

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034014**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.12.19**

**(21)** Номер заявки  
**201400827**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.02.08**

**(51)** Int. Cl. *A61K 31/70* (2006.01)  
*A61K 31/505* (2006.01)  
*A61K 9/16* (2006.01)  
*A61K 9/14* (2006.01)  
*A61P 1/12* (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ СУБЪЕКТА С ДИАРЕЕЙ, ВЫЗВАННОЙ РОТАВИРУСОМ**

---

**(31)** 61/596,480

**(32)** 2012.02.08

**(33)** US

**(43)** 2014.12.30

**(86)** PCT/US2013/025294

**(87)** WO 2013/119917 2013.08.15

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ФЛОРИДА  
РИСЁЧ ФАУНДЕЙШН, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Видьясагар Садасиван, Окунефф Пол,  
Чжан Ларон (US)**

**(74)** Представитель:  
**Тагбергенова А.Т., Тагбергенова М.М.  
(KZ)**

**(56)** GUTIERREZ C. et al., "Does an L-glutamine-containing, glucose-free, oral rehydration solution reduce stool output and time to rehydrate in children with acute diarrhoea? A double-blind randomized clinical trial", Journal of Health, Population and Nutrition, 2007, Vol. 25, No. 3, pages 278-284, see abstract; pages 279 and 282-283  
KR-A-1020060130583  
US-A1-20030143293  
KR-A-1020070103506  
MATHEW J.L., "Non-glucose oral rehydration solution - Does it make a good thing better?", Indian Pediatrics, 2009, Vol. 46, pages 501-505, see pages 501-503

---

**(57)** Изобретение обеспечивает терапевтическую композицию и способ лечения от желудочно-кишечных болезней и состояний, таких как диарея, для обеспечения регидратации, для исправления дисбаланса электролитов и жидкостей и/или для улучшения функции тонкого кишечника. В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает композицию, рецептированную для энтерального введения, причем композиция не содержит глюкозы. В предпочтительном варианте осуществления композицию рецептируют для введения в форме раствора для пероральной регидратации.

---

**B1**

**034014**

**034014  
B1**

### Перекрестная ссылка на родственную заявку

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет для предварительной заявки США № 61/596480, поданной 8 февраля 2012 г., включенной в данное описание путем ссылки в полном объеме.

### Уровень техники

Ротавирусная инфекция является главной причиной тяжелых диарейных болезней и обезвоживания у грудных детей и детей старшего возраста во всем мире. К симптомам ротавирусной инфекции относятся водянистая диарея, сильное обезвоживание, лихорадка и рвота. Ротавирусная инфекция также может приводить к повреждениям тощей кишки с максимальным повреждением на третий день после заражения и в некоторых случаях может вызывать уменьшение площади поверхности ворсин до 30-50% от нормы (Rhoads et al. (1996), *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 14(3):175-181).

Патофизиологический механизм, через который ротавирус вызывает диарею, состоит в воздействии энтеротоксина - неспецифического белка-4 (NSP4) на эпителиальные клетки тонкого кишечника. NSP4 мобилизует внутриклеточный  $Ca^{2+}$  в эпителиях крипт тонкого и толстого кишечника для имитации секреторного эффекта холинергического агониста карбахола (CCh) в потенцировании секреции сАМР-зависимой жидкости.

Известно, что повышение внутриклеточного сАМР ( $[cAMP]_i$ ) и  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) опосредует секрецию  $Cl^-$  и/или  $HCO_3^-$  при диарее, связанной с инфекционными, а также воспалительными состояниями (Zhang et al. (2007), *J. Physiol.* 581(3):1221-1233). Осмотический градиент, создаваемый секрецией хлорида, приводит к пассивному перемещению воды в просвет кишечника, таким образом, вызывая водянистый стул. Секреция  $Cl^-$  с пассивным перемещением воды в меньшем количестве происходит во время нормального пищеварения и абсорбции, что является существенным для надлежащего смешивания, перемешивания и плавного продвижения через просвет кишечника. В тонком кишечнике с нормальной абсорбцией существует точный баланс между абсорбцией, происходящей в зоне клеток ворсин, и секрецией из клеток крипт. Дисбаланс, являющийся результатом снижения абсорбции, повышенной секреции или комбинированного эффекта, в результате может привести к диарее.

Активируемые кальцием хлоридные каналы (CaCC) участвуют в важных физиологических процессах. Трансфекция эпителиальных клеток специфической малой интерферирующей РНК против каждого из мембранных белков, которые регулируются IL-4, обнаруживает, что TMEM16A, относящийся к семейству предполагаемых мембранных белков плазмы с неизвестной функцией, связан с кальций-зависимым хлоридным потоком (Caputo et al. (2008), *Science* 322(5901):590-594). TMEM16A широко экспрессируется в тканях млекопитающих, включая трахеальный, кишечный и железистый эпителий, гладкомышечные клетки и интерстициальные клетки Кахала в желудочно-кишечном тракте (Namkung et al., *J. Biol. Chem.* 286(3):2365-2374).

Поглощение глюкозы энтероцитами в просвете тонкого кишечника происходит путем вторичного активного переноса (Hediger et al. (1994), *Physiol. Rev.* 74(4):993-1026; Wright et al. (2004), *Physiology* (Bethesda) 19:370-376). Натрий-зависимый переносчик глюкозы (SGLT-1) обладает стехиометрией 2:1, таким образом, перенося два иона натрия на одну молекулу глюкозы через люминальную мембрану (Chen et al. (1995), *Biophys. J.* 69(6):2405-2414). Тесно связанный натрий-зависимый перенос глюкозы приводится в действие электрохимическим градиентом  $Na^+$ , создаваемым активностью Na-K-АТФазы. SGLT-1-опосредованное, электрогенное поглощение  $Na^+$  вызывает растворное привлечение, что приводит к пассивному поглощению воды из просвета.

Поддержка гидратации является ключевым элементом в лечении диарейных болезней, включая вызываемую ротавирусом диарею. В настоящее время секреторная диарея лечится растворами для пероральной регидратации (ORD) - путем введения раствора соли, содержащего натрий и значительное количество глюкозы и других сахарных молекул. Глюкоза всегда являлась основой в энтеральных и парентеральных растворах для коррекции нарушений поглощения электролитов и питательных веществ, связанных с болезненными состояниями. ORD предназначены для коррекции потери жидкостей и электролитов при секреторной диарее на основе теории, согласно которой после активного совместного усвоения натрия и глюкозы в тонком кишечнике происходит последующий приток воды вследствие перемещения абсорбированного состояния.

Хотя ORD обеспечивают значительный прорыв в лечении холеры и других диарейных состояний, существует потребность в улучшении его эффективности. Существует потребность в усовершенствованной композиции из-за низкой степени регидратации, обеспечиваемого существующими композициями ORD. Степень регидратации у пациентов с диареей не соответствует степени потери электролитов. Существующие композиции ORD оказались неэффективными для лечения вызванной ротавирусом диареей, причем точная причина неэффективности остается неизвестной.

Соответственно, существует потребность в усовершенствованных композициях ORD для лечения диареей.

### Краткое описание изобретения

Изобретение обеспечивает терапевтическую композицию и способ лечения желудочно-кишечных болезней и состояний, таких как диарея, для обеспечения регидратации, для исправления дисбаланса электролитов и жидкостей и/или для улучшения функции тонкого кишечника.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, рецептированную для энтерального введения, причем композиция не содержит глюкозы. В предпочтительном варианте осуществления композицию рецептируют в форме раствора для пероральной регидратации (ORD). В другом предпочтительном варианте осуществления композиция предусматривается в форме порошка с возможностью восстановления влагосодержания для применения в качестве ORD.

В одном варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению включает один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, к которой относятся свободные аминокислоты; электролиты; вода, терапевтически приемлемые носители, формообразующие, буферы, ароматизаторы, красители и/или консерванты.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения, включающий энтеральное введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества композиции согласно изобретению. Композиция может вводиться один или несколько раз в день. В предпочтительном варианте осуществления композицию вводят перорально.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает лечение от диареи, вызванной ротавирусной инфекцией и/или NSP4. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение в результате ведет к снижению секреции  $\text{Cl}^-$  и/или  $\text{HCO}_3^-$  и/или улучшению абсорбции жидкости.

### Краткое описание фигур

Фиг. 1 показывает кинетику насыщения для транспорта  $\text{Na}^+$ -связанной глюкозы и  $\text{Na}^+$ -связанной 3-О-метилглюкозы (3-ОМГ). (А) Повышение концентрации глюкозы в просвете в результате ведет к зависимому от концентрации повышению  $I_{\text{sc}}$ . Подбор нелинейной кривой моделью Михаэлиса-Ментен для ферментативной кинетики демонстрирует  $V_{\text{max}}=3,3\pm 0,19$  мкэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> и  $K_m=0,24\pm 0,06$  мМ. (В) Повышение концентрации 3-ОМГ в просвете в результате ведет к зависимому от концентрации повышению  $I_{\text{sc}}$  с  $V_{\text{max}}=1,9\pm 0,13$  мкэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> и  $K_m=0,22\pm 0,07$  мМ. Повышение концентрации 3-ОМГ в тканях, предварительно обработанных Н-89, в результате ведет к значительному снижению  $I_{\text{sc}}$ , по сравнению с показателем для тканей, не подвергавшихся предварительной обработке Н-89. (С) Добавление с повышением концентрации 3-ОМГ в тканях, предварительно обработанных флоризином, продемонстрировало отсутствие реакции на глюкозу. Получали значения для n=6 тканей;

фиг. 2 - однонаправленный и результирующий поток  $\text{Na}^+$  (А) и  $\text{Cl}^-$  (В). (А) Инкубация тканей тонкого кишечника с глюкозой в концентрации 0, 0,6 или 6 мМ не приводит к значительным различиям в  $J_{\text{ms}}\text{Cl}^-$ . Глюкоза вызывает повышение  $J_{\text{sm}}\text{Cl}^-$  в тонком кишечнике. При этом  $J_{\text{sm}}\text{Cl}^-$  значительно выше в присутствии 0,6 и 6 мМ глюкозы по сравнению с показателем 0 мМ глюкозы. При 0 мМ глюкозы наблюдается значительная абсорбция  $\text{Cl}^-$  (по сравнению с уровнем абсорбции  $\text{Cl}^-$  при 0,6 и 6 мМ глюкозы), в то время как при 0,6 и 6 мМ глюкозы наблюдается секреция  $\text{Cl}^-$ . (В). При 0 мМ глюкозы чистая абсорбция  $\text{Na}^+$  наблюдается в тканях тонкого кишечника. Минимальная абсорбция  $\text{Na}^+$  наблюдается при 0,6 мМ глюкозы, в то время как значительная абсорбция  $\text{Na}^+$  наблюдается при 6 мМ глюкозы. Однонаправленные потоки ( $J_{\text{ms}}$  и  $J_{\text{sm}}$ ) не демонстрируют значительных различий при 0, 0,6 или 6 мМ глюкозы. Получали значения для n=8 тканей;

