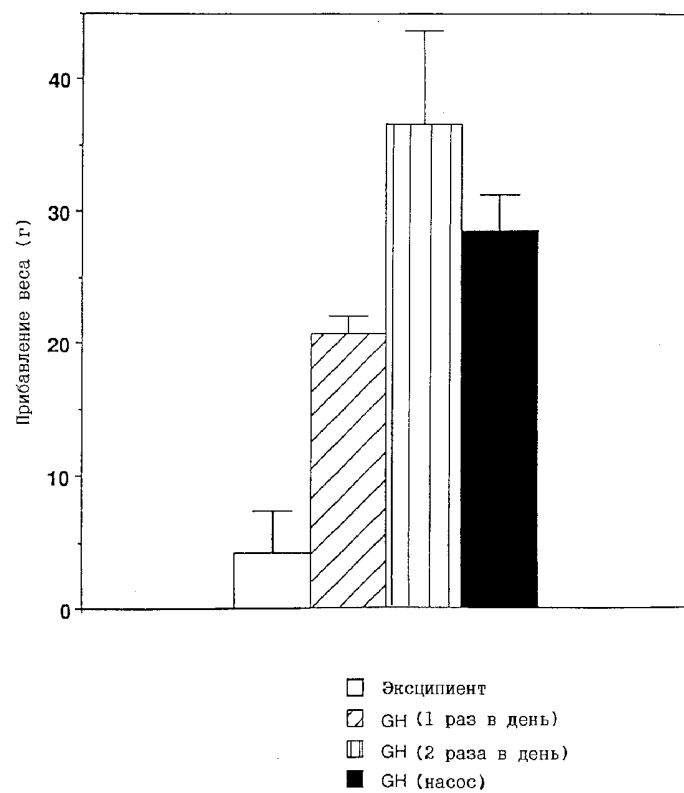
17. Способ по п.1, отличающийся тем, что эффективное количество IGF-I составляет по меньшей мере 0,01 мг/кг/день.

18. Способ по п.1, отличающийся тем, что гормон роста и IGF-I вводят отдельно.

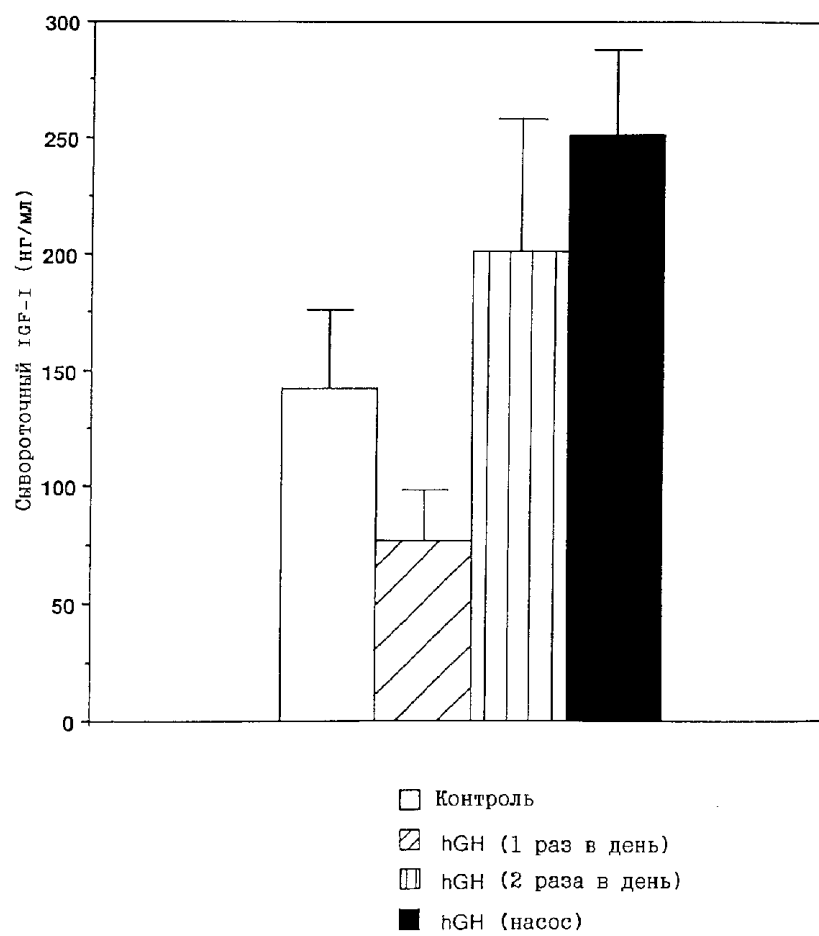
19. Способ по п.1, отличающийся тем, что гормон роста и IGF-I вводят в виде единой композиции.

20. Способ по п.1, отличающийся тем, что IGF-I вводят с IGF- связывающим протеином.

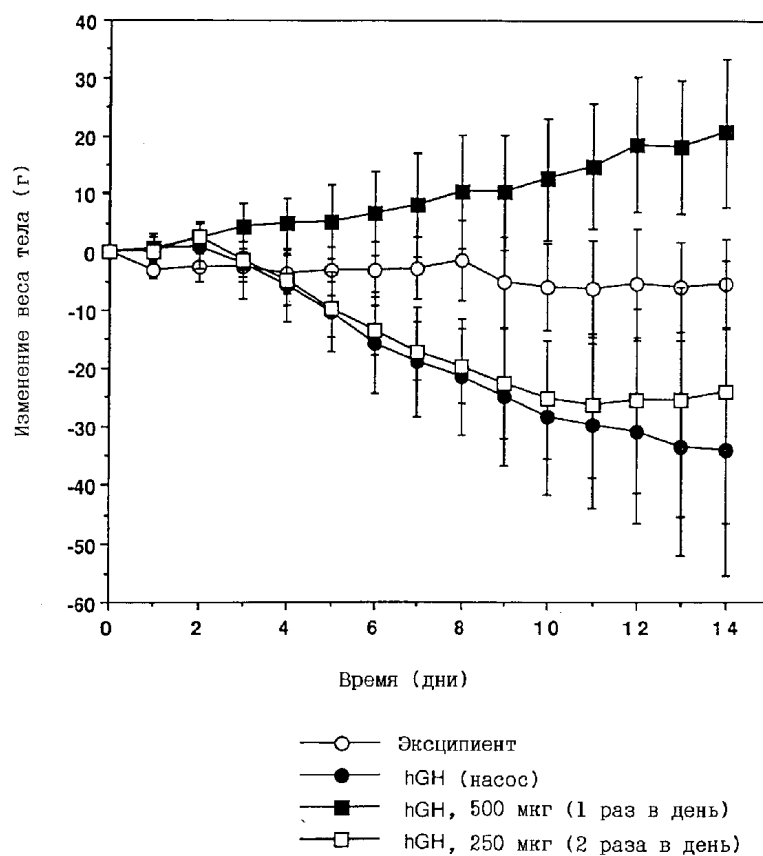
21. Применение IGF-I и гормона роста при изготовлении лекарства для лечения или предотвращения ожирения.



