

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039367**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.19

(21) Номер заявки
201691567

(22) Дата подачи заявки
2015.02.05

(51) Int. Cl. **A61K 38/22** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕГКИХ ТРАВМ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ ГРЕЛИНА

(31) **61/936,143; 14/486,636**

(32) **2014.02.05; 2014.09.15**

(33) **US**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/US2015/014692**

(87) **WO 2015/120203 2015.08.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТЕ РИДЖЕНТС ОФ ТЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(72) Изобретатель:
Бансал Вишал (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) EP-A1-1529533

EP-A1-1994939

WO-A1-2008143835

LOPEZ N.E. ET AL.: "Early ghrelin treatment attenuates disruption of the blood brain barrier and apoptosis after traumatic brain injury through a UCP-2 mechanism", BRAIN RESEARCH, vol. 1489, 1 December 2012 (2012-12-01), p. 140-148, XP055197420, ISSN: 0006-8993, DOI: 10.1016/j.brainres.2012.10.031, abstract, p. 146, left column, paragraph 4

LOPEZ NICOLE E. ET AL.: "Ghrelin decreases motor deficits after traumatic brain injury", JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, vol. 187, № 1, 7 October 2013 (2013-10-07), p. 230-236, XP055197422, ISSN: 0022-4804, DOI: 10.1016/j.jss.2013.09.030, abstract, p. 231, left column, paragraph 4, figures 1, 3, 4

HOSSIENZADEH FEZZEH ET AL.: "Effect of ghrelin on brain edema induced by acute and chronic systemic hypoxia", NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, vol. 534, 4 January 2013 (2013-01-04), p. 47-51, XP028964264, ISSN: 0304-3940, DOI: 10.1016/J.NEULET.2012.11.062, abstract, p. 48, left column, paragraph 5

(57) В настоящем изобретении предлагается применение грелина для лечения легких травм головного мозга, таких как сотрясения мозга. Также предложены способы лечения легкой травмы головного мозга у пациента, где предусмотрено введение терапевтически эффективного количества грелина, достаточного для обеспечения такого уровня грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у пациента. В частности, грелин может вводиться в дозе от 10 нг/кг в день до 10 мг/кг в день.

B1**039367****039367****B1**

Перекрестные ссылки

Настоящая заявка претендует на приоритет от US Provisional Application № 61/936143, поданной 5 февраля 2014 г., и от US Application № 14/486636, поданной 15 сентября 2014 г., каждая из которых включена сюда путем ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

В настоящем изобретении представлены способы лечения легких травм головного мозга и других неврологических расстройств, возникающих при таких травмах у субъекта, введением субъекту эффективного количества композиции, содержащей грелин.

Предшествующий уровень техники

Грелин - пептид из 28 аминокислот, который преимущественно секретируется слизистой оболочкой желудка, является нейроэндокринным гормоном, действующим в качестве эндогенного лиганда для рецептора стимулятора секреции гормона роста. Помимо известных эффектов на регуляцию голода известно, что грелин обладает сильным противовоспалительным действием, а также было показано, что он проявляет защитный эффект на нескольких моделях тяжелого повреждения нервных клеток.

Отек после черепно-мозговой травмы (т.е. TBI) и осложнения, связанные с повышением внутричерепного давления (ICP), составляют примерно 50% смертей у госпитализированных пациентов. При медицинском лечении внутричерепной гипертензии применяется стратегия, сочетающая воздействие седативных средств и таких осмотических средств, как маннит и гипертонические солевые растворы. Учитывая, что грелин обладает сильным противовоспалительным действием, авторы показали, что грелин предотвращает проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), дисфункцию кишечника и системное воспаление после TBI. Механизм такого действия неясен, но он может быть, по крайней мере частично, результатом снижения транскрипции воспалительных цитокинов и конечных каскадных эффектов, включающих уменьшение апоптоза и проницаемости гематоэнцефалического барьера. Обработанные грелином животные с TBI проявляли значительное снижение флуоресценции мозга, коррелирующее со снижением сосудистой проницаемости ГЭБ. Авторы показали, что грелин после TBI предотвращает повышающую регуляцию аквапорина 4 (AQP-4). Предыдущие исследования показали, что снижение экспрессии AQP-4 связано с предотвращением пробоя ГЭБ и отека мозга.