фиг. 3 - воздействие глюкозы и 3-О-метилглюкозы на уровень внутриклеточного cAMP в ворсинах, криптах и фракции цельных клеток подвздошной кишки. (А) Обработка форсколином значительно повышает уровень внутриклеточного cAMP в клетках крипт и ворсин подобным образом. (В) В результате инкубации клеток с 8 мМ глюкозы значительно повышается уровень внутриклеточного cAMP в клетках ворсин, но не в клетках крипт. (С) В результате инкубации соскоба слизистой оболочки, состоявшего из эпителиальных клеток ворсин и крипт, с глюкозой и 3-О-метилглюкозой, соответственно, значительно повышается уровень внутриклеточного cAMP. В результате инкубации клеток с 3-О-метилглюкозой при 6 мМ происходит небольшое, но значительное повышение уровня внутриклеточного cAMP. Инкубация клеток с разной концентрацией глюкозы оказывает подобное воздействие на уровень внутриклеточного cAMP. Колонки представляют средние значения, а чертами обозначается стандартная погрешность среднего. Получали значения для n=4 разных мышей с трехкратными повторами. Значения cAMP унифицируют со значениями белка соответствующих фракций и выражают в пикомолях (мг белка)<sup>-1</sup>. \* P<0,001 сравнивали с группой после добавления форсколина или глюкозы; # P<0,01 сравнение между обработанными солевым раствором и глюкозой клетками ворсин. NS - не существенно (множественные сравнения Бонферрони);

фиг. 4 - воздействие глюкозы и 3-О-метилглюкоза на уровень внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках Сасо-2. (А) В результате инкубации клеток Сасо-2 с 0,6 мМ глюкозы повышается флуоресценция по сравнению с контрольным показателем. В результате инкубации с 6 мМ глюкозы значительно повышается флуоресценция по сравнению с контрольным образцом и 0,6 мМ глюкозы. В клетках, предварительно

инкубированных (в течение периода 45 мин) с 1,2-бис-(о-аминофенокси)этан- $N,N,N',N'$ -тетрауксусной кислотой) (ВАРТА-АМ), глюкоза не стимулирует повышение уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . В результате инкубации с 3-ОМГ значительно снижается стимулируемое глюкозой повышение уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$  по сравнению с показателем глюкозы в подобной концентрации. (В) Репрезентативная кривая, представляющая повышение уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , стимулируемое глюкозой в концентрации 0,6 и 6 мМ;

фиг. 5 - результаты статистических экспериментов с уровнем рН, которые демонстрируют  $Cl^-$ -зависимую и  $Cl^-$ -независимую секрецию  $HCO_3^-$ . (А) В отсутствие глюкозы наблюдается минимальный уровень  $Cl^-$ -независимой секреции  $HCO_3^-$ . В присутствии 6 мМ глюкозы удаление  $Cl^-$  просвета не приводит к значительному снижению секреции  $HCO_3^-$ . (В) Воздействие ингибитора анионного обмена и блокаатора анионных каналов на секрецию  $HCO_3^-$ . Эксперименты выполняются в присутствии  $Cl^-$  просвета. В отсутствие глюкозы добавление 100 мкМ 4,4'-диизотиоциано-2,2'-стильбендисульфоновой кислоты (DIDS) прекращает секрецию  $HCO_3^-$ , в то время как 10 мкМ 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойной кислоты (NPPB) не имеет ингибиторного воздействия на секрецию  $HCO_3^-$ . В присутствии 6 мМ глюкозы NPPB, но не DIDS, ингибирует секрецию  $HCO_3^-$ . Получали значения для  $n=6$  тканей от разных мышей.  $P<0,001$ .

### Подробное описание изобретения

Изобретение обеспечивает терапевтическую композицию и способ лечения желудочно-кишечных болезней и состояний, таких как диарея, обеспечения регидратации, исправления дисбаланса электролитов и жидкостей и/или улучшения функции тонкого кишечника.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, рецептированную для энтерального введения, причем композиция не содержит глюкозы. В предпочтительном варианте осуществления композицию рецептируют в форме раствора для пероральной регидратации (ORD). В другом предпочтительном варианте осуществления композиция предусматривается в форме порошка с возможностью восстановления влагосодержания для применения в качестве ORD.

В одном варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению включает один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, к которой относятся свободные аминокислоты; электролиты; вода, терапевтически приемлемые носители, формообразующие, буферы, ароматизаторы, красители и/или консерванты. В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения, включающий энтеральное введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества композиции согласно изобретению. Композиция может вводиться один или несколько раз в день. В предпочтительном варианте осуществления композицию вводят перорально.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает лечение от диареи вызванной ротавирусной инфекцией и/или NSP4. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение в результате обеспечивает снижение секреции  $Cl^-$  и/или  $HCO_3^-$  и/или улучшенную абсорбцию жидкости.

Индукция секреции анионов глюкозой.

В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что глюкоза просвета вызывает секрецию чистых ионов в тонком кишечнике. При этом глюкоза вызывает активную секрецию хлоридов, вызванную повышенным внутриклеточным уровнем сАМР и  $Ca^{2+}$ . Кроме того, транспорт чистого  $Na^+$  в тонком кишечнике является абсорбционным при высокой концентрации глюкозы. Глюкоза также ведет к секреции бикарбонатов в тонком кишечнике.

Авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что повышение внутриклеточного уровня сАМР опосредует секрецию  $Cl^-$  и/или  $HCO_3^-$ . Секреция  $Cl^-$  и/или  $HCO_3^-$  в значительной степени опосредуется ионными каналами муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (CFTR), имеющими многочисленные (~ 20) центры возможного фосфорилирования серина и треонина. Известно, что протеинкиназа А (РКА) и протеинкиназа С (РКС) активируют анионные каналы CFTR. В исследованиях с фиксацией потенциала было продемонстрировано, что каналы CFTR быстро инактивируются ("истощаются") в отсутствие постоянной активации со стороны РКА, что указывает на значение РКА в активации CFTR. Согласуется с этим наблюдением то, что предварительная обработка клеток тонкого кишечника эффективным ингибитором РКА Н89 в результате ведет к значительному снижению стимулируемого глюкозой чистого повышения  $I_{sc}$ .

Было продемонстрировано, что антагонисты РКА ингибируют экспрессию белка SGLT1 вследствие воздействия глюкозы (Dyer et al. (2003), Eur. J. Biochem. 270(16):3377-3388). Каналы CFTR активируются сАМР-зависимой протеинкиназой (РКА), что ведет к секреции анионов. Стимулируемое глюкозой повышение  $I_{sc}$  в тонком кишечнике частично опосредуется CFTR-опосредованным транспортом ионов.

Было продемонстрировано, что глюкоза, а также агонисты РКА (такие как сАМР) повышают миграцию SGLT1 к мембране щеточной каймы (Wright et al. (1997), J. Exp. Biol. 200(Pt 2):287-293; Dyer et al. (2003), Eur. J. Biochem. 270(16):3377-3388). Снижение  $V_{max}$  указывает на общее уменьшение потока, представляющее снижение транспорта глюкозы. Снижение  $V_{max}$  может быть результатом уменьшения общего количества переносчика глюкозы SGLT1, который главным образом находится в эпителиальных клетках ворсин. Потеря ворсин ведет к значительной потере доступного переносчика для поглощения

глюкозы клетками.

Было обнаружено, что инкубация энтероцитов с глюкозой повышает уровень внутриклеточного cAMP. Большее повышение уровня вызываемого глюкозой внутриклеточного cAMP наблюдается в клетках ворсин по сравнению с клетками крипт. Инкубация энтероцитов с форсколином повышает уровень внутриклеточного cAMP в клетках крипт и ворсин (фиг. 3А). Опосредованный SGLT1 транспорт глюкозы происходит, главным образом, в клетках ворсин, а не в клетках крипт, поскольку большее количество SGLT-1 находится в области ворсин, чем в области крипт (Knickelbein et al. (1988), J. Clin. Invest. 82(6):2158-2163). Соответственно, повышение концентрации глюкозы в клетках крипт не приводит к повышенному ответу cAMP (фиг. 3В).

Даже при низкой концентрации (например, 0,6 мМ глюкозы, что приблизительно составляет половину его  $V_{max}$ ), глюкоза просвета вызывает секрецию чистых анионов. При более высокой концентрации глюкозы абсорбция натрия является преобладающей. Повышенная концентрация глюкозы просвета увеличивает внутриклеточный уровень cAMP и  $Ca^{2+}$ . Предыдущие исследования продемонстрировали, что значение  $K_m$  для транспорта  $Na^+$ -связанной глюкозы составляет от 0,2 до 0,7 мМ (Lo & Silverman (1998), J. Biol. Chem. 273(45):29341-29351).

Наличие опосредованного глюкозой повышения  $I_{sc}$  в клетках, предварительно обработанных Н-89, указывает на существование РКА-независимого(ых) пути(ей) в вызванной глюкозой секреции анионов. Электрогенная секреция анионов через тонкий кишечник опосредуется ионными каналами, которые могут классифицироваться в зависимости от механизмов их активации, таких, как активация со стороны cAMP,  $Ca^{2+}$ , объем клеток и мембранный потенциал.

Также было обнаружено, что глюкоза просвета вызывает повышение внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$ . Кроме того, вызываемая глюкозой секреция  $Cl^-$  опосредуется РКА-зависимыми, а также РКА-независимыми путями. Это означает, что помимо CFTR, активируемые кальцием хлоридные каналы (CaCC) также играют роль в вызываемой глюкозой секреции анионов.

Кроме того, глюкоза стимулирует электрогенную секрецию  $HCO_3^-$ . Клетки тонкого кишечника, инкубированные с глюкозой, демонстрируют более высокий уровень секреции  $HCO_3^-$  в просвете  $Cl^-$  содержащего раствора по сравнению с раствором без  $Cl^-$  просвета (фиг. 4А и 4В). Эти результаты указывают, что анионные каналы опосредуют секрецию  $HCO_3^-$  в присутствии глюкозы. Кроме того, в результате добавления глюкозы слегка снижается обмен  $Cl^- HCO_3^-$  по сравнению с клетками без добавления глюкозы. Это снижение может быть вторичным по отношению к повышению внутриклеточного уровня cAMP глюкозой. Это также указывает на то, что глюкоза вызывает опосредованную анионными каналами секрецию и ингибирует электронейтральный обмен  $Cl^- HCO_3^-$ .

Кроме того, клетки тонкого кишечника инкубировали с блокатором анионных каналов (100 мМ NPPV) и ингибитором анионного обмена (100 мМ DIDS) соответственно. Наблюдается значительное ингибирование вызванной глюкозой, опосредованной анионными каналами секреции  $HCO_3^-$  со стороны NPPV (100 мМ) ( $4,2 \pm 0,7$  по сравнению с  $7,6 \pm 1,5$  экв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>).

В присутствии ингибиторов анионных каналов все еще наблюдается остаточная секреция  $HCO_3^-$ . Это указывает на то наличие обмена  $Cl^- HCO_3^-$  в опосредованной глюкозой секреции. Это также указывает на то, что повышенный внутриклеточный уровень кальция может ингибировать активность натриево-водородного обменника 3 (NHE3) во время нормальной пищеварительной функции, а также при некоторых болезненных состояниях. Это также указывает на то, что SGLT1 играет двойную роль в регулировании абсорбции натрия и, в некоторые моменты, стимулировании секреторного и/или абсорбционного дефекта.