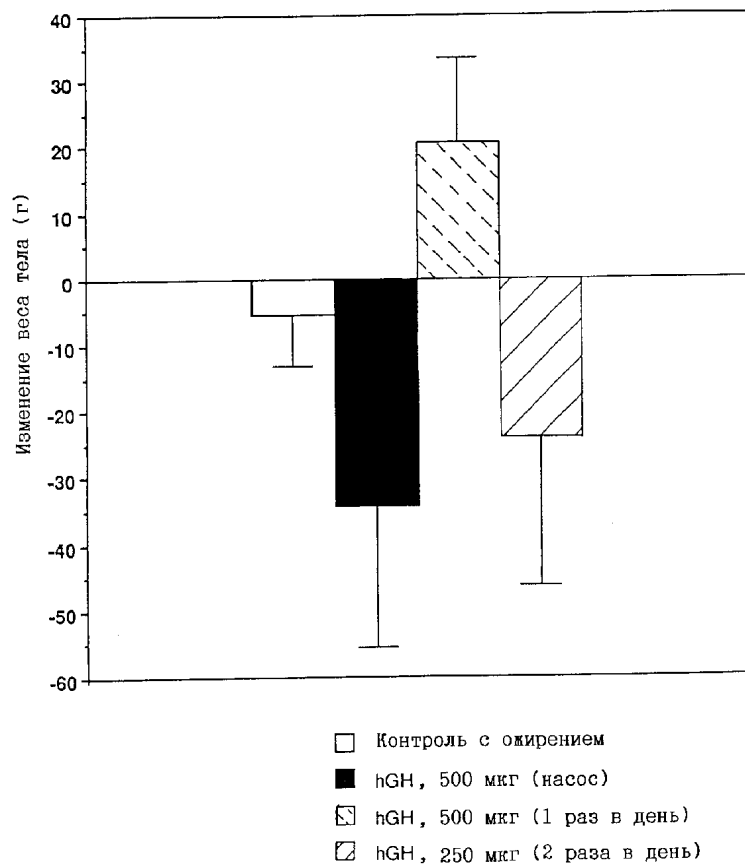
Фиг. 1



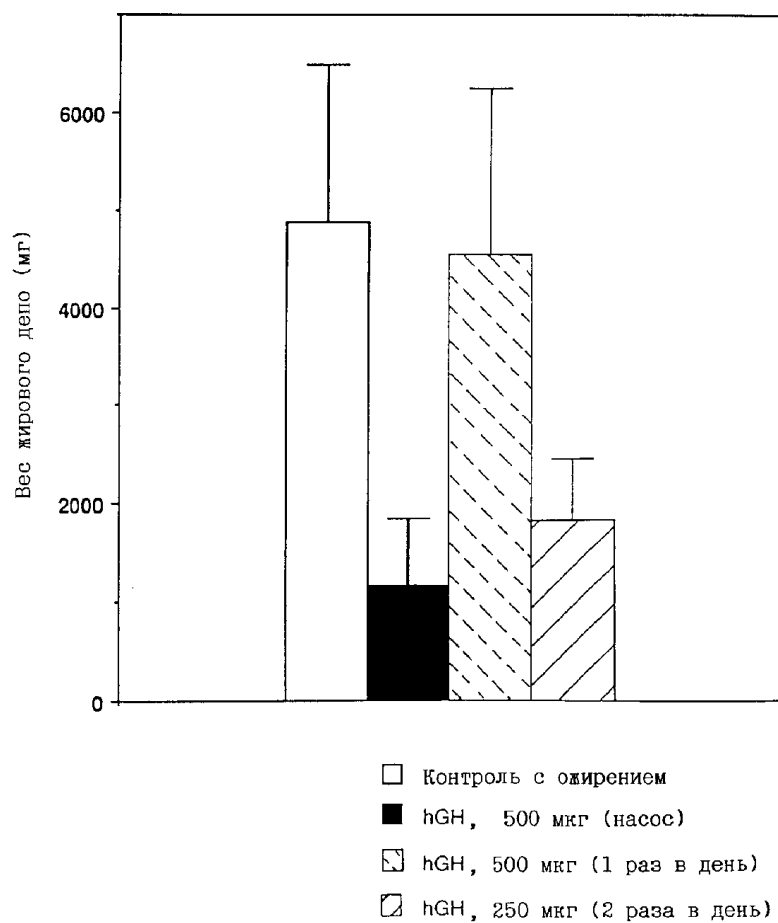
Фиг. 2



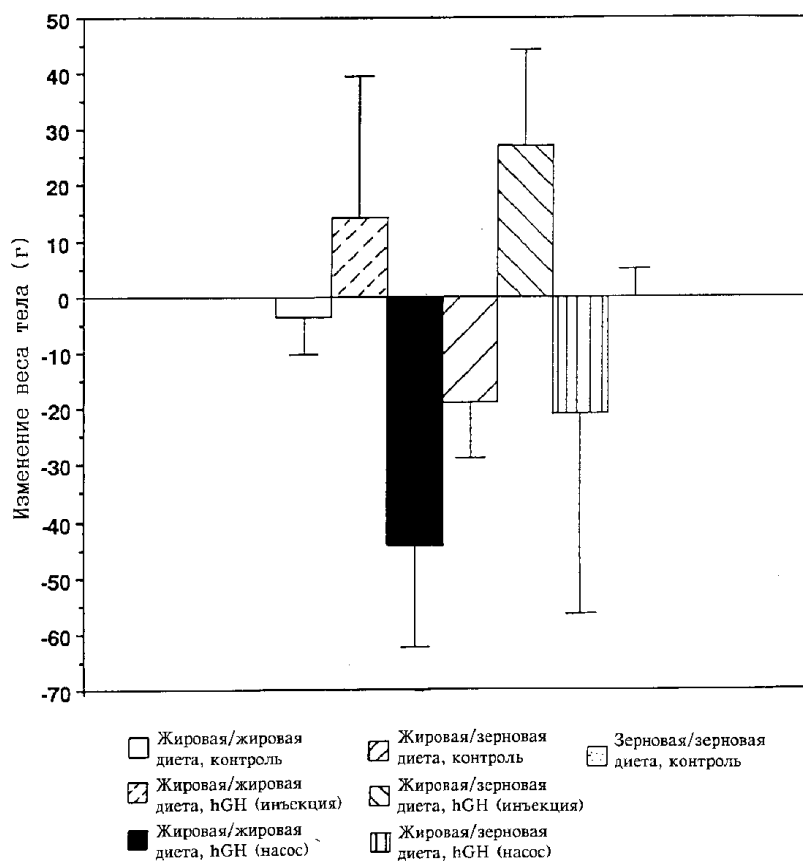