Легкие травмы головного мозга (mild brain injuries, mBI), обычно включающие сотрясение мозга, "туман в голове" и т.п., описывают такие повреждения головного мозга, которые, в свою очередь, могут привести к долговременному повреждению мозга. На сегодняшний день почти не существует надежного лечения таких легких травм головного мозга (mBI). Таким образом, имеется значительная неудовлетворенная потребность в такой терапии для лечения mBI, которая не повлечет нежелательных расходов и задержек и будет эффективной.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагается использовать грелин для лечения легких травм головного мозга (mBI). В целях лечения легких травм головного мозга у пациента предлагается применять грелин в количестве, достаточном для обеспечения такого уровня грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у пациента.

Также настоящим изобретением предусмотрены способы лечения легких травм головного мозга (mBI) у пациента, включающие введение ему терапевтически эффективного количества грелина. Согласно изобретению терапевтически эффективное количество грелина - это то количество, которое достаточно для обеспечения такого уровня грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у пациента. Например, вводимая доза грелина может составлять от 10 нг/кг в день до 10 мг/кг в день. Также предусмотрено введение грелина в составе фармацевтической композиции.

В некоторых воплощениях грелин включает полипептид Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 1). В некоторых случаях грелин может быть модифицирован жирными кислотами, например октановой кислотой. В частности, в последовательности грелина может быть модифицирован серии в положении 2 и/или серии в положении 3.

В некоторых воплощениях легкая травма головного мозга включает сотрясение мозга. Также легкая травма головного мозга может быть связана с потерей когнитивных или двигательных навыков, с метаболическими нарушениями, хронической травматической энцефалопатией (СТЕ), повреждением нервных связей, энцефалопатическими и психологическими изменениями или потерей сознания.

В некоторых воплощениях субъектами являются млекопитающие. В некоторых воплощениях субъектами являются люди. Предпочтительно у пациента нет внутричерепной гипертензии, проницаемости сосудов гематоэнцефалического барьера, некроза тканей мозга, массивного повреждения тканей или клеток мозга в связи с травмой головного мозга, сильного воспаления нейронов или значительного клеточного или вазогенного отека в его голове либо связанных с травмой макроскопических анатомических изменений в его мозге.

В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах не более чем 8 или 24 ч после mBI. При этом грелин может быть введен однократной дозой.

Краткое описание фигур

Воплощения настоящего изобретения представлены на рисунках, которые приводятся только в качестве примера, а не для ограничения.

На фиг. 1 представлен принцип определения окислительной вспышки в воспалительных клетках. Дигидрородоамин 123 (DHR 123) диффундирует через клеточную мембрану. При столкновении с активными формами кислорода (ROS) DHR 123 окисляется и дает зеленую флуоресценцию. Флуоресценцию затем измеряют и выражают в произвольных единицах флуоресценции (AFU), причем большая интенсивность означает большую окислительную вспышку и тем самым большую концентрацию ROS (см. Chen et al., Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol.*, 844: 115-124 (2012), которая включена сюда путем ссылки во всей полноте).

На фиг. 2 представлено подкожное введение грелина, что приводит к снижению окислительной вспышки в воспалительных клетках после mBI. Сдвиг пика вправо отражает усиление окислительной вспышки. При самой mBI наблюдается большая окислительная вспышка, а при лечении mBI грелином наблюдается меньшая окислительная вспышка. При обработке грелином пик сдвигается влево в сторону контроля, что означает уменьшение окислительной вспышки.