Открытие вызываемого глюкозой секреторного механизма может быть использовано в лечении желудочно-кишечных болезней, включая диарею. Пациенты с острыми диарейными болезнями обычно страдают от нарушенной абсорбции глюкозы, которая случается в верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Наличие неабсорбированных углеводов может создавать осмотический эффект в кишечнике, что приводит к диарее. Кроме того, глюкоза повышает внутриклеточный уровень  $Ca^{2+}$  и/или cAMP и вызывает секрецию анионов. Секреторный эффект глюкозы ранее был недостаточно изучен или был скрыт за одновременной абсорбцией  $Na^+$ -глюкозы. Кроме того, из-за секреторного эффекта введение глюкозы особенно обостряет желудочно-кишечные болезни с нарушением абсорбции  $Na^+$ -глюкозы, такие как болезнь Крона и вызванный облучением или химиотерапией энтерит, которые связаны с сокращением ворсин и, следовательно, крайне ухудшенной абсорбцией.

Во время ротавирусной инфекции, хотя и преобладает связанная с глюкозой абсорбция  $Na^+$  через натрий-зависимый переносчик глюкозы (SGLT-1), который главным образом экспрессируется в клетках ворсин, существует значительная активируемая кальцием секреция  $Cl^-$  через активируемый кальцием хлоридный канал (CaCC или TMEM-16a) в тонком кишечнике. Кроме того, внутриклеточная глюкоза активирует активируемую кальцием секрецию хлорида и жидкости. Неструктурный белок (NSP4) является энтеротоксином, вырабатываемым ротавирусом. Было обнаружено, что результатом совместного введения глюкозы и NSP4 является длительная секреция хлоридов в клетках. В результате существующая композиция ORD, содержащая значительное количество глюкозы, дополнительно увеличивает стимулируемую кальцием секрецию хлоридов, таким образом, ухудшая вызываемую ротавирусом диарею.

Терапевтические композиции.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает терапевтическую композицию для лечения желудочно-кишечных болезней и состояний, таких как диарея, для обеспечения регидратации, для исправления дисбаланса электролитов и жидкостей и/или для улучшения функции тонкого кишечника.

Композицию рецептируют для энтерального введения, и она не содержит глюкозы. В предпочтительном варианте осуществления композицию рецептируют в форме раствора для пероральной регидратации. В другом предпочтительном варианте осуществления композиция предусматривается в форме порошка с возможностью восстановления влагосодержания для применения в качестве раствор для пероральной регидратации.

В другом варианте осуществления композиция не содержит никакого субстрата переносчиков глюкозы. В другом конкретном варианте осуществления композиция не содержит агонистов натрий-зависимого переносчика глюкозы (SGLT-1), включая, помимо прочего, аналоги глюкозы (например, неметаболизуемые агонисты глюкозы для SGLT-1) и других углеводов (таких, как сахара).

Специалистам в данной области известны различные субстраты SGLT-1, включая, помимо прочих, неметаболизуемые аналоги глюкозы, такие, как  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (АМГ), 3-О-метилглюкозу (3-ОМГ), дезокси-О-глюкозу и  $\alpha$ -метил-D-глюкозу; и галактозу. Субстраты переносчиков глюкозы (например, SGLT-1) могут быть выбраны на основе агонистических анализов, известных специалистам в данной области. Кроме того, возможны структурные модификации глюкозы и других углеводов (таких как сахара) для получения субстратов переносчиков глюкозы (например, SGLT-1).

В одном варианте осуществления композиция не содержит глюкозы. В другом варианте осуществления композиция не содержит углеводов (таких как ди-, олиго- или полисахариды) или других соединений, которые могут быть гидролизированы в глюкозу или субстрат переносчиков глюкозы (например, SGLT-1).

В одном варианте осуществления композиция включает, по сути состоит или состоит из одного или нескольких ингредиентов, выбранных из группы, к которой относятся свободные аминокислоты; электролиты; вода, терапевтически приемлемые носители, формообразующие, буферы, ароматизаторы, красители и/или консерванты.

В другом альтернативном варианте осуществления композиция включает, по сути состоит или состоит из одного или нескольких ингредиентов, выбранных из группы, к которой относятся свободные аминокислоты; электролиты; вода, терапевтически приемлемые носители, формообразующие, буферы, ароматизаторы, красители и/или консерванты;

причем субстраты переносчиков глюкозы (например, SGLT-1) (такие как глюкоза, аналоги глюкозы) и/или соединения (такие как углеводы), которые могут быть гидролизированы в субстрат переносчиков глюкозы (например, SGLT-1) в случае присутствия в композиции, присутствуют в общей концентрации ниже чем 0,05 мМ или любой концентрации ниже чем 0,05 мМ, включая, помимо прочего, концентрацию ниже 0,04, 0,03, 0,02, 0,008, 0,005, 0,003, 0,001, 0,0005, 0,0003, 0,0001,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  или  $10^{-7}$  мМ. В одном варианте осуществления противодиарейная композиция не содержит сахара. В другом варианте осуществления противодиарейная композиция не содержит субстратов переносчиков глюкозы (например, SGLT-1) (таких как глюкоза, аналоги глюкозы) и/или соединений (таких как углевод), которые могут быть гидролизированы в субстрат переносчиков глюкозы (например, SGLT-1).

К аминокислотам, применимым для противодиарейной композиции согласно изобретению, относятся, помимо прочих, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, фенилаланин, глицин, гистидин, изолейцин, лизин, лейцин, метионин, пролин, глутамин, аргинин, серин, треонин, валин, триптофан и тирозин в L-форме.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает противодиарейную композицию, причем композиция включает, по сути состоит или состоит из свободных аминокислот лизина, глицина, треонина, валина, тирозина, аспарагиновой кислоты, изолейцина, и серина в L-форме; терапевтически приемлемых носителей, электролитов, буферов, консервантов и ароматизаторов.

В одном варианте осуществления свободные аминокислоты, содержащиеся в терапевтической композиции, могут присутствовать в нейтральных или солевых формах.

В одном варианте осуществления терапевтическая композиция также включает один или несколько электролитов, выбранных из группы, к которой относятся  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{Cl}^-$ . В одном варианте осуществления терапевтическая композиция включает хлорид натрия, бикарбонат натрия, хлорид кальция и/или хлорид калия.

В некоторых вариантах осуществления каждая свободная аминокислота может присутствовать в концентрации от 4 до 40 мМ или любое значение между этими значениями. В контексте данного описания термин "состоит по сути из" ограничивает объем ингредиентов и этапов указанными материалами или этапами и теми, которые не имеют существенного влияния на основные и новые характеристики настоящего изобретения, например композициями и способами, предназначенными для лечения желудочно-кишечных болезней и состояний (которые в некоторых вариантах осуществления представляют собой способы лечения диареи, такой как вызванная ротавирусом диарея), для обеспечения регидрата-

ции, для исправления дисбаланса электролитов и жидкостей и/или для улучшения функции тонкого кишечника. Например, фраза "состоит по сути из" означает, что терапевтическая композиция не содержит никаких не указанных ингредиентов, включая, помимо прочего, не указанные свободные аминокислоты, ди-, олиго- или полипептиды или белки; моно-, ди-, олиго- или полисахариды; или углеводы, оказывающие прямое благоприятное или неблагоприятное терапевтическое воздействие на лечение желудочно-кишечных болезней и состояний (которое в некоторых вариантах осуществления является лечением диареи, такой как вызываемая ротавирусом диарея) для обеспечения регидратации, для исправления дисбаланса электролитов и жидкостей и/или для улучшения функции тонкого кишечника.

Кроме того, применение фразы "состоит по сути из" означает, что композиция может включать вещества, не оказывающие терапевтического воздействия на лечение желудочно-кишечных болезней и состояний (которое в некоторых вариантах осуществления является лечением диареи, такой как вызываемая ротавирусом диарея) для обеспечения регидратации, для исправления дисбаланса электролитов и жидкостей и/или для улучшения функции тонкого кишечника; к таким ингредиентам относятся носители, формообразующие, ароматизаторы, красители, консерванты и т.п., которые не влияют на лечение желудочно-кишечных болезней и состояний (которое в одном варианте осуществления является лечением диареи) для обеспечения регидратации, для исправления дисбаланса электролитов и/или для улучшения функции тонкого кишечника.

В контексте данного описания термин "олигопептид" означает пептид, состоящий из аминокислот в количестве от трех до двадцати.

В контексте данного описания термин "олигосахарид" означает сахарид, состоящий из моносахаридов в количестве от трех до двадцати. В контексте данного описания термин "углеводы" означает соединения, имеющие общую формулу  $C_n(H_2O)_n$ , где  $n$  является целым числом от 1; и включает моносахариды, дисахариды, олигосахариды и полисахариды.

Общая осмолярность композиции составляет приблизительно от 230 до 280 мосмоль или любое значение между этими значениями. Предпочтительно общая осмолярность составляет приблизительно от 250 до 260 мосмоль. В другом варианте осуществления композиция имеет общую осмолярность в любом значении ниже 280 мосмоль.

В некоторых вариантах осуществления уровень pH композиции составляет приблизительно от 7,1 до 7,9 или любое значение между этими значениями. Предпочтительно уровень pH композиции составляет приблизительно от 7,3 до 7,5, более предпочтительно приблизительно от 7,2 до 7,4, еще более предпочтительно приблизительно 7,2.

В некоторых вариантах осуществления композиция не содержит одного или нескольких ингредиентов, выбранных из группы, к которой относятся олиго- или полисахариды или углеводы; олиго- или полипептиды или белки; липиды; коротко-, средне- и/или длинноцепочечные жирные кислоты; и/или пищевой продукт, содержащий один или несколько вышеупомянутых питательных веществ.

Лечение желудочно-кишечных болезней и состояний.

Еще один аспект настоящего изобретения обеспечивает способы лечения желудочно-кишечных болезней и состояний. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения диареи, для обеспечения регидратации, для исправления дисбаланса электролитов и жидкостей и/или для улучшения функции тонкого кишечника. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает лечение от вызываемой ротавирусом диареи. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение обеспечивает лечение от диареи, вызванной NSP4.

В одном варианте осуществления способ включает введение энтеральным путем субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества композиции согласно изобретению. Композиция может вводиться один или несколько раз в день. В одном варианте осуществления композицию вводят перорально.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает снижение секреции  $Cl^-$  и/или  $HCO_3^-$  и/или улучшение абсорбции жидкости.

В контексте данного описания термин "лечение" или любая его грамматическая форма (например, "лечить" и т.п.) включает, помимо прочего, ослабление или уменьшение симптомов болезни или состояния; и/или уменьшение тяжести болезни или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение включает один или несколько из следующих аспектов: ослабление или уменьшение диареи, уменьшение тяжести диареи, сокращение длительности диареи, содействие выздоровлению кишечника, обеспечение регидратации, исправление дисбаланса электролитов, содействие заживлению слизистой оболочки тонкого кишечника и увеличение высоты ворсин у субъекта с диареей.

В контексте данного описания термин "эффективное количество" означает количество, способное излечивать или ослаблять болезнь или состояние или иным образом способное создавать предусмотренный терапевтический эффект.

В контексте данного описания термин "субъект" или "пациент" означает организм, включая млекопитающих, например приматов, для которых предусмотрено лечение с применением композиций согласно настоящему изобретению. К видам млекопитающих, для которых могут быть благоприятными описываемые способы лечения, относятся, помимо прочих, человекообразные обезьяны, шимпанзе, орангуты-

ны, человек, нечеловекообразные обезьяны; одомашненные животные, такие как собака, кошка; домашний скот, например лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, куры; и другие животные, такие как мыши, крысы, морские свинки и хомяки.