Фиг. 3



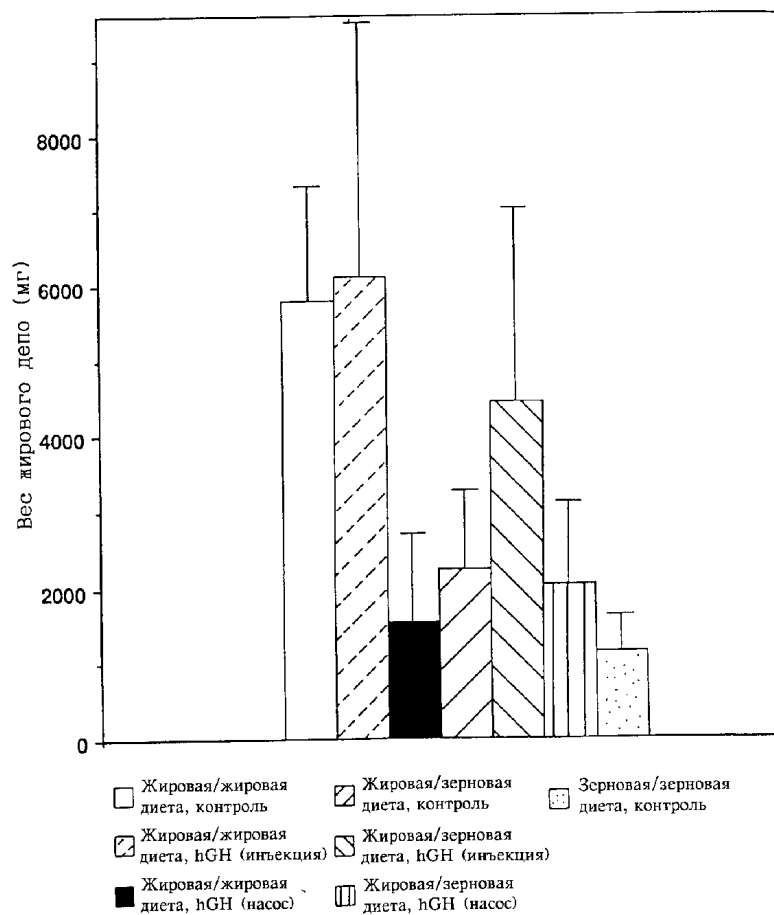
Фиг. 4



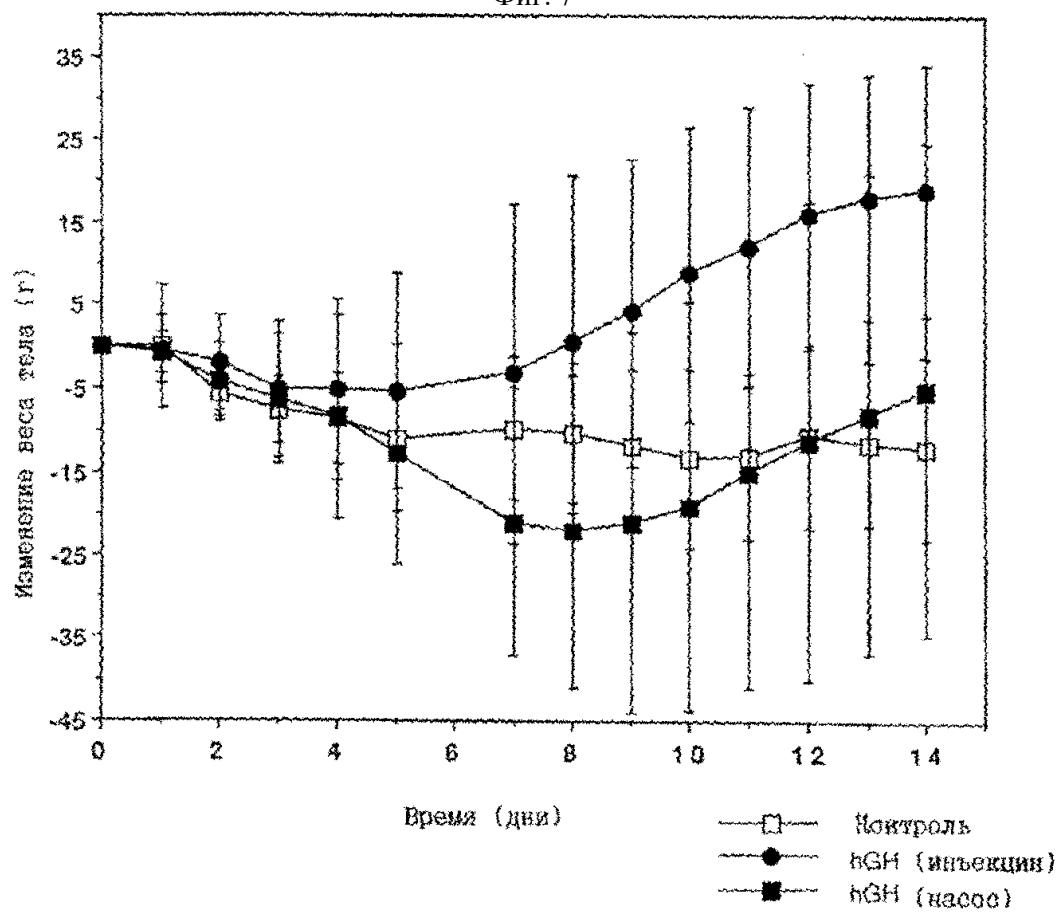
Фиг. 5