На фиг. 3 представлена окислительная вспышка в ипсилатеральном целом мозге после легкой BI. При легкой BI плюс грелин уменьшается окислительная вспышка, что измеряется в произвольных единицах флуоресценции (AFU). Окислительная вспышка усиливается у животных после mBI по сравнению с контролем - ложной обработкой (7963 ± 2900 AFU (легкая BI) в сравнении с $4624 \text{ AFU} \pm 1858$ (контроль); $n=5$ животных в каждой группе). Лечение грелином уменьшает окислительную вспышку по сравнению с mBI (7963 ± 2900 AFU (легкая BI) в сравнении с $3257 \text{ AFU} \pm 1031$ (легкая BI+грелин (2 дозы)), значение $p=0,048$ по t-критерию Стьюдента. AFU равно средней интенсивности флуоресценции.

Некоторые или все фигуры представлены в схематическом виде для упрощения, поэтому они не обязательно представляют действительные относительные размеры или расположение показанных элементов. Фигуры представлены с целью иллюстрации одного или нескольких воплощений с четким пониманием того, что они не будут использоваться для ограничения объема или значения формулы изобретения, которая следует ниже.

Подробное описание изобретения

Следует иметь в виду, что настоящее изобретение не ограничивается описанными конкретными воплощениями, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также нужно иметь в виду, что используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных воплощений изобретения, а не для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения должен ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Подробное описание настоящего раскрытия делится на различные разделы только для удобства читателя, а содержание любого раздела может комбинироваться с таковым в другом разделе. Если не указано иначе, все используемые здесь технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понимаются рядовыми специалистами в той области, к которой относится настоящее изобретение.

Определения.

Следует отметить, что в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя значения множественного числа, если из контекста четко не следует иное. Так, например, ссылка на "соединение" включает в себя множество соединений.

Если не указано иначе, все используемые здесь технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понимаются рядовыми специалистами в той области, к которой относится настоящее изобретение. При этом следующие термины имеют следующие значения.

В настоящем изобретении термин "примерно" при использовании перед числовым обозначением, например, температуры, времени, количества, концентрации и т.д., включая и диапазон, указывает на приближение, которое может отличаться на (+) или (-) 10, 5 или 1%.

В настоящем изобретении термин "введение" может осуществляться в виде одной дозы, непрерывно или с перерывами, либо в виде нескольких дробных доз, которые в совокупности дают однократную дозу. Дозирование может проводиться по ходу всего курса лечения. Методы определения наиболее эффективных средств и дозировки при введении известны специалистам в данной области и зависят от композиции, используемой для терапии, предназначения терапии, клеток мишени, подлежащей лечению, и проходящего лечение пациента. Может проводиться однократное или многократное введение при уровне дозы и по схеме, выбранных лечащим врачом. Подходящие дозовые формы и способы введения средств известны в данной области. Также можно определить и способ введения, а методы определения наиболее эффективного способа введения известны специалистам и зависят от композиции, используемой для лечения, цели лечения, состояния здоровья или стадии болезни у субъекта, подлежащего лечению, и целевых клеток или тканей. Неограничительные примеры способов введения включают пероральное введение, интравагинальное, интраназальное введение, инъекции, местное нанесение, подкожное, легочное введение и с помощью свечей.

В настоящем изобретении термин "сродство" относится к силе связывания между рецепторами и их лигандами, например между антителом и его антигеном.

В настоящем изобретении термин "аминокислотный остаток" относится к аминокислотам, образующимся при химическом расщеплении (гидролизе) полипептида по его пептидным связям. Если не указано иначе, аминокислоты охватывают L-аминокислоты, включая как природные аминокислоты, так и синтетические аминокислоты и т.п., если только у полипептида сохраняются требуемые функциональные свойства. NH₂ означает свободную аминогруппу, присутствующую на N-конце полипептида. COOH означает свободную карбоксильную группу, присутствующую на C-конце полипептида. Стандартные сокращения для аминокислотных остатков в полипептидах имеют следующий вид: A (Ala или аланин); C (Cys или цистеин); D (Asp или аспарагиновая кислота); E (Glu или глутаминовая кислота); F (Phe или фенилаланин); G (Gly или глицин); H (His или гистидин); I (Ile или изолейцин); K (Lys или лизин); L (Leu или лейцин); M (Met или метионин); N (Asn или аспарагин); P (Pro или пролин); Q (Gln или глутамин); R (Arg или аргинин); S (Ser или серин); T (Thr или треонин); V (Val или валин); W (Trp или триптофан); X (Хаа или неизвестно и пр.); Y (Tyr или тирозин); и Z (Glx/Gln/Glu или глутаминовая кислота/глутамин). Все аминокислотные последовательности, представленные здесь формулами, имеют ориентацию слева направо в обычном направлении от N-конца к C-концу. Выражение "аминокислотный остаток" в широком смысле включает в себя природные и модифицированные и не встречающиеся в природе аминокислоты. Тире в начале или в конце аминокислотной последовательности означает пептидную связь с другой последовательностью из одного или нескольких аминокислотных остатков либо ковалентную связь с N-концевой группой типа NH₂ или ацетила или с C-концевой группой типа COOH.