В одном варианте осуществления человек является грудным ребенком в возрасте до одного года или ребенком любого возраста до одного года, например 10, 6 и 4 месяца. В другом варианте осуществления человек является ребенком в возрасте до пяти лет или любого возраста до пяти лет, например в возрасте четырех, трех или двух лет. В одном варианте осуществления субъект, нуждающийся в лечении согласно настоящему изобретению, страдает от диареи.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от диареи. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от диареи, вызванной патогенными инфекциями, включая, помимо прочего, инфицирование вирусами, включая, помимо прочего, ротавирус, норовирус, цитомегаловирус и гепатит; бактериями, включая, помимо прочего, кампилобактер, сальмонеллу, шигеллу, *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli*; паразитами, включая, помимо прочего, *Giardia lamblia* и криптоспоридию. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от вызываемой ротавирусом диареи.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от диареи, вызванной повреждением тонкого кишечника, вызванного, например, инфекцией, токсинами, химикатами, алкоголем, воспалением, аутоиммунными болезнями, раком, химиотерапией, лучевой терапией, протонной терапией и хирургической операцией желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от диареи, вызванной болезнями, включая, помимо прочего, воспалительные болезни кишечника (IBD), включая болезнь Крона и язвенный колит; синдром раздраженной толстой кишки (IBS); аутоиммунную энтеропатию; энтероколит и глютенчувствительную целиакию.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от диареи, вызванной хирургической операцией желудочно-кишечного тракта; резекцией желудочно-кишечного тракта; трансплантацией тонкого кишечника; послеоперационной травмой и вызванным лучевой терапией, химиотерапией и протонной терапией энтеритом.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от связанной с алкоголем диареи. В другом варианте осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от диареи путешественников и/или диареи, вызванной пищевым отравлением.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от диареи, вызываемой повреждением слизистой оболочки тонкого кишечника, например диарейных состояний, характеризующихся уменьшенной высотой ворсин, уменьшенной площадью поверхности слизистой оболочки в тонком кишечнике и атрофией ворсин, например частичным или полным истощением ворсистой области и щеточной каймы. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от диареи, вызываемой повреждением эпителиальных клеток слизистой оболочки тонкого кишечника, включая слизистый слой двенадцатиперстной кишки, тощей кишки и подвздошной кишки.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от секреторной диареи. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от секреторной диареи, опосредованной CFTR-каналами и/или CaCC-каналами (например, TMEM-16a). В одном варианте осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от острой и/или хронической диареи.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от диареи, вызванной нарушением всасывания питательных веществ. В одном варианте осуществления настоящее изобретение может применяться для лечения от секреторной диареи, вызываемой снижением уровня или функциональной активности переносчиков глюкозы, таких, как SGLT-1.

В контексте данного описания термин "диарея" означает состояние, при котором в течение 24-часового периода трижды или большее количество раз случается неоформленный, жидкий или водянистый стул. "Острая диарея" означает диарейные состояния, длящиеся не более четырех недель. "Хроническая диарея" означает диарейные состояния, длящиеся более четырех недель.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение не включает введения одного или нескольких из следующих ингредиентов, выбранных из группы, к которой относятся глюкоза, аналоги глюкозы, субстраты переносчиков глюкозы (например, SGLT-1), ди-, олиго- или полисахариды; углеводы; или молекулы, которые могут быть гидролизированы в глюкозу или субстрат переносчиков глюкозы (например, SGLT-1).

В некоторых альтернативных вариантах осуществления настоящее изобретение включает введение одного или нескольких ингредиентов, выбранных из группы, к которой относятся глюкоза; аналоги глюкозы; субстраты переносчиков глюкозы (например, SGLT-1); ди-, олиго- или полисахариды; углеводы; или молекулы, которые могут быть гидролизированы в глюкозу или субстрат переносчиков глюкозы (например, SGLT-1), причем общая концентрация этих ингредиентов составляет менее 0,05 мМ или является любой концентрацией ниже 0,05 мМ включая, помимо прочего, концентрацию ниже 0,04, 0,03,

0,02, 0,01, 0,008, 0,005, 0,003, 0,001, 0,0005, 0,0003, 0,0001,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  или  $10^{-7}$  мМ.

Композиции и введение.

Настоящее изобретение обеспечивает терапевтическую или фармацевтическую композицию, включающую терапевтически эффективное количество композиции, являющейся предметом изобретения, и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода. Терапевтическая композиция также может включать формообразующие, ароматизаторы, красители, консерванты и т.п., которые не влияют на лечение желудочно-кишечных болезней и состояний (которое в одном варианте осуществления является лечением диареи), для обеспечения регидратации, для исправления дисбаланса электролитов и жидкостей и/или для улучшения функции тонкого кишечника.

В одном варианте осуществления терапевтическая композиция и все содержащиеся в ней ингредиенты являются стерильными. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композицию рецептируют в форме средства для питья, или же композиция предусматривается в форме порошка с возможностью восстановления влажосодержания в воде для использования в форме средства для питья.

Термин "носитель" означает разбавитель, адъювант, формообразующее или основу, с которыми вводят соединение. Примеры подходящих фармацевтических носителей описываются в публикации "Remington's Pharmaceutical Sciences" E.W. Martin. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество терапевтической композиции вместе с соответствующим количеством носителя для обеспечения формы для надлежащего введения пациенту. Рецепт должен соответствовать энтеральному режиму введения.

Изобретение также обеспечивает фармацевтическую упаковку или комплект, включающий одно или несколько вместилищ, заполненных одним или несколькими ингредиентами, например, соединением, носителем или фармацевтическими композициями согласно изобретению. Ингредиенты композиции могут быть упакованы отдельно или могут быть смешаны между собой. Комплект также может включать инструкции по введению композиции пациенту.

Материалы и способы.

Композиция для животных.

Получавших нормальное питание 8-недельных самцов, утвержденных Национальными институтами здравоохранения домашних мышей, умерщвляют углекислым газом с последующим смещением шейных позвонков. Тонкий кишечник осторожно извлекают и отрезок промывают и ополаскивают в ледяном растворе Рингера. Затем слизистую оболочку отделяют от серозной оболочки и мышечных слоев путем страйпинга через подслизистую плоскость, как описывалось ранее (Zhang et al. (2007), J. Physiol. 581(3):1221-1233). После обескровливания слизистую оболочку подвздошной кишки берут из 10 см отрезка поблизости от слепой кишки. Все эксперименты были утверждены Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных Флоридского университета.

Биоэлектрические измерения.

Исследования ионного переноса выполняют на листовом материале подвздошной кишки. Затем ткани закрепляют между двумя половинами люцитовой камеры Уссинга с площадью открытой поверхности  $0,3 \text{ см}^2$  (P2304, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA). Регулярный раствор Рингера (115 мМ NaCl, 25 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , 4,8 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 1,2 мМ  $\text{CaCl}_2$ ), барботированный 95%  $\text{O}_2$ : 5%  $\text{CO}_2$ , используют с двух сторон в качестве промывочного раствора для тканей и температуру поддерживают на неизменном уровне  $37^\circ\text{C}$ . Камеры уравнивают для устранения осмотических и гидростатических сил. Также компенсируют сопротивление от жидкости. Тканям дают стабилизироваться. Основной ток короткого замыкания ( $I_{sc}$ ) и соответствующую проводимость (G) записывают с использованием компьютеризированного вольт-амперного зажимного устройства (VCC MC-8, Physiologic Installments).

Исследования потока.

Изотоп натрия,  $^{22}\text{Na}$ , используют для исследования потока Na через слизистую оболочку в основных условиях с последующим добавлением глюкозы. Спаренные по проводимости ткани предусмотрены для изучения потока от серозной до слизистой оболочки ( $J_{sm}$ ), представляющего секреторную функцию, и для изучения потока от слизистой до серозной оболочки ( $J_{ms}$ ), представляющего абсорбционную функцию.  $^{22}\text{Na}$  добавляют на указанной стороне ткани и образцы по 500 мкл собирают каждые 15 мин с другой стороны. В отдельном наборе тканей  $^{36}\text{Cl}$  добавляют на серозной или слизистой стороне. Глюкозу в концентрации 8 мМ добавляют в камеру для полной стимуляции и записывают соответствующие изменения  $I_{sc}$  и проводимости. Проводимость записывают на основе закона Ома.

Собирают три образца при каждом условии. Радиоактивность подсчитывают при помощи гамма-счетчика. Подбирают ткани с изменением проводимости менее чем 10% и рассчитывают среднее значение

$$J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$$

Исследование ингибитора протеинкиназы А (РКА).

Ткани, спаренные по подобию проводимости и тока, обрабатывают с применением или без применения 100 мкМ Н-89 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA), необратимого ингибитора протеинкиназы А (РКА). Ткани инкубируют с Н-89 в течение 30 мин. Глюкозу с повышающейся концентрацией (0,015-8 мМ) добавляют каждые 5 мин и записывают пиковый ток. Константу кинетики насыщения рассчитывают для соответствующих  $K_m$  и  $V_{max}$  для обработанных и необработанных тканей.

Культура клеток Сасо-2.

Клетки Сасо-2 дифференцируют после слияния в клетки с функциональными характеристиками эмбрионального эпителия подвздошной кишки. Клетки Сасо-2 вырабатывают микроворсины и обладают повышенной экспрессией специфических транспортных белков тонкого кишечника, включая SGLT1, и, таким образом, широко применяются в качестве модельной системы для изучения функции энтероцитов.

Клетки Сасо-2 получают от АТТС и культивируют в модифицированной Дульбекко среде Игла, дополненной 10% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (FCS) и 1% заменимыми аминокислотами, при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки Сасо-2 пассируют 20-25 раз и высевают ( $2 \times 10^5$  клеток/чашку) на 5 см чашки Петри и выращивают до слияния 80%, когда концентрация FCS изменяется до 5%. Клетки выращивают еще в течение 10 дней до их использования для функциональных исследований.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия Ca<sup>2+</sup>.

Клетки Сасо2, выращиваемые на 25 мм покровных стеклах, закрепляют на термостатированной ванне RC-21BR, прикрепленной к переходнику 20-й серии (Warner Instruments, CT USA). Клетки поддерживают при 37°C, используя одноканальный настольный терморегулятор (TC-324B, Warner Instruments, CT, USA). Клетки загружают с флуоресцентным красителем - индикатором кальция Fluo-8 AM (Cat # 0203, TEFLab, Inc., Austin, TX USA) в концентрации 0,5 мкМ при комнатной температуре и инкубируют в течение 45 мин. Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию выполняют с применением инвертированного микроскопа Fluoview 1000 IX81 (Olympus, Tokyo, Japan) и объектива U Plan S-Apo 20x. Флуоресценцию записывают при помощи аргоновых лазеров с возбуждением при 488 нм и излучением при 515 нм. Флуоресцентные изображения собирают при помощи сканирующего конфокального микроскопа. В каждую ванну добавляют растворы, такие как раствор Рингера, раствор Рингера с содержанием глюкозы или раствор Рингера с содержанием глюкозы и ВАРТА-АМ с применением многоклапанной перфузионной системы (VC-8, Warner Instruments, Hamden CT, USA), контролируемой при помощи клапанного контроллера VC-8 (Warner Instruments, Hamden CT, USA). Изменения записывают и измеряют флуоресценцию для различных клеток. Клетки промывают раствором Рингера и эксперимент повторяют с применением 3-О-метилглюкозы и карбехола (положительный контроль).

Колориметрические измерения сАМР.