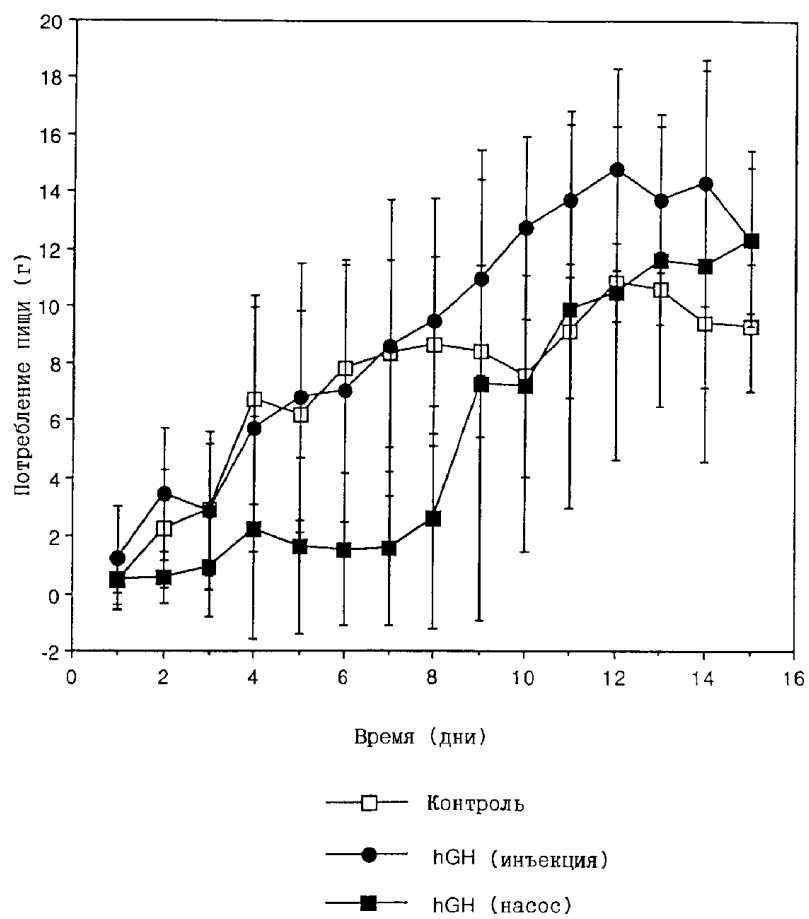
Фиг. 6



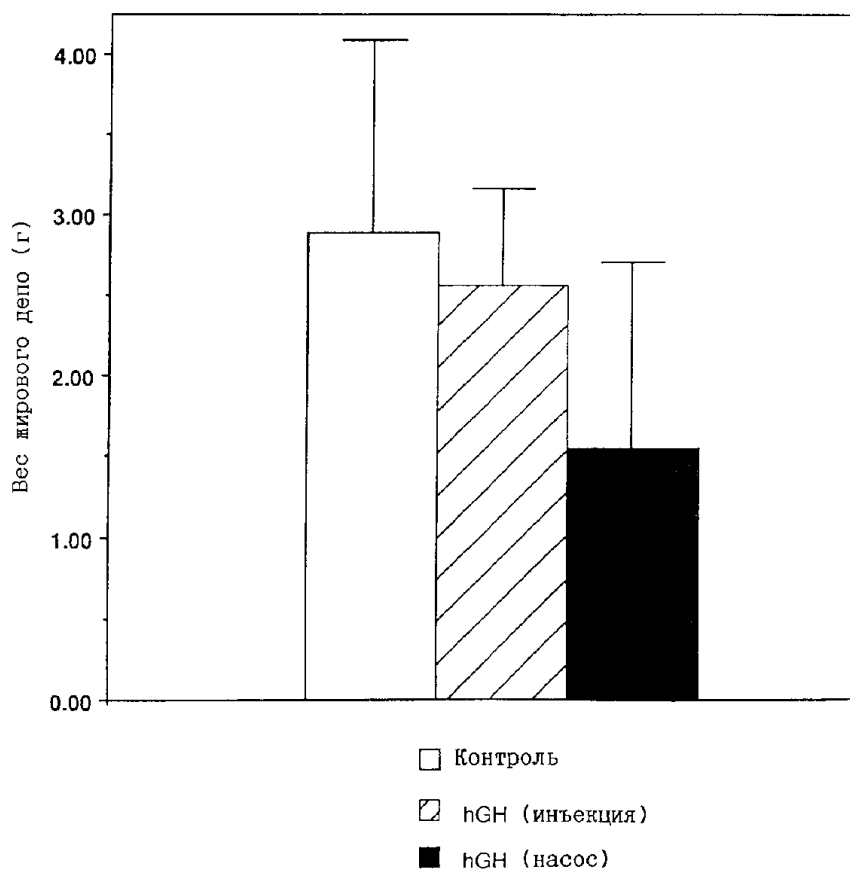
Фиг. 7



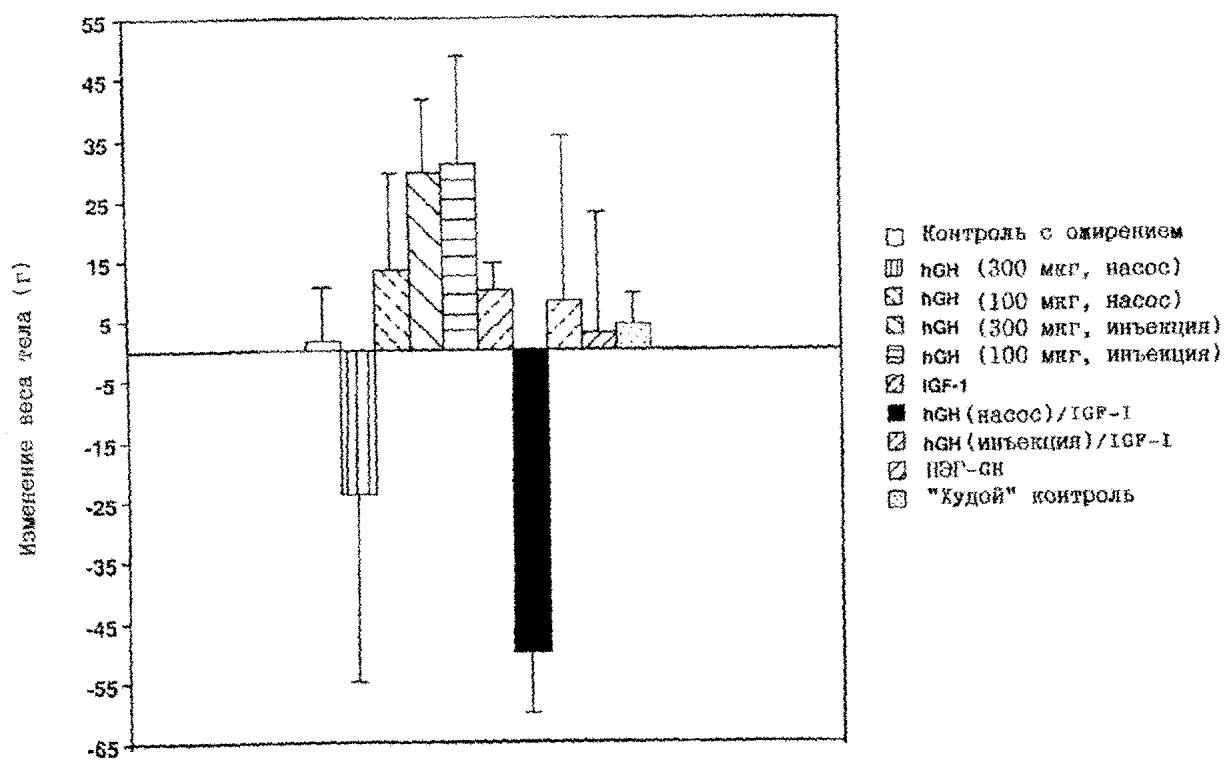