В настоящем изобретении термины "включающий" или "включает" должны означать, что композиции и способы включают перечисленные элементы, но не исключают другие. "Состоящий в основном из" при использовании для определения композиций и способов должно означать исключение других элементов, имеющих существенное значение для комбинации при заявленной цели. Так, композиция, состоящая в основном из приведенных здесь элементов, не должна исключать другие материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики настоящего изобретения. "Состоящий из" должно означать исключение более чем следовых примесей других ингредиентов и существенных стадий способа. Воплощения, определенные каждым из этих переходных терминов, входят в рамки настоящего изобретения.

В настоящем изобретении термин "грелин" означает полипептид, который может иметь последовательность из 28 аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 1, и может включать в себя октаноильное ацилирование, как описано выше. Грелин человека может представлять собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в GenBank® по номеру доступа NP-057446 или в Swiss-Prot по идентификатору GHRLHUMAN. Белок-предшественник грелина человека содержит 117 аминокислот. Этот пребелок может подвергаться следующему посттрансляционному процессингу. Удаляется сигнальный пептид (аминокислоты 1-23), а остальные 94 аминокислоты расщепляются протеазой, образуя зрелый грелин из 28 аминокислот (аминокислоты 24-51) или зрелый грелин из 27 аминокислот (аминокислоты 24-50) и зрелый обестатин из 23 аминокислот (аминокислоты 76-98). В другом воплощении грелин включает полипептид, содержащий по меньшей мере одну модификацию природной формы аминокислотной последовательности Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Ser-Gln-Lys-Pro-Gln-Asn-Lys-Val-Lys-Ser-Ser-Arg-Ile (например, SEQ ID NO: 4). В другом воплощении грелин включает полипептид, содержащий по меньшей мере одну модификацию природной формы аминокислотной последовательности Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 5). В другом воплощении грелин включает полипептид, содержащий по меньшей мере одну модификацию природной формы аминокислотной последовательности Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Ala-Ala-Lys-Leu-Lys-Pro-Arg (SEQ ID NO: 6). В другом воплощении грелин включает полипептид, содержащий по меньшей мере одну модификацию природной формы аминокислотной последовательности Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 7). В другом воплощении грелин включает полипептид, содержащий по меньшей мере одну модификацию природной формы аминокислотной последовательности Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Thr-Tyr-Lys-Asn-Ile-Gln-Gln-Gln-Lys-Asp-Thr-Arg-Lys-Pro-Thr-Ala-Arg-Leu-His (SEQ ID NO: 8). Еще в одном воплощении грелин включает полипептид, содержащий по меньшей мере одну модификацию природной формы аминокислотной последовательности Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Leu-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 9). Модификации грелина могут включать добавление или удаление аминокислот, если только грелин, модифицированный таким образом, сохраняет свое терапевтическое значение (например, путем добавления или удаления любой из 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот из молекулы).