Свежевыделенные соскобы эпителиальных клеток слизистой оболочки подвздошной кишки трижды промывают в растворе Рингера, содержащем 1,2 мМ Ca<sup>2+</sup> при 37°C. Промытые клетки затем разделяют на две группы и обрабатывают солевым раствором или 6 мМ глюкозы и инкубируют в течение 45 мин. Клетки обрабатывают 0,1М HCl для прекращения эндогенной активности фосфодиэстеразы. Лизаты затем используют для анализа сАМР с применением комплекта для прямого иммуноанализа сАМР (Calbiochem, USA).

Для количественного анализа сАМР применяют поликлональное антитело к сАМР, которое конкурентно связывается с сАМР в образцах. После одновременной инкубации при комнатной температуре излишки реагентов смывают и добавляют субстраты. После кратковременной инкубации реакцию прекращают и образовавшийся желтый цвет считают при 405 нм. Интенсивность цвета обратно пропорциональна концентрации сАМР в стандартах и образцах. Значения сАМР унифицируют со значениями белка соответствующих фракций и выражают в пикомолях (мг белка)<sup>-1</sup>.

Обработанные форсколином клетки используют в качестве положительного контроля. Обработанные глюкозой и форсколином клетки инкубируют в течение 45 мин. Все анализы выполняют в трех экземплярах и повторяют до n=4 разных мышей.

### Примеры

Далее представлены примеры, поясняющие процедуры и варианты практического осуществления изобретения. Эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие. Все процентные показатели указываются по массе, и все пропорции смеси указываются по объему, если не указано иного.

Пример 1. Стимулируемое глюкозой повышение  $I_{sc}$  в подвздошной кишке.

Этот пример демонстрирует, что глюкоза стимулирует повышение  $I_{sc}$  подвздошной кишки у мышей. В частности, добавление глюкозы (8 мМ) со стороны просвета в результате ведет к значительному повышению  $I_{sc}$  по сравнению с исходным уровнем ( $3,4 \pm 0,2$  vs  $1,1 \pm 0,1$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>). Показатель  $I_{sc}$ , полученный с применением исследований в стандартной камере Уссинга, является суммой движения чистых ионов через эпителий ( $I_{sc} = J_{net}Na^+ + J_{net}Cl^- + J_{net}HCO_3^- - J_{net}K^+$ ).

Механизмы (ЕНaС-опосредованные) абсорбции Na<sup>+</sup> или секреции Na<sup>+</sup> в тонком кишечнике неизвестны. Лечение стороны слизистой оболочки тонкого кишечника с применением 10 мкМ амилорида, ингибитора эпителиального натриевого канала, никак не воздействует на  $I_{sc}$ .

Таким образом, базовый показатель  $I_{sc}$   $1,1 \pm 0,1$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> в первую очередь обусловлен активностью муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (CFTR) из крипты и секреторным потоком  $K^+$ .

Для определения кинетики насыщения транспорта  $Na^+$ -связанной глюкозы глюкозу с повышающейся концентрацией до 8 мМ добавляют со стороны просвета в присутствии 140 мМ  $Na^+$ . Глюкоза с повышающейся концентрацией в результате дает повышенный, но насыщаемый показатель  $I_{sc}$  (фиг. 1А), с  $K_m$   $0,24 \pm 0,03$  мМ и  $V_{max}$   $3,6 \pm 0,19$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> для глюкозы. При концентрации глюкозы от 0,5 до 0,7 мМ кинетика насыщения глюкозой демонстрирует ранние признаки насыщения; несмотря на это непрерывное повышение концентрации глюкозы приводит к непрерывному повышению показателя  $I_{sc}$ , таким образом ведя к перегибу кривой насыщения глюкозой при концентрации глюкозы от 0,5 до 0,7 мМ.

Пример 2. Стимулируемое 3-О-метилглюкозой повышение  $I_{sc}$ .

В этом примере исследовали, обусловлена ли кинетика насыщения глюкозой, наблюдаемого в примере 1, SGLT1-опосредованным транспортом, а не метаболизмом глюкозы в эпителиальных клетках. В частности, 3-О-метилглюкозу (3-ОМГ), слабо метаболизируемую форму глюкозы, добавляют со стороны просвета для изучения кинетики насыщения транспорта  $Na^+$ -связанной глюкозы.

Фиг. 1В показывает кинетику насыщения 3-ОМГ с показателем  $V_{max}$   $2,3 \pm 0,13$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> и  $K_m$   $0,22 \pm 0,07$  мМ). Добавление 3-ОМГ в результате ведет к значительному снижению  $V_{max}$  ( $2,3 \pm 0,13$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> vs  $3,4 \pm 0,2$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) без изменений  $K_m$  в транспорте  $Na^+$ -связанной глюкозы по сравнению с показателем глюкозы. Как и в случае глюкозы, наблюдается перегиб с 3-ОМГ при концентрации от 0,5 до 0,7 мМ (фиг. 1В).

Пример 3. Стимулируемый глюкозой показатель  $I_{sc}$  в присутствии Н-89.

Согласно известным ныне механизмам транспорта стимулированное глюкозой повышение  $I_{sc}$  может быть результатом электрогенной секреции анионов или электрогенной абсорбции  $Na^+$ .

Протеинкиназа А (РКА), также известная как сАМР-зависимая протеинкиназа, требуется для активации CFTR-каналов. Для изучения роли для РКА в вызываемом глюкозой повышении  $I_{sc}$  ткани закрепляют в камерах Уссинга и инкубируют с Н-89, ингибитором РКА, в течение 45 мин. Затем ткани используют для изучения кинетики насыщения глюкозой.

В присутствии Н-89 глюкоза демонстрирует  $V_{max}$   $0,8 \pm 0,06$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> и  $K_m$   $0,58 \pm 0,08$  мМ. Перегиб в кривой насыщения глюкозой (наблюдаемый при инкубации тканей подвздошной кишки инкубируют с глюкозой в концентрации от 0,5 до 0,7 мМ) полностью исчезает при предварительной обработке клеток подвздошной кишки Н-89 со сдвигом кривой насыщения вправо (фиг. 1С). Результаты указывают на ингибирование процессов РКА-зависимого транспорта при низкой концентрации глюкозы.

Подобно кривой насыщения глюкозой, 3-ОМГ также демонстрирует РКА-чувствительный поток. Кривая насыщения 3-ОМГ (с инкубацией Н-89) существенно не отличается от наблюдаемой с глюкозой (с инкубацией Н-89) (фиг. 1А и В).

Изменения в кинетике насыщения глюкозой и 3-О-метилглюкозой в присутствии и в отсутствие Н-89 - ингибитора РКА

|                | $V_{max}$     | $K_m$         | $V_{max}$     | $K_m$         |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Ингибиторы РКА | -             | -             | Н-89          | Н-89          |
| Глюкоза        | $3,6 \pm 0,2$ | $0,2 \pm 0,1$ | $1,6 \pm 0,1$ | $0,5 \pm 0,1$ |
| 3-ОМГ          | $2,7 \pm 0,1$ | $0,2 \pm 0,1$ | $1,4 \pm 0,1$ | $0,6 \pm 0,1$ |

\*Часть стимулированного глюкозой и 3-ОМГ потока прекращается в присутствии РКА. Результаты указаны для n=8 тканей.

Результаты указывают, что ингибируемый РКА поток (показанный в таблице) является результатом транспорта  $Na^+$ -связанной глюкозы, а не других внутриклеточных метаболизм с участием глюкозы (см. таблицу).

РКА играет значительную роль в сАМР-опосредованной секреции анионов и SGLT1-опосредованной абсорбции  $Na^+$  и глюкозы. Наличие нечувствительного к Н-89 потока указывает, что глюкоза стимулирует не опосредованную РКА секрецию анионов (такую, как опосредованная внутриклеточным  $Ca^{2+}$  секреция).

Пример 4. Прекращение стимулированного глюкозой повышения  $I_{sc}$  в присутствии флоризина.

Чтобы исследовать, прекращает ли ингибирование транспорта глюкозы чувствительный к РКА поток, проводят эксперименты с использованием флоризина (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), обратимого конкурентного ингибитора SGLT1. В частности, ткани подвздошной кишки, закрепленные в камере Уссинга, обрабатывают 100 мкМ флоризина на стороне просвета и проводят исследования кинетики насыщения глюкозой.

Результаты демонстрируют, что стимулированное глюкозой и/или 3-ОМГ повышение  $I_{sc}$  полностью прекращается в присутствии флоризина (фиг. 1С). Результаты указывают, что активность переносчика глюкозы через SGLT1 существенна для чувствительного и нечувствительного к РКА потока.

Пример 5. Влияние глюкозы на однонаправленный и результирующий поток натрия.

Измерения изотопного потока  $\text{Na}^+$  выполняют с использованием  $^{22}\text{Na}$  при неизменной скорости переноса от слизистой до серозной оболочки  $J_{\text{ms}}$  или от серозной до слизистой оболочки  $J_{\text{sm}}$ . Результирующий поток  $\text{Na}^+$  рассчитывают при помощи уравнения

$$J_{\text{net}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}} + J_{\text{net}}$$

указывает на чистую абсорбцию; при этом  $-J_{\text{net}}$  указывает на чистую секрецию.

В отсутствие глюкозы (0 мМ) ткани тонкого кишечника демонстрируют абсорбцию чистого натрия ( $1,8 \pm 0,3$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>). Абсорбция  $\text{Na}^+$  прекращается в присутствии 0,6 мМ глюкозы. Однако добавление 6 мМ глюкозы в результате ведет к значительному повышению  $J_{\text{net}} \text{Na}^+$  ( $3,2 \pm 0,5$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>), указывая на абсорбцию чистого натрия. Однонаправленные потоки  $\text{Na}^+$  не демонстрируют значительной разницы при 0, 0,6 и 6 мМ глюкозы (фиг. 2В).

Пример 6. Влияние глюкозы на однонаправленный и результирующий поток хлорида.

Изменение  $I_{\text{sc}}$  при 0,6 мМ глюкозы рассчитывают как  $1,1$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> ( $2,2 \pm 0,3 - 1,1 \pm 0,1$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>), а изменение  $I_{\text{sc}}$  при 6 мМ глюкозы рассчитывают как  $2,2$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> ( $3,4 \pm 0,2 - 1,1 \pm 0,1$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>). Повышение  $I_{\text{sc}}$  с увеличивающейся концентрацией глюкозы не может полностью объясняться на основе значений  $J_{\text{net}} \text{Na}^+$  (на основе значений при 0,6 и 6 мМ глюкозы).

Измерения изотопного потока для  $\text{Cl}^-$  выполняют с использованием  $^{36}\text{Cl}$  для того, чтобы определить, обуславливает ли поток  $\text{Cl}^-$  часть  $I_{\text{sc}}$ , которая не может объясняться  $J_{\text{net}} \text{Na}^+$ . Показатель  $J_{\text{net}} \text{Cl}^-$ , рассчитанный в отсутствие глюкозы, указывает на абсорбцию  $\text{Cl}^-$  ( $2 \pm 0,3$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>). Уровень абсорбции натрия ( $1,8 \pm 0,3$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) сравним с показателем хлорида ( $2,0 \pm 0,3$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) в отсутствие глюкозы, указывая на электронейтральную абсорбцию  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ .

Добавление 0,6 или 6 мМ глюкозы на слизистой стороне приводит к секреции чистого  $\text{Cl}^-$  (фиг. 2А).  $J_{\text{net}} \text{Cl}^-$  при 0,6 мМ глюкозы ( $-3,6 \pm 0,8$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) и 6 мМ глюкозы ( $-4,0 \pm 1,4$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) существенно не отличаются.