Фиг. 8



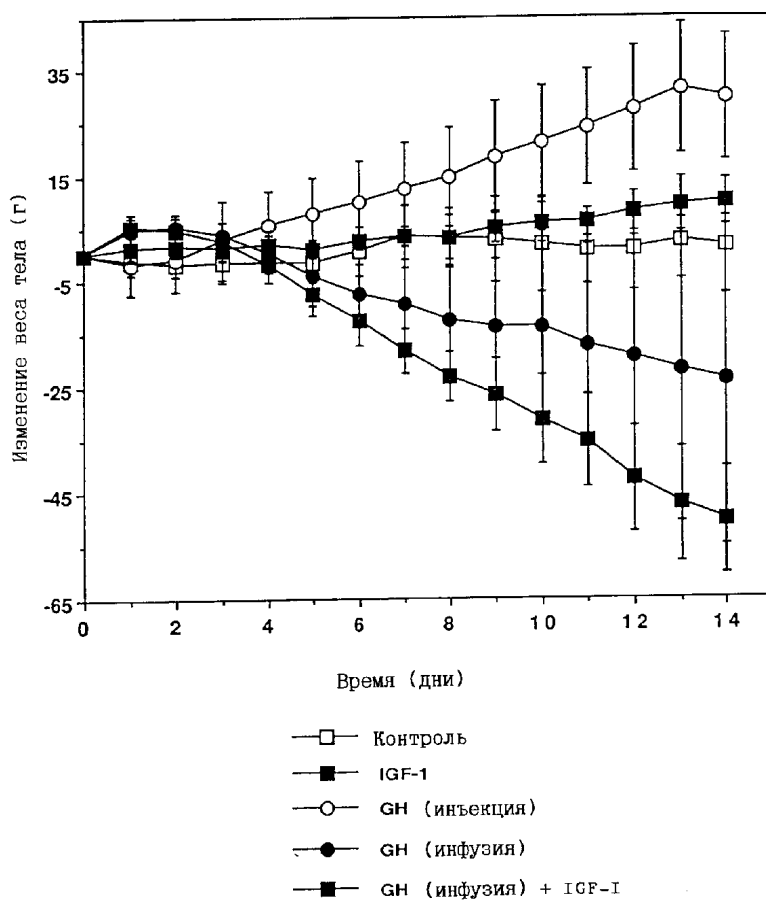
Фиг. 9



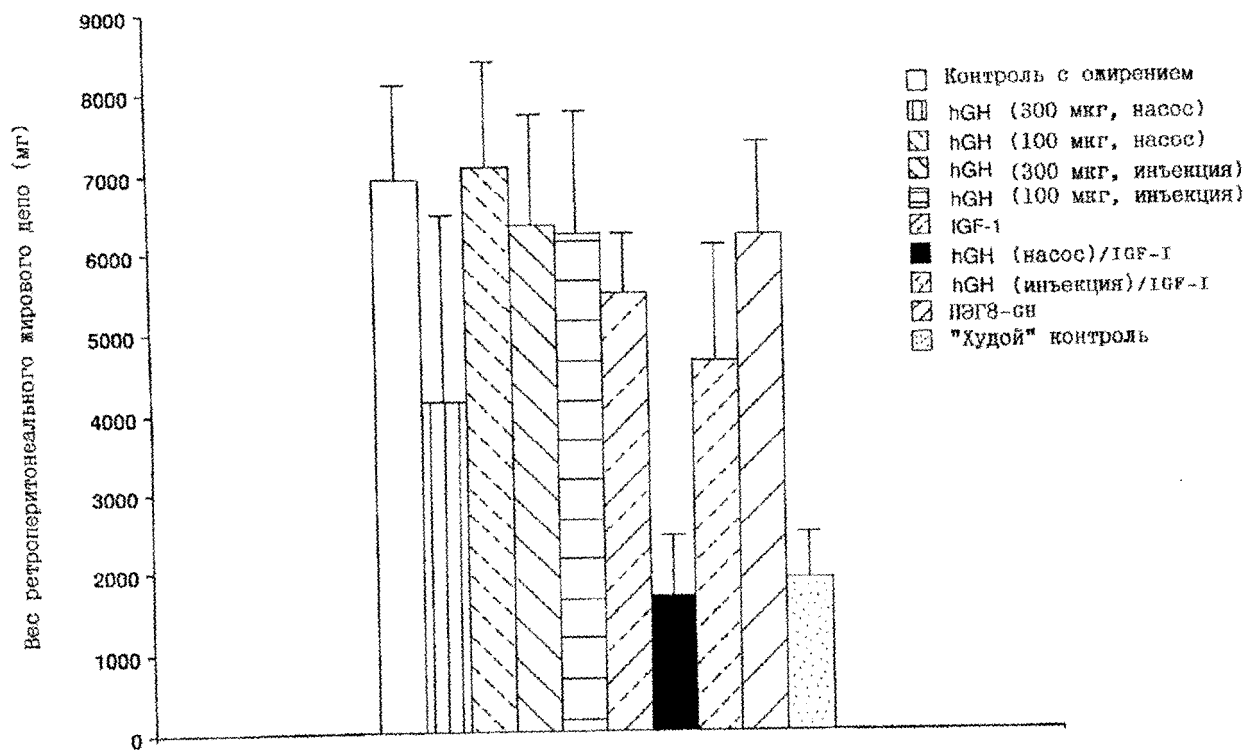
Фиг. 10