Некоторые воплощения касаются и в них могут использоваться такие молекулы грелина, у которых содержание углерода-14 (¹⁴C) меньше, чем у вырабатываемых эндогенно молекул грелина либо у грелина, который имеет примерно такое же содержание ¹⁴C, как и уровень ¹⁴C в атмосфере. Например, молекулы грелина могут содержать по меньшей мере один атом углерода или углеродсодержащую группу-

ровку, происходящую из ископаемых реагентов, у которых содержание ^{14}C меньше, чем у эндогенных молекул, или меньше атмосферного уровня. В некоторых воплощениях у молекул грелина все, практически все или, по крайней мере, некоторые атомы углерода могут иметь содержание ^{14}C меньше эндогенного уровня или меньше атмосферного уровня. Например, одна или несколько аминокислот из последовательности могут содержать углерод, у которого содержание ^{14}C меньше, чем у эндогенных аминокислот, или меньше атмосферного уровня. В других случаях вся последовательность может содержать углерод, у которого содержание ^{14}C меньше эндогенного уровня или меньше атмосферного уровня. А еще в других воплощениях молекула грелина может быть модифицирована, например, содержать октаноил или другую аналогичную группу, и эта октаноильная группа может иметь содержание ^{14}C меньше уровня ^{14}C у эндогенного грелина или меньше атмосферного уровня. Дополнительные примеры и воплощения описаны ниже и в других местах настоящего описания.

В некоторых воплощениях молекулы грелина могут иметь содержание ^{14}C менее 0,9, 0,95, 1,05, 1,10, 1,15, 1,2 ppt или меньше содержания ^{14}C в атмосфере. В некоторых воплощениях молекулы грелина могут иметь такое содержание ^{14}C , которое примерно на 1-50% (или любое промежуточное значение или диапазон) меньше, чем содержание ^{14}C у эндогенного грелина или содержание ^{14}C в атмосфере. Например, молекулы в соответствии с некоторыми воплощениями могут иметь примерно на 5-11% меньшее содержание ^{14}C . Грелин с содержанием ^{14}C менее 0,9, 0,95, 1,0, 1,05, 1,10, 1,15, 1,2 ppt или меньше содержания ^{14}C в атмосфере либо еще меньшим содержанием ^{14}C , как изложено здесь, может быть получен методами пептидного или химического синтеза, используя реагенты с атомами углерода, свободными от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере. С другой стороны, грелин с содержанием ^{14}C менее 0,9, 0,95, 1,0, 1,05, 1,10, 1,15, 1,2 ppt или меньше содержания ^{14}C в атмосфере может быть получен *in vitro* ферментативными методами, используя исходные материалы, содержащие углерод, свободный от ^{14}C , практически свободный от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере. Такие ферментативные методы могут включать синтез белка в бесклеточной системе или в сопряженной системе транскрипции-трансляции *in vitro* на основе клеточных экстрактов, полученных из бактерий, дрожжей, зародышей пшеницы, клеток насекомых и/или млекопитающих с использованием аминоацил-tРНК, несущих аминокислот, содержащих углерод, свободный от ^{14}C , практически свободный от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере. В альтернативном методе грелин с содержанием ^{14}C менее 0,9, 0,95, 1,0, 1,05, 1,10, 1,15, 1,2 ppt или меньше содержания ^{14}C в атмосфере может быть получен рекомбинантными методами в бактериальных, дрожжевых клетках, клетках насекомых и/или клетках млекопитающих после введения экспрессирующей системы с кДНК, содержащей кодирующие грелин последовательности, и культивирования клеток в среде, содержащей углерод, свободный от ^{14}C , практически свободный от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере. С другой стороны, среда может включать глюкозу, галактозу, сахара, глицерин, пируват, ацетат, метаболиты, жирные кислоты и/или аминокислоты, содержащие углерод, свободный от ^{14}C , практически свободный от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере. Методы изменения содержания стабильных изотопов в белках можно найти в G.W. Becker (2008), *Stable isotopic labeling of proteins for quantitative proteomic applications. Briefings in Functional Genomics Proteins* 7(5): 371-382, которая включена сюда путем ссылки во всей полноте. Грелин можно экспрессировать совместно с грелин-О-ацил-трансферазой (GOAT) или подвергнуть её воздействию, чтобы модифицировать жирными кислотами первичную последовательность грелина по серину в положении аминокислоты 3 с тем, чтобы получить биологически активный грелин, способный связываться и активировать рецептор грелина (GHSR-1a или рецептор стимулятора секреции гормона роста типа 1a). Модификация может представлять собой модификацию грелина октановой кислотой с тем, чтобы получить октаноилгрелин, содержащий углерод, свободный от ^{14}C , практически свободный от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере.