Результаты демонстрируют наличие значительного повышения  $J_{\text{sm}} \text{Cl}^-$  в присутствии глюкозы (при 0,6 и 6 мМ глюкозы) ( $J_{\text{sm}} \text{Cl}^-$   $16,9 \pm 0,7$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> и  $17 \pm 0,7$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> соответственно) по сравнению с  $J_{\text{sm}} \text{Cl}^-$  в отсутствие глюкозы ( $11,9 \pm 0,4$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) (фиг. 2А). Результаты указывают на значительную секрецию  $\text{Cl}^-$  при концентрации глюкозы всего 0,6 мМ. Повышение концентрации глюкозы не ведет к повышению секреции  $\text{Cl}^-$ .

Пример 7. Секреция  $\text{HCO}_3^-$  в подвздошной кишке в отсутствие глюкозы в просвете.

Трансэпителиальные электрические измерения и исследования потока показывают, что добавление глюкозы к тканям подвздошной кишки вызывает значительную секрецию  $\text{Cl}^-$ . Хотя  $J_{\text{net}} \text{Cl}^-$  при 0,6 и 6 мМ глюкозы демонстрирует значительную секрецию анионов, это не объясняет всех изменений  $I_{\text{sc}}$ , особенно с учетом значительных различий между значениями  $I_{\text{sc}}$  при 6 мМ глюкозы  $6$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> ( $7,5 \pm 0,4 - 1,5 \pm 0,1$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) и 0,6 мМ.

Статистические исследования рН выполняют для того, чтобы определить, участвует ли секреция  $\text{HCO}_3^-$  в неучтенной части  $I_{\text{sc}}$ . Авторами настоящего изобретения было распознано как минимум два режима секреции  $\text{HCO}_3^-$  в тонком кишечнике мыши:

- 1)  $\text{Cl}^-$  зависимый, электронейтральный обмен  $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$  и
- 2)  $\text{Cl}^-$ -независимая электрогенная секреция  $\text{HCO}_3^-$ .

Результаты демонстрируют, что эндогенная секреция  $\text{HCO}_3^-$  не участвует в чистой секреции  $\text{HCO}_3^-$ . В частности, не содержащий  $\text{HCO}_3^-$  слабо буферированный раствор добавляют с обеих сторон тканей, закрепленных в камере Уссинга, и обе стороны тканей барботируют 100%  $\text{O}_2$ . В таких условиях записывают минимальную секрецию  $\text{HCO}_3^-$  ( $0,1 \pm 0,01$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>,  $n=12$ ). Последующее добавление содержащего  $\text{HCO}_3^-$  буферного раствора на базолатеральной стороне и барботирование 95%  $\text{O}_2$  и 5%  $\text{CO}_2$  на этой стороне приводит в значительной секреции  $\text{HCO}_3^-$   $3,8 \pm 0,2$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup> ( $n=9$ ).

Чтобы определить, играет ли независимая от  $\text{Cl}^-$  просвета секреция  $\text{HCO}_3^-$  роль в секреции  $\text{HCO}_3^-$  (в отсутствие глюкозы в просвете), статистические эксперименты рН выполняют в отсутствие  $\text{Cl}^-$  просвета. В отсутствие  $\text{Cl}^-$  просвета записывают минимальную секрецию  $\text{HCO}_3^-$  ( $0,4 \pm 0,1$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) (фиг. 5А). Результаты указывают, что основная секреция  $\text{HCO}_3^-$  в отсутствие глюкозы в просвете главным образом обусловлена  $\text{Cl}^-$ -зависимым электронейтральным обменом  $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ .

Пример 8. Влияние глюкозы в просвете на секрецию  $\text{HCO}_3^-$  в подвздошной кишке.

Статистические эксперименты рН выполняют для определения влияния глюкозы на зависимость от  $\text{Cl}^-$  просвета секрецию  $\text{HCO}_3^-$ . В присутствии  $\text{Cl}^-$  просвета добавление глюкозы со стороны просвета приводит к значительной секреции  $\text{HCO}_3^-$  ( $7,6 \pm$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>).

Секреция  $\text{HCO}_3^-$  в присутствии глюкозы может быть обусловлена зависимым от  $\text{Cl}^-$  просвета электронейтральным обменом  $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$  или независимой от  $\text{Cl}^-$  просвета опосредованной анионными каналами секреции  $\text{HCO}_3^-$ . Для оценки механизма стимулируемой глюкозой секреции  $\text{HCO}_3^-$  глюкоза добавляют со стороны слизистой оболочки. Удаление  $\text{Cl}^-$  просвета не прекращает секрецию  $\text{HCO}_3^-$  в тканях, инкубированных с 6 мМ глюкозы ( $3,2 \pm 0,6$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) (фиг. 5А). Результаты указывают, что секреция  $\text{HCO}_3^-$  в присутствии глюкозы главным образом обусловлена независимой от  $\text{Cl}^-$  просвета секрецией и

опосредована анионными каналами.

В другом эксперименте 100 мкМ 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойной кислоты (NPPB), неспецифического блокатора анионных каналов, добавляют со стороны просвета. NPPB ингибирует независимую от  $\text{Cl}^-$  просвета секрецию  $\text{HCO}_3^-$ , обнаруживаемую в присутствии 6 мМ глюкозы (фиг. 5B). Результаты указывают, что стимулируемая глюкозой секреция  $\text{HCO}_3^-$  опосредуется через анионный канал.

Чтобы исследовать, происходит ли вызванная глюкозой секреция  $\text{HCO}_3^-$  через канал CFTR, 100 мкМ глибенкламида добавляют со стороны просвета. Глибенкламид ингибирует независимую от  $\text{Cl}^-$  просвета секрецию  $\text{HCO}_3^-$ , стимулируемую глюкозой, указывая на то, что каналы CFTR опосредуют стимулируемую глюкозой секрецию  $\text{HCO}_3^-$ .

Пример 9. Влияние метаболизма глюкозы на опосредованную анионными каналами секрецию  $\text{HCO}_3^-$ .

Чтобы определить, объясняет ли метаболизм глюкозы в ткани тонкого кишечника стимулируемую глюкозой секрецию  $\text{HCO}_3^-$ , ткани тонкого кишечника инкубируют с 3-ОМГ, слабо метаболизируемой формой глюкозы, в отсутствие  $\text{HCO}_3^-$  просвета и ванны. Секреция  $\text{HCO}_3^-$  ( $0,1 \pm 0,03$  мэкв·ч<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>) наблюдается в присутствии 3-ОМГ (6 мМ) и в отсутствие  $\text{HCO}_3^-$  просвета и ванны.

Пример 10. Влияние глюкозы на уровень внутриклеточного cAMP в подвздошной кишке.

В отсутствие глюкозы лизаты клеток из клеток ворсин демонстрируют более высокий уровень внутриклеточного cAMP по сравнению с уровнем в клетках крипт. Инкубация с форсколином в результате ведет к значительному повышению уровня [cAMP]<sub>i</sub> в клетках ворсин и крипт (фиг. 3A). Обработанные форсколином клетки используют в качестве положительного контроля.

Для изучения влияния глюкозы на уровень внутриклеточного cAMP клетки ворсин и крипт инкубируют с 6 мМ глюкозы. Инкубация лизатов вирусных клеток с глюкозой в результате ведет к значительному повышению уровня внутриклеточного cAMP по сравнению с показателем клеток крипт (фиг. 3B). Результаты указывают, что опосредованное глюкозой повышение уровня внутриклеточного cAMP играет роль в опосредовании стимулированной глюкозой секреции анионов. Повышение [cAMP]<sub>i</sub> наблюдается в клетках ворсин, но не в клетках крипт; это указывает на то, что механизм транспорта глюкозы требуется только в полностью созревших и дифференцированных эпителиальных клетках ворсин.

Чтобы определить, влияет ли метаболизм глюкозы на уровень внутриклеточного cAMP, соскобы слизистой оболочки из подвздошной кишки предварительно инкубируют с 3-ОМГ в течение 45 мин, а затем лизаты клеток используют для измерения уровня внутриклеточного cAMP.

Подобно глюкозе, инкубация клеток ворсин с 3-ОМГ в концентрации 0,6 и 6 мМ приводит к значительному повышению уровня внутриклеточного cAMP (фиг. 3C). Инкубация клеток ворсин с 3-ОМГ при 6 мМ приводит к значительному повышению уровня внутриклеточного cAMP по сравнению с 6 мМ глюкозы ( $P < 0,01$ ) (фиг. 3C). Результаты демонстрируют, что наблюдаемое повышение уровня внутриклеточного cAMP не вызвано метаболизмом глюкозы в тканях тонкого кишечника.

Пример 11. Влияние глюкозы на внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$  в линиях клеток Caco2.

Ингибитор РКА (Н-89) ингибирует стимулируемую cAMP секрецию анионов и опосредованный SGLT1 транспорт глюкозы. Наличие нечувствительного к Н-89  $I_{sc}$  (фиг. 1A и B) указывает, что РКА-независимый механизм также участвует в вызываемой глюкозой секреции. В качестве cAMP внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$  является одним из главных внутриклеточных вторичных мессенджеров, участвующих в секреции анионов.

Для определения роли внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в стимулированном глюкозой повышении  $I_{sc}$  уровень внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  измеряют в присутствии различных концентраций глюкозы и 3-ОМГ, соответственно, и в присутствии ВАРТА-АМ (1,2-бис-(о-аминофенокси)этан- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -тетрауксусной кислоты) - внутриклеточного кальций-специфического хелатирующего агента. Реакцию  $\text{Ca}^{2+}$  на глюкозу и 3-ОМГ в культивируемых клетках Caco2, нагруженных индикатором  $\text{Ca}^{2+}$  fluo 8, наблюдают при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Добавление 0,6 мМ глюкозы к среде ванны вызывает колебания внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (фиг. 4B). Амплитуда колебаний со временем снижается. Рассчитанная средняя пиковая амплитуда флуоресценции кальция (F/Fo) с 0,6 мМ глюкозы составляет  $1,32 \pm 0,1$  ( $n=10$ ).

Вызванное глюкозой колебание  $\text{Ca}^{2+}$  не связано с внутриклеточным метаболизмом глюкозы, поскольку 0,6 мМ 3-ОМГ глюкозы вызывает подобное колебание  $\text{Ca}^{2+}$  ( $1,2 \pm 0,1$  ( $n=10$ )) (фиг. 4A). Стимулируемое глюкозой колебание  $\text{Ca}^{2+}$  устраняют путем предварительной инкубации клеток с хелатирующим агентом внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  ВАРТА-АМ в течение 45 мин ( $1,01 \pm 0,1$ ) ( $n=10$ ) (фиг. 4A).

Глюкозу добавляют в более высокой концентрации (6 мМ), чтобы определить, увеличивает ли повышенная концентрация глюкозы амплитуду колебаний  $\text{Ca}^{2+}$ . Колебания  $\text{Ca}^{2+}$  значительно повышаются при добавлении глюкозы ( $1,85 \pm 0,2$  vs  $1,32 \pm 0,1$ ) или 3-ОМГ ( $1,5 \pm 0,1$  vs  $1,2 \pm 0,2$ ) в количестве 6 мМ к среде ванны по сравнению с показателем 0,6 мМ глюкозы или 3-ОМГ (фиг. 4A). Стимулируемое глюкозой увеличение колебаний  $\text{Ca}^{2+}$  полностью устраняется путем предварительной инкубации клеток с ВАРТА-АМ (фиг. 4A). Это указывает на то, что внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$  участвует в вызываемой глюкозой секреции анионов.