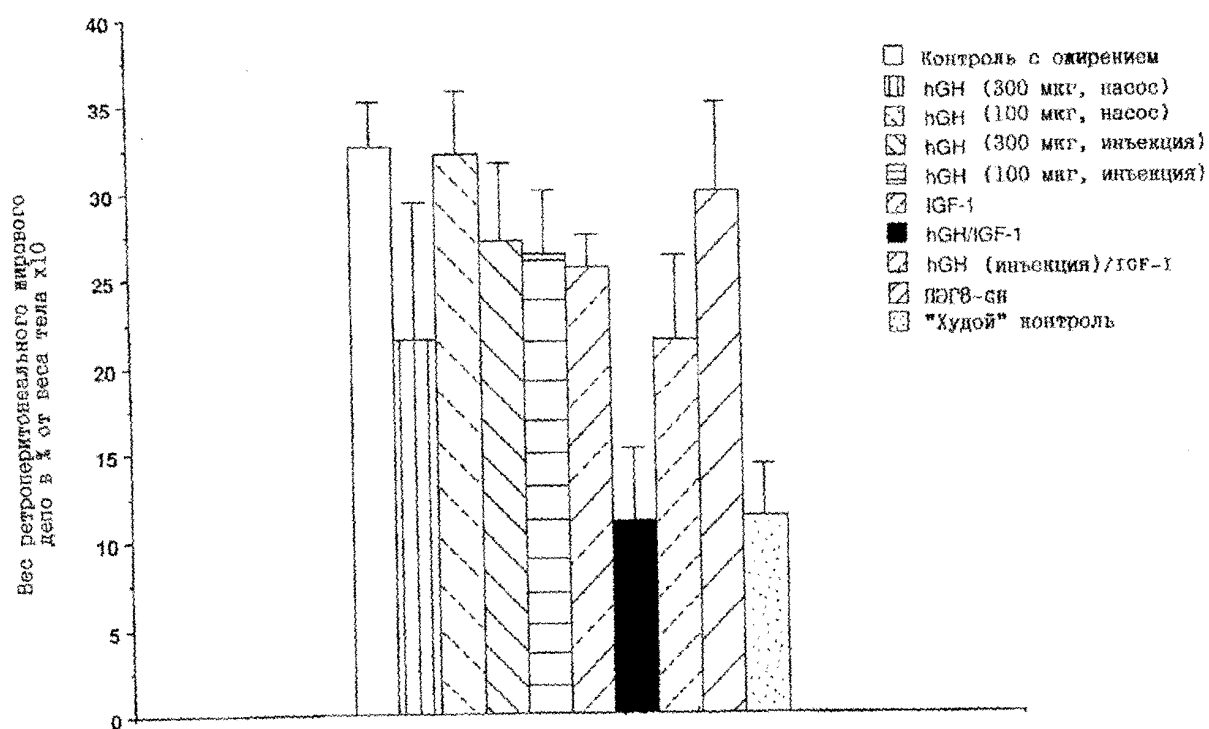
Фиг. 11



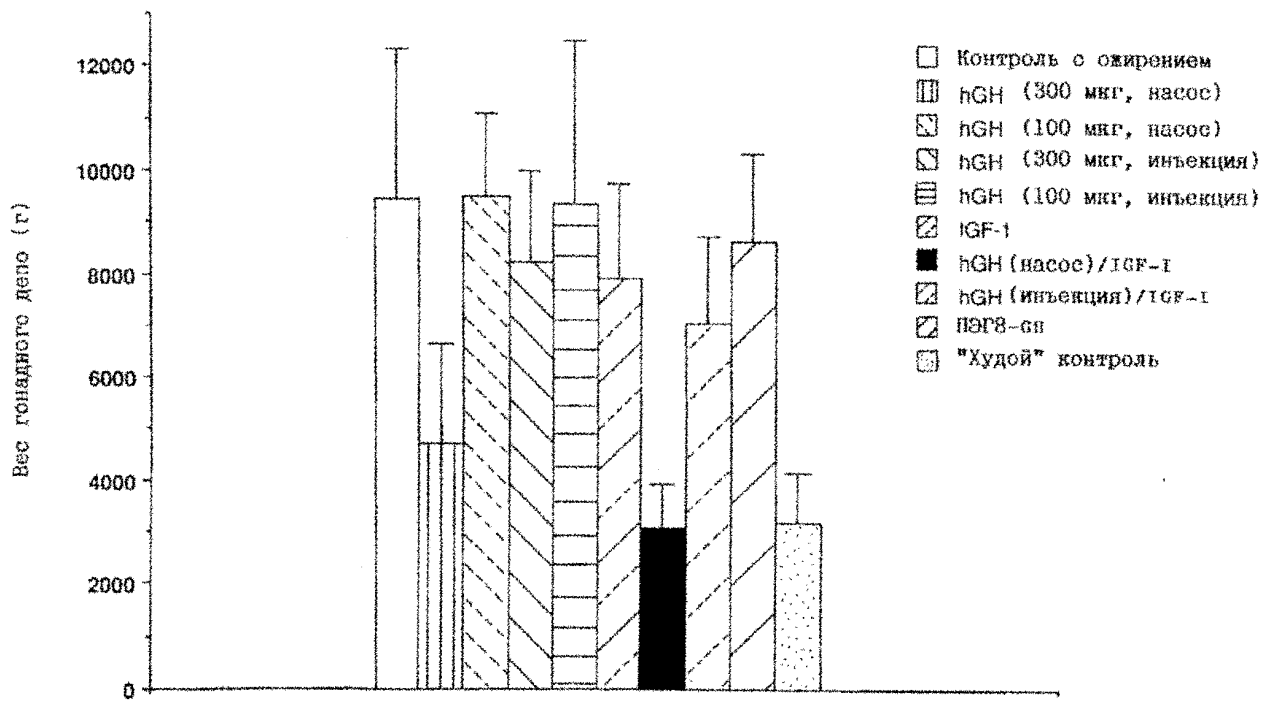
Фиг. 12



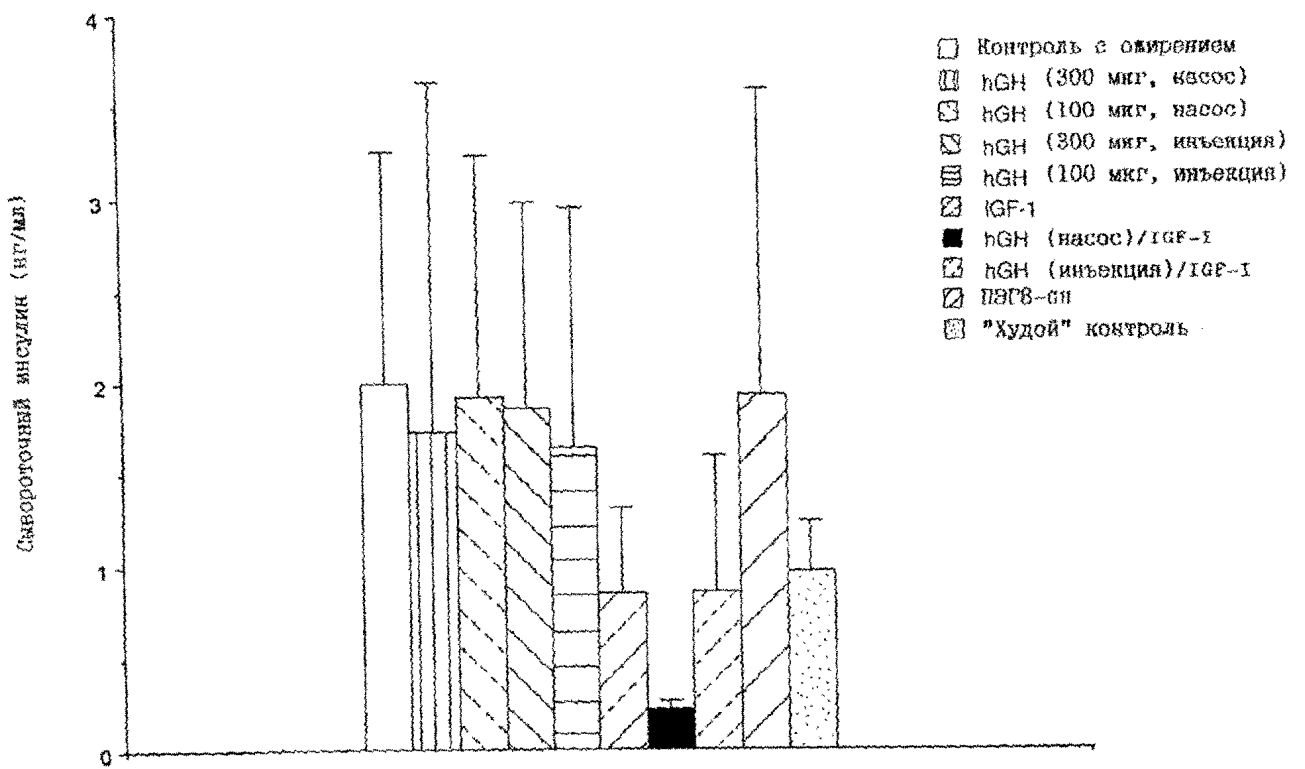