В некоторых воплощениях грелин с содержанием ^{14}C менее 0,9, 0,95, 1,0, 1,05, 1,10, 1,15, 1,2 ppt или меньше содержания ^{14}C в атмосфере (или еще меньше, как изложено здесь) может быть получен после модификации первичной последовательности грелина (SEQ ID NO: 1) жирной кислотой, содержащей углерод, свободный от ^{14}C , практически свободный от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере. Такие жирные кислоты можно синтезировать химическим путем с использованием углерода, свободного от ^{14}C , практически свободного от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере, либо получить в культуре клеток, культивируемой в среде, в которой источник углерода, используемый для синтеза жирной кислоты или жирных кислот, свободен от ^{14}C , практически свободен от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере. В некоторых воплощениях жирную кислоту или жирные кислоты конъюгируют с коэнзимом А (CoA), а жирную кислоту в образовавшихся тиоэфирах типа жирная кислота-CoA переносят на серии в положении аминокислоты 3 грелина при помощи грелин-О-ацил-трансферазы (GOAT), получая модифицированный жирной кислотой грелин, содержащий углерод, свободный от ^{14}C , практически свободный от ^{14}C , менее 1 ppt ^{14}C , или с дефицитом ^{14}C относительно содержания ^{14}C в атмосфере. В некоторых воплощениях жирные кислоты представлены неразветвленными жирными кисло-

тами, содержащими 2C, 3C, 4C, 5C, 6C, 1C, 8C, 9C, 10C, 11C, 12C, 13C, 14C, 15C, 16C, 17C, 18C, 19C или 20C и имеющими общую химическую формулу $(\text{CH})_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где "n" означает количество атомов углерода в жирной кислоте. В предпочтительном воплощении жирная кислота представлена C₈-октановой кислотой или C₁₄-тетрадекановой кислотой. В более предпочтительном воплощении жирная кислота представлена октановой кислотой, а модифицированный жирной кислотой грелин представлен грелином, модифицированным октаноилом по серину в положении аминокислоты 3.

В некоторых воплощениях жирная кислота или жирные кислоты могут быть конъюгированы с грелином по серину в положении аминокислоты 3. В некоторых воплощениях жирная кислота или жирные кислоты могут быть конъюгированы с грелином в другом положении, чем серии в положении аминокислоты 3. В некоторых воплощениях жирная кислота или жирные кислоты могут быть конъюгированы с грелином по серину в положении аминокислоты 2. В некоторых воплощениях жирная кислота или жирные кислоты могут быть конъюгированы с грелином по серину в положении аминокислоты 2 и по серину в положении аминокислоты 3. В некоторых воплощениях жирная кислота или жирные кислоты могут быть конъюгированы с грелином по одной или нескольким аминокислотам.

В некоторых воплощениях жирная кислота или жирные кислоты могут быть конъюгированы с незрелым грелином (типа препрогрелина или прогрелина), а затем модифицированный жирной кислотой или жирными кислотами грелин подвергнут процессингу до зрелого грелина, который может активировать рецептор грелина (GHSR-1a). Процессинг незрелого грелина может проводиться *in vitro* или *in vivo* и при помощи протеолитических ферментов. В некоторых воплощениях жирная кислота или жирные кислоты могут быть конъюгированы со зрелым грелином, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

В некоторых воплощениях грелин с одной или несколькими модификациями представлен выделенным грелином с одной или несколькими модификациями. В предпочтительном воплощении грелин с одной или несколькими модификациями представлен выделенным грелином с одной или несколькими жирнокислотными модификациями. В более предпочтительном воплощении грелин с одной или несколькими модификациями представлен выделенным грелином, ацилированным октановой кислотой по серину 3, типа выделенного октаноилгрелина.