Пример 12. Терапевтическая композиция для лечения от диареи.

В некоторых вариантах осуществления этот пример обеспечивает композицию для лечения от диареи, такой как вызываемая ротавирусом диарея. В одном варианте осуществления композиция не включает глюкозы, аналогов глюкозы, субстратов переносчиков глюкозы или молекул сахара.

| <b>Композиция 1</b><br>(на флакон размера 1 (237 мл)) |                      |                   |
|---|----------------------|-------------------|
|   | Количество на порцию | % суточной нормы* |
| L-Валин   | 276 мг *             |                   |
| L-Аспарагиновая кислота                               | 252 мг *             |                   |
| L-Серин   | 248 мг *             |                   |
| L-Изолейцин   | 248 мг *             |                   |
| L-Треонин   | 225 мг *             |                   |
| L-Лизин HCL   | 172 мг *             |                   |
| L-Глицин  | 141 мг *             |                   |
| L-Тирозин   | 51 мг *              |                   |
| Другие ингредиенты: вода, электролиты                 |                      |                   |

Все приведенные авторами источники, включая публикации, патентные заявки и патенты, включены путем ссылки в том же объеме, как если бы каждый источник был отдельно и специально указан как включенный путем ссылки и был изложен в этом описании в полном объеме.

Термины, указанные в единственном числе, и другие подобные объекты, указанные в контексте описания изобретения, следует рассматривать как охватывающие как единственное, так и множественное число, если авторами не указывается иного или если это явно не противоречит контексту.

Указание диапазонов значений предусмотрено лишь в качестве способа сокращенного представления каждого отдельного значения, охватываемого этим диапазоном, если авторами не указывается иного, и каждое отдельное значение включается в описание, как если бы оно было отдельно указано авторами. Если не указано иного, все указанные авторами конкретные значения представляют соответствующие приблизительные значения (например, все конкретные типичные значения, представленные в отношении конкретного фактора или измерения могут рассматриваться как такие, что также предусматривают соответствующее приблизительное измерение, с определением "приблизительно" в соответствующих случаях).

Использование любых и всех примеров или указание в качестве примера (например, выражение "такие, как") предусмотрено лишь для улучшенного освещения изобретения и не предполагает ограничения объема изобретения, если не указано иного. Ни одна формулировка в описании не должна рассматриваться как указывающая на какой-либо элемент в качестве существенного для практического осуществления изобретения, если этого прямо не указано.

Описание любого аспекта или варианта осуществления изобретения с применением таких терминов, как "включает", "имеет", "охватывает" или "содержит" по отношению к элементу или элементам предусматривается в подтверждение подобного аспекта или варианта осуществления изобретения, который "состоит из", "главным образом состоит из" или "главным образом включает" этот конкретный элемент или элементы, если не указано иного или если это явно не противоречит контексту (например, композиция, описываемая авторами как включающая конкретный элемент, также должна рассматриваться как композиция, состоящая из этого элемента, если не указано иного или если это явно не противоречит контексту).

Следует понимать, что описанные авторами примеры и варианты осуществления предусмотрены лишь для пояснения и специалистам станут понятны различные модификации или видоизменения в контексте изобретения, которые соответствуют сущности и объему данного изобретения.

### Библиография

Zhang H, Ameen N, Melvin JE, & Vidyasagar S (2007) Acute inflammation alters bicarbonate transport in mouse ileum. *J Physiol* 581(3):1221-1233.

Hediger MA & Rhoads DB (1994) Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. (Translated from eng) *Physiol. Rev.* 74(4):993-1026 (in eng).

Wright EM, Loo DD, Hirayama BA, & Turk E (2004) Surprising versatility of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters: SLC5. (Translated from eng) *Physiology (Bethesda)* 19:370-376 (in eng).

Chen XZ, Coady MJ, Jackson F, Berteloot A, & Lapointe JY (1995) Thermodynamic determination of the Na<sup>+</sup>: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. (Translated from eng) *Biophys. J.* 69(6):2405-2414 (in eng).

Torres-Pinedo R, Rivera CL, & Fernandez S (1966) Studies on infant diarrhea. II. Absorption of glucose and net fluxes of water and sodium chloride in a segment of the jejunum. (Translated from eng) *J. Clin. Invest.* 45(12):1916-1922 (in eng).

Davidson GP, Gall DG, Petric M, Butler DG, & Hamilton JR (1977) Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets. Intestinal structure and transport. (Translated from eng) *J. Clin. Invest.* 60(6):1402-1409 (in eng).

Nalin DR, *et al.* (1979) Oral rehydration and maintenance of children with rotavirus and bacterial diarrhoeas. (Translated from eng) *Bull. World Health Organ.* 57(3):453-459 (in eng).

Lorrot M & Vasseur M (2007) How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? (Translated from eng) *Virology* 4:31 (in eng).

Chapman MJ, *et al.* (2009) Glucose absorption and gastric emptying in critical illness. (Translated from eng) *Crit Care* 13(4):R140 (in eng).

Telch J, *et al.* (1981) Intestinal glucose transport in acute viral enteritis in piglets. (Translated from eng) *Clin Sci (Lond)* 61(1):29-34 (in eng).

Lo B & Silverman M (1998) Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na<sup>+</sup>/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na<sup>+</sup> and voltage dependence of the transporter. (Translated from eng) *J. Biol. Chem.* 273(45):29341-29351 (in eng).

Wright EM, Hirsch JR, Loo DD, & Zampighi GA (1997) Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters. (Translated from eng) *J. Exp. Biol.* 200(Pt 2):287-293 (in eng).

Dyer J, Vayro S, King TP, & Shirazi-Beechey SP (2003) Glucose sensing in the intestinal epithelium. (Translated from eng) *Eur. J. Biochem.* 270(16):3377-3388 (in eng).

Gribble FM (2008) RD Lawrence Lecture 2008: Targeting GLP-1 release as a potential strategy for the therapy of Type 2 diabetes. (Translated from eng) *Diabet. Med.* 25(8):889-894

(in eng).

Gustavsson N, *et al.* (Synaptotagmin-7 as a positive regulator of glucose-induced glucagon-like peptide-1 secretion in mice. (Translated from eng) *Diabetologia* 54(7):1824-1830 (in eng).

Eissele R, *et al.* (1992) Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. (Translated from eng) *Eur. J. Clin. Invest.* 22(4):283-291 (in eng).

Elliott RM, *et al.* (1993) Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. (Translated from eng) *J. Endocrinol.* 138(1):159-166 (in eng).

Herrmann C, *et al.* (1995) Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. (Translated from eng) *Digestion* 56(2):117-126 (in eng).

Knickerbein RG, Aronson PS, & Dobbins JW (1988) Membrane distribution of sodium-hydrogen and chloride-bicarbonate exchangers in crypt and villus cell membranes from rabbit ileum. *J. Clin. Invest.* 82(6):2158-2163.

Vidyasagar S, Rajendran VM, & Binder HJ (2004) Three distinct mechanisms of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(3):C612-621.

Coon S, Kekuda R, Saha P, & Sundaram U (Reciprocal regulation of the primary sodium absorptive pathways in rat intestinal epithelial cells. (Translated from eng) *Am J Physiol Cell Physiol* 300(3):C496-505 (in eng).

Hu Z, *et al.* (2006) MAPKAPK-2 is a critical signaling intermediate in NHE3 activation following Na<sup>+</sup>-glucose cotransport. (Translated from eng) *J. Biol. Chem.* 281(34):24247-24253 (in eng).

Turner JR & Black ED (2001) NHE3-dependent cytoplasmic alkalinization is triggered by Na<sup>(+)</sup>-glucose cotransport in intestinal epithelia. (Translated from eng) *Am J Physiol Cell Physiol* 281(5):C1533-1541 (in eng).

Donowitz M & Li X (2007) Regulatory binding partners and complexes of NHE3. (Translated from eng) *Physiol. Rev.* 87(3):825-872 (in eng).

Zachos NC, Kovbasnjuk O, & Donowitz M (2009) Regulation of intestinal electroneutral sodium absorption and the brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger by intracellular calcium. (Translated from eng) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165:240-248 (in eng).

Zachos NC, *et al.* (2009) NHERF3 (PDZK1) contributes to basal and calcium inhibition of NHE3 activity in Caco-2BBE cells. (Translated from eng) *J. Biol. Chem.* 284(35):23708-23718 (in eng).

Donowitz M, *et al.* (2009) NHE3 regulatory complexes. (Translated from eng) *J. Exp. Biol.* 212(Pt 11):1638-1646 (in eng).

Zhu X, *et al.* (Elevated Calcium Acutely Regulates Dynamic Interactions of NHERF2 and NHE3 Proteins in Opossum Kidney (OK) Cell Microvilli. (Translated from eng) *J. Biol. Chem.* 286(40):34486-34496 (in eng).

Caputo A, *et al.* (2008) TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. (Translated from eng) *Science* 322(5901):590-594 (in eng).

Namkung W, Phuan PW, & Verkman AS (TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells. (Translated from eng) *J. Biol. Chem.* 286(3):2365-2374 (in eng).

Engle MJ, Goetz GS, & Alpers DH (1998) Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. (Translated from eng) *J. Cell. Physiol.* 174(3):362-369 (in eng).

Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, & Estes MK (1996) Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. (Translated from eng) *Science* 272(5258):101-104 (in eng).

Rhoads JM, *et al.* (1996) Can a super oral rehydration solution stimulate intestinal repair in acute viral enteritis? (Translated from eng) *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 14(3):175-181 (in eng).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта с диареей, вызванной ротавирусом, включающий введение субъекту один или более раз в день композиции, содержащей свободные аминокислоты L-лизин HCl, L-аспарагиновую кислоту, L-глицин, L-изолейцин, L-треонин, L-тирозин, L-валин и L-серин, электролиты и воду вместе с фармацевтически приемлемыми наполнителями, что приводит к снижению секреции  $Cl^-$  и/или  $HCO_3^-$  посредством исключения глюкозы или аналога глюкозы при лечении.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что аналог глюкозы представляет собой  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид (АМГ), 3-O-метилглюкозу (3-ОМГ), дезокси-D-глюкозу или  $\alpha$ -метил-D-глюкозу.

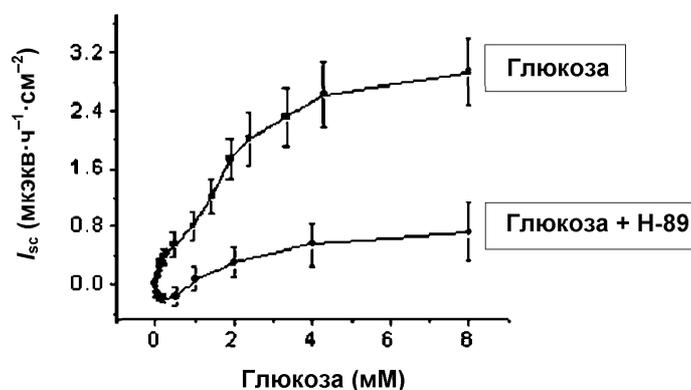
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция не содержит углеводов.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что субъектом является человек.