Фиг. 13



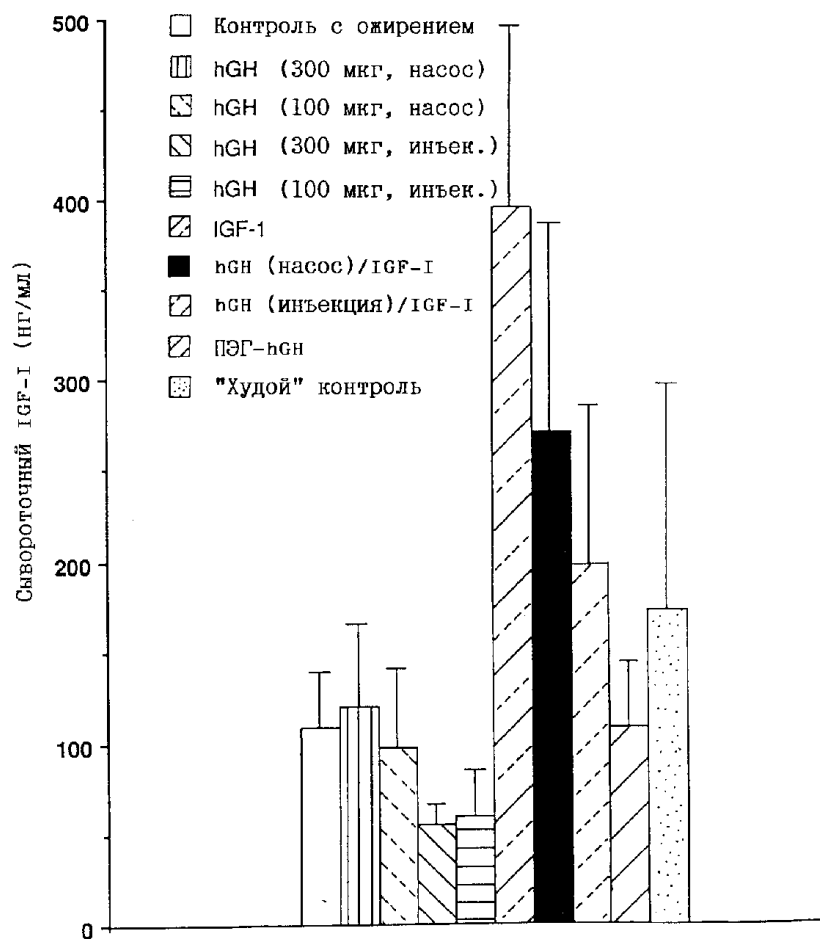
Фиг. 14



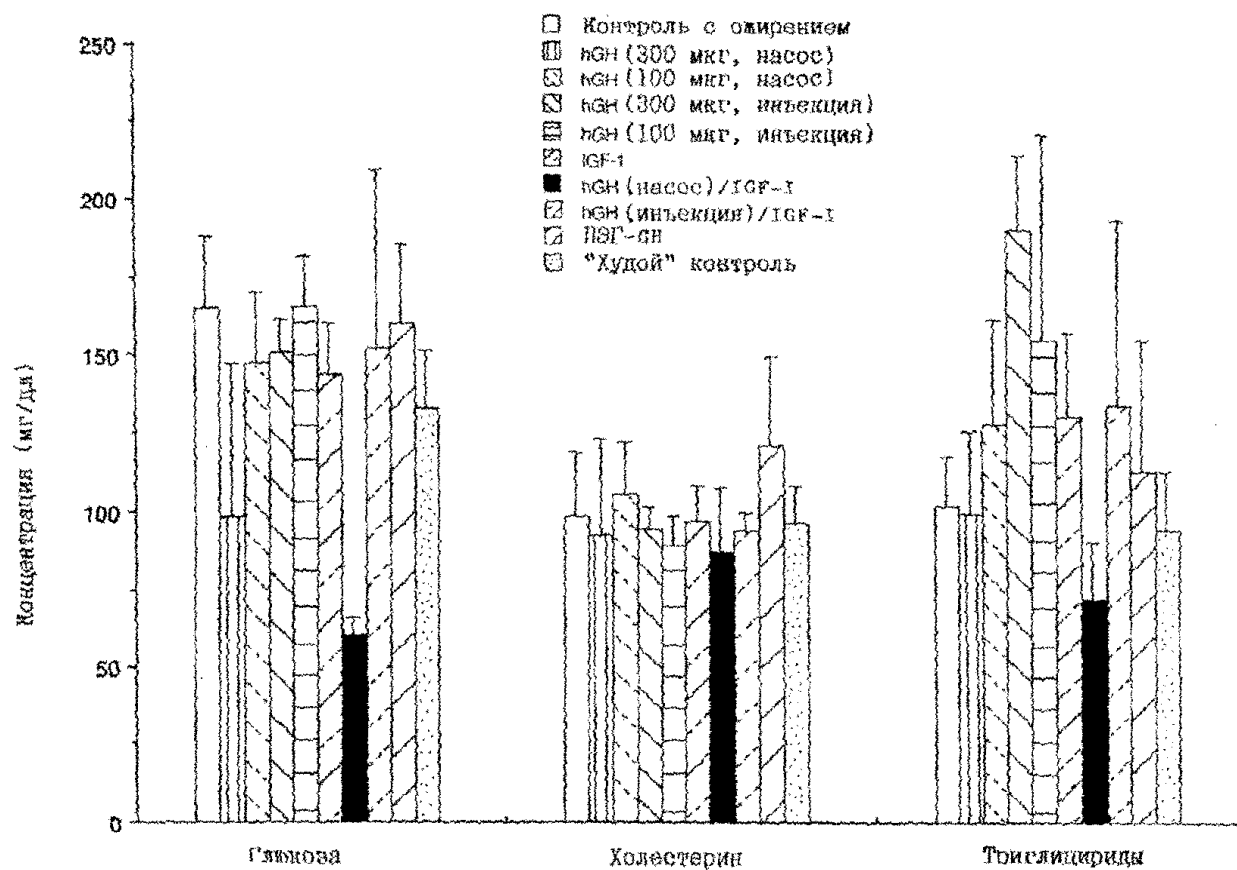
Фиг. 15