Исходный материал с дефицитом ¹⁴C, используемый при синтезе грелина с углеродом, свободным от ¹⁴C, практически свободным от ¹⁴C, менее 1 ppt ¹⁴C, или с дефицитом ¹⁴C относительно содержания ¹⁴C в атмосфере, может быть получен из источников углерода, не участвующих в атмосферном цикле углерода, или путем фракционирования природных изотопов углерода с получением атомов углерода, свободных от ¹⁴C, практически свободных от ¹⁴C, менее 1 ppt ¹⁴C, или с дефицитом ¹⁴C относительно содержания ¹⁴C в атмосфере. Такие атомы углерода будут обогащены углеродом-12 (¹²C) и/или углеродом-13 (¹³C) и обеднены ¹⁴C. Методы фракционирования, обогащения или обеднения изотопов известны в данной области и могут основываться на диффузии, центрифугировании, электромагнетизме, лазерном возбуждении, кинетическом изотопном эффекте, химических методах, силе тяжести, испарении и криогенной дистилляции, среди многих других методов фракционирования изотопов.

Грелин, используемый в различных воплощениях, описанных здесь, может представлять собой любой подходящий грелин, в том числе, к примеру, грелин, полученный рекомбинантными методами, и химически синтезированный грелин. Независимо от источника грелин можно использовать и вводить так, как описано здесь. Грелин может представлять собой выделенный грелин, к примеру грелин, полученный после фракционирования или отделения грелина от других компонентов, присутствующих в образце, в котором грелин вырабатывается или синтезируется, а также подвергается модификации. Выделенный грелин не обязательно является чистым грелином. Хотя желательно иметь чистый грелин или практически чистый грелин, однако выделенный грелин можно использовать без достижения абсолютной чистоты, лишь бы грелин был фракционирован или отделен от тех компонентов, присутствие которых в препарате выделенного грелина нежелательно. Следует отметить, что после фракционирования грелина его можно ввести в раствор или использовать в виде смеси или в смеси в присутствии других компонентов, таких как фармацевтические носители, смазывающие вещества, консерванты, буферы, соли, сахара, красители, фармацевтически приемлемые наполнители и их комбинации.

В настоящем изобретении термин "рецептор грелина" обозначает такие природные молекулы, с которыми грелин связывается и индуцирует биологическую активность. Как известно, грелин связывается с рецептором стимулятора секреции гормона роста 1a (т.е. GHSR), однако настоящее изобретение не ограничивается одним конкретным типом рецептора.

В настоящем изобретении термин "индивид" или "субъект" обозначает животное или человека, подверженного заболеванию, в частности mBI или сотрясению мозга. В некоторых воплощениях индивид представлен млекопитающим, включая человека и других млекопитающих, таких как собаки, кошки, свиньи, коровы, овцы, козы, лошади, крысы и мыши.

В настоящем изобретении термин "легкая травма головного мозга" (mBI), что иногда именуется как "легкая черепно-мозговая травма" (mTBI), относится к явлениям, которые обычно вызваны не заболеванием, а травмой, приводящей к повреждению головного мозга. mBI может быть вызвана, к примеру, воздействием удара, при котором голова ударяется или получает удар чем-то, либо импульсным воздейст-

вием, при котором голова движется, сама не подвергаясь тупой травме (например, когда натыкаешься грудью на что-то и голова вырывается вперед; при быстром ускорении или замедлении головы, при этом ускорение или замедление головного мозга у субъекта приводит к изменению качественного или количественного клинического параметра, связанного с функциональным благополучием субъекта; либо при дифференциальном ускорении или замедлении мозга субъекта относительно его черепа, при этом дифференциальное ускорение или замедление приводит к изменению качественного или количественного клинического параметра, связанного с функциональным благополучием субъекта). Обычно mBI происходят, к примеру, при связанных со спортом травмах, автомобильных авариях, при случайном падении или нападении. Хотя подавляющее большинство таких травм проходят сами путем естественного восстановления, однако вызванные такими травмами или повторными травмами повреждения могут приводить к долговременным нарушениям когнитивных и/или двигательных навыков и функций.

Легкая ВІ отличается и имеет особую патологию по сравнению с такими острыми травматическими заболеваниями мозга, как инсульт (ишемический или геморрагический), AVM's, опухоли головного мозга и т.п.