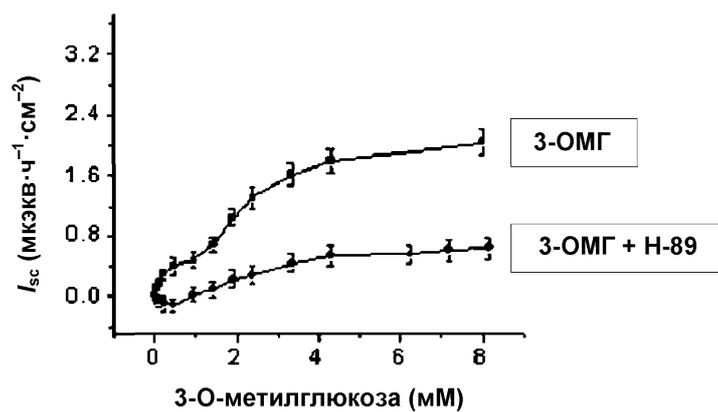
5. Способ по п.4, отличающийся тем, что субъектом является человек в возрасте пяти лет или меньше.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что композицию вводят энтерально.

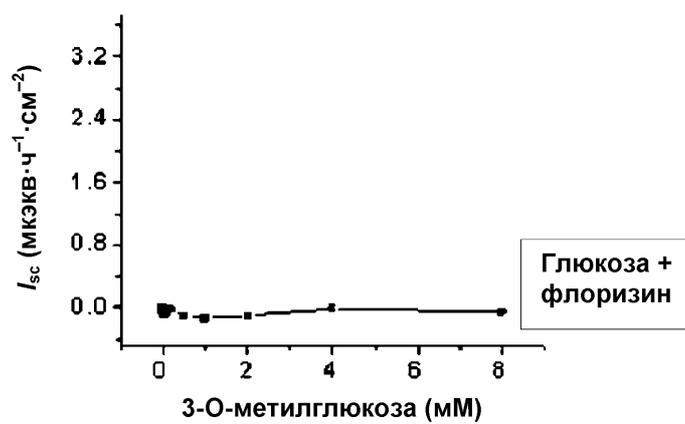
7. Способ по п.5, отличающийся тем, что композицию вводят перорально.



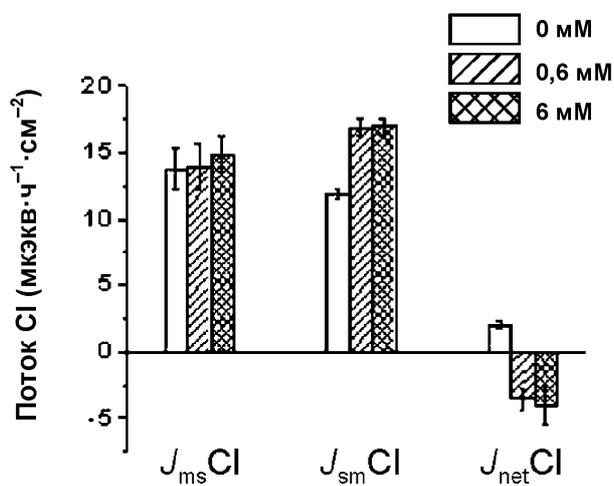
Фиг. 1А



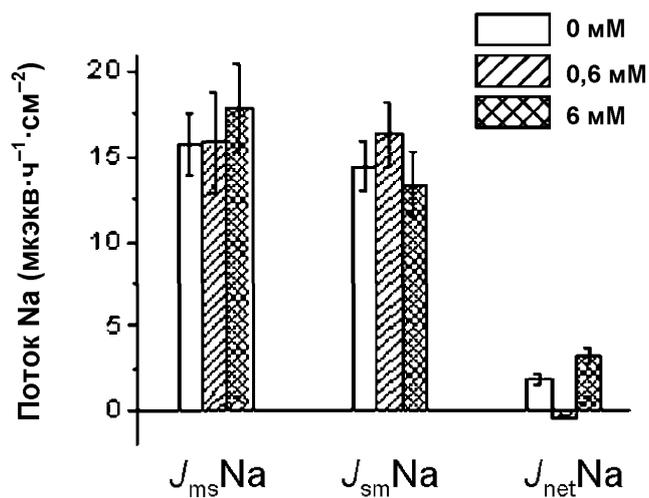
Фиг. 1В



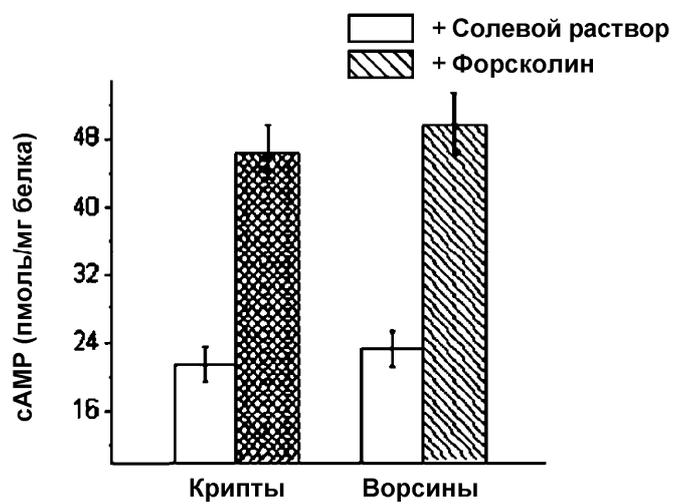
Фиг. 1С



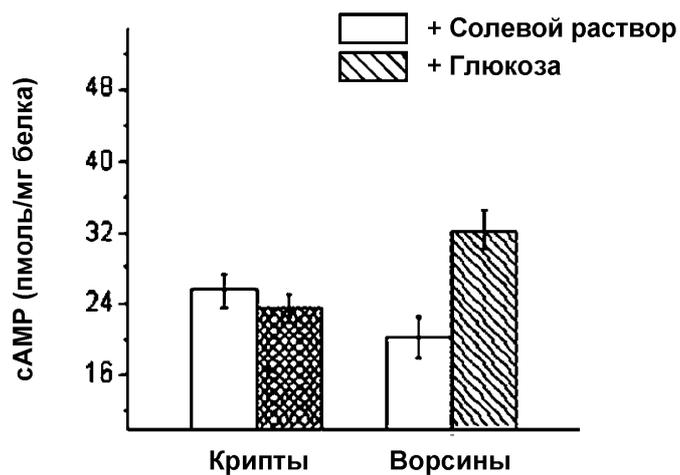
Фиг. 2А



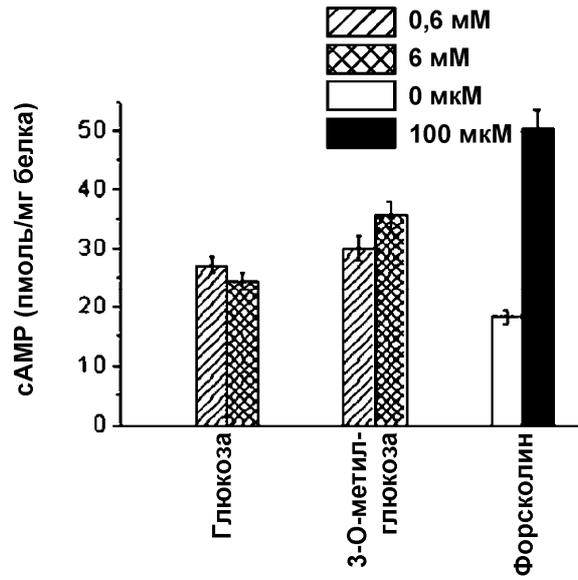
Фиг. 2В



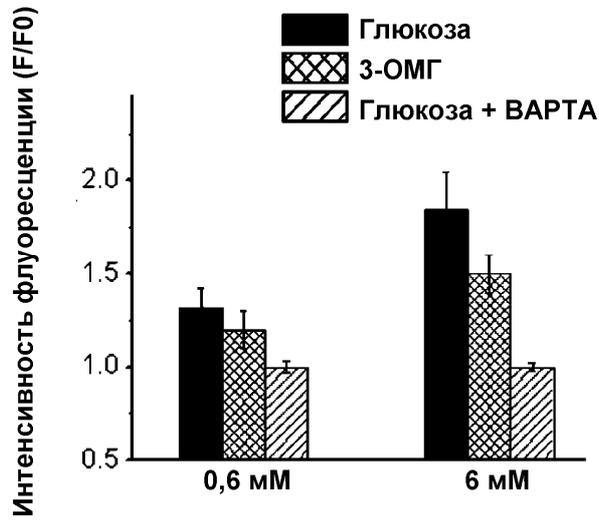
Фиг. 3А



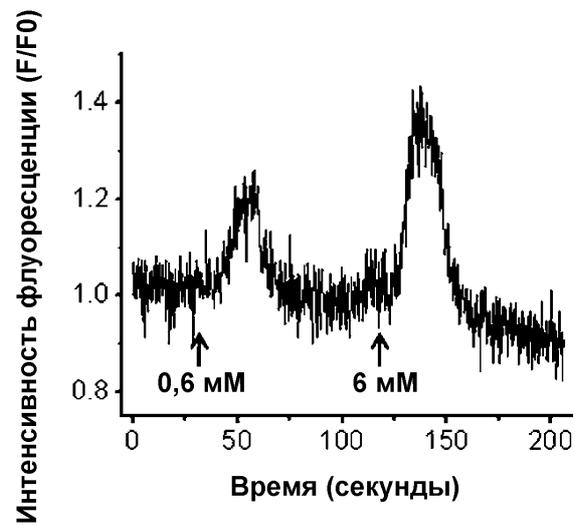
Фиг. 3В



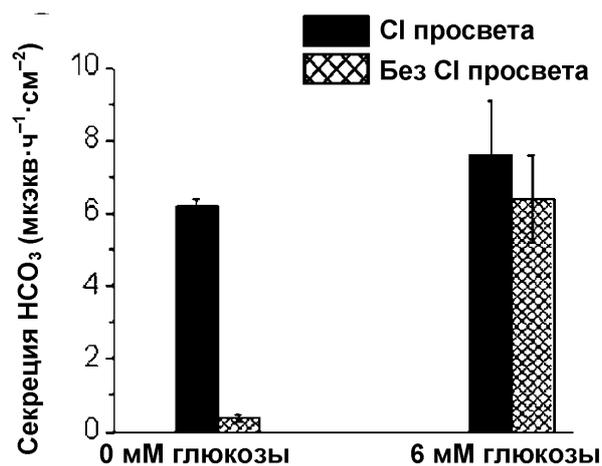
Фиг. 3С



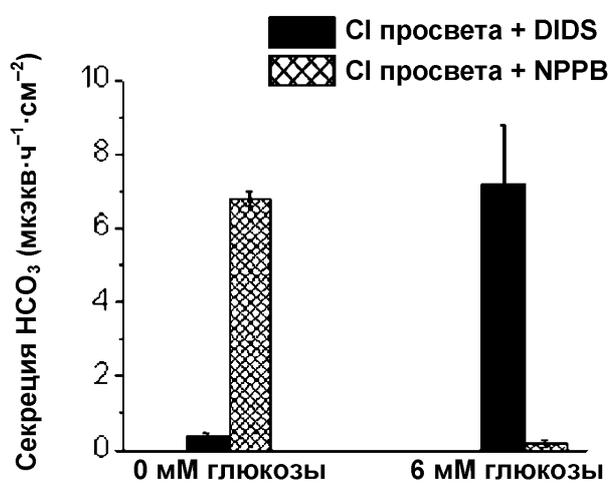
Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 5А



Фиг. 5В