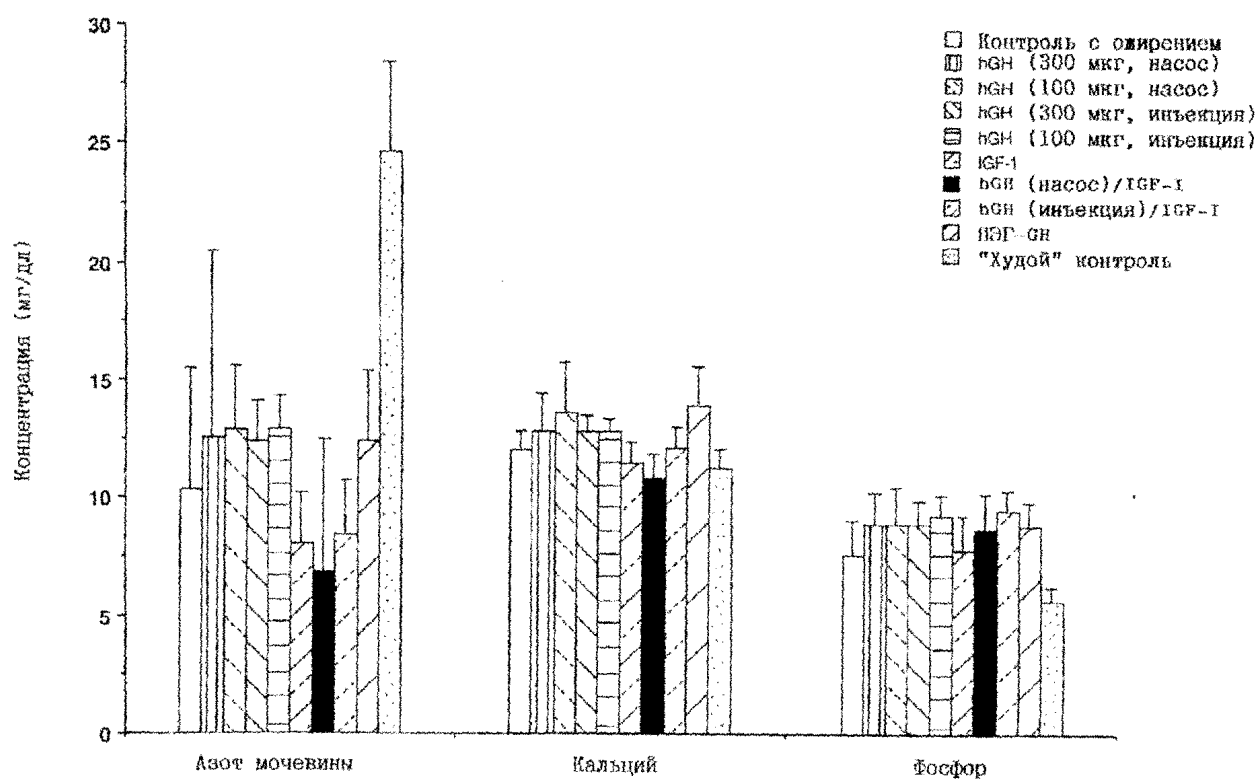
Фиг. 16



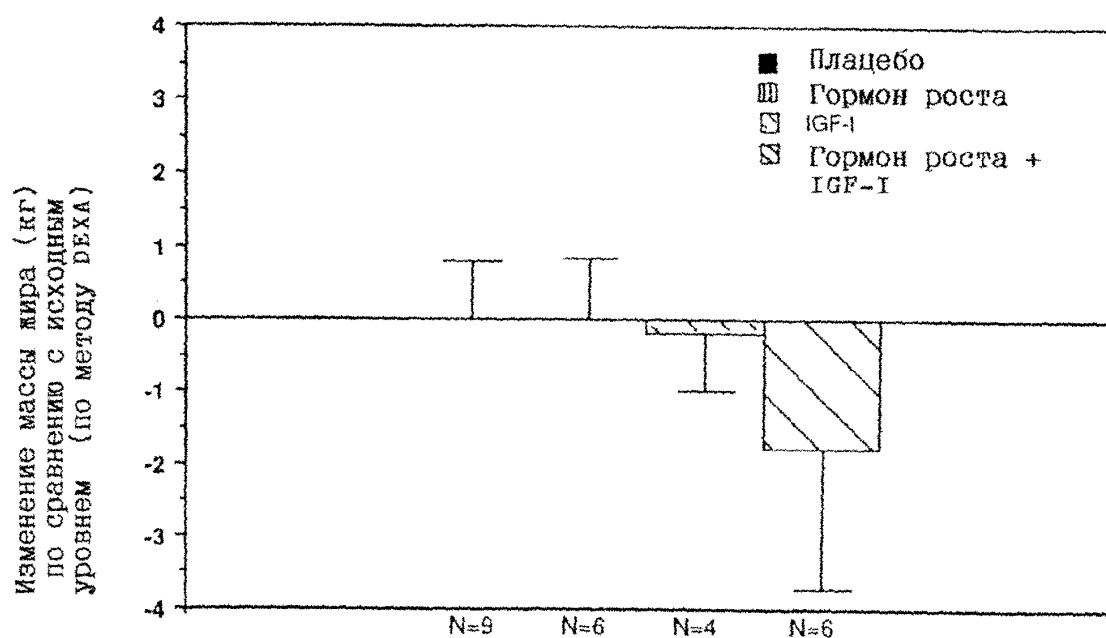
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20