Более того, mBI отличается от тяжелой TBI. Легкая черепно-мозговая травма и тяжелая черепно-мозговая травма сильно отличаются. Легкая ВІ и тяжелая TBI имеют различные характеристики и симптомы, различные показатели смертности, различные методики лечения и т.д. Тяжелые TBI являются такими травмами, при которых у людей в пределах нескольких часов или дней после травмы возникает неприемлемый уровень смертности и долговременная потеря трудоспособности. По данным Centers for Disease Control, такие травмы составляют треть (30%) от всех связанных с травмами смертей в США (см. National Vital Statistics System (NVSS), 2006-2010). Тяжелые TBI часто происходят, к примеру, при автомобильных авариях и боевых огнестрельных и бомбовых ранениях в голову. При тяжелых TBI обычно бывает прямое и открытое кровоизлияние в мозг, разрушение клеток мозга, тяжелый отек мозга и тяжелый клеточный апоптоз, т.е. все характерные анатомические изменения или анатомические повреждения мозга у раненых пациентов, которые выявляются неинвазивными анатомическими методами визуализации. Из-за серьезности таких симптомов и риска неминуемой смерти и инвалидности первостепенное значение имеет хирургическое вмешательство и интенсивная терапия. При тяжелых TBI происходят неблагоприятные анатомические изменения в головном мозге пациента (заметные на уровне макроскопической анатомии), что приводит к немедленной и перманентной потере функции мозга, если не к смерти.

С другой стороны, легкая травма головного мозга (mBI) вызывает изменения функции мозга на метаболическом/молекулярном уровне в пораженных нейронах. При этом она обычно не вызывает смертности или постоянной нетрудоспособности в сроки, представленные выше, и пациенты зачастую возвращаются к нормальной повседневной активности и функциональности в пределах нескольких часов или дней после mBI.

Реакция организма на тяжелые TBI состоит из большого числа различных реакций, в том числе вызванных гипоксией, кровопотерей и значительной гибелью нейронов, если привести лишь некоторые из них. Реакция организма на mBI существенно отличается, так как кровоизлияния и потеря крови, потеря тканей, гипоксия, значительная гибель нейронов и т.д. не входят в число проявлений этого состояния.

Следовательно, терапевтические способы лечения каждой травмы значительно отличаются. Такие терапевтические методы, которые применяются при тяжелых TBI, к примеру хирургия, сильные седативные средства, терапия маннитолом и оперативная декомпрессия, были бы противопоказаны при лечении mBI, к примеру, сотрясения мозга, которое является разновидностью легкой травмы головного мозга. И наоборот, справедливо и обратное, как то: отдых и психическая релаксация почти без вмешательства при выздоровлении от mBI.

В настоящем изобретении термин "полипептид" или "пептид" служит для обозначения как одного "полипептида", так и нескольких "полипептидов" и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любым цепочкам из двух или нескольких аминокислот без указания конкретной длины продукта. Так, в определение "полипептида" входят пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белки", "цепочки аминокислот" или любые другие термины, используемые для обозначения цепочки или цепочек из двух или нескольких аминокислот, а термин "полипептид" может применяться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Термин "полипептид" также служит для обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептидов, в том числе, без ограничения, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, ацилирования, ацилирования жирными кислотами, модифицирования жирными кислотами, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления или модифицирования не встречающимися в природе аминокислотами. Модификация может представлять собой модификацию жирной кислоты или модификацию триглицеридом. Жирнокислотные модификации могут быть представлены короткоцепочечными или среднецепочечными жирными кислотами. Короткоцепочечная жирная кислота может быть представлена жирной кислотой с двумя атомами углерода или уксусной кислотой. Среднецепочечная жирная кислота может быть представлена жирной кислотой с 14 атомами углерода или тетрадека-

новой кислотой. Жирнокислотная модификация может представлять собой ацилирование SEQ ID NO: 1 по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3. Модификация может катализироваться грелин-О-ацилтрансферазой (GOAT) из тиоэфира жирной кислоты и грелина в качестве субстратов. В одном воплощении грелин с посттрансляционной модификацией может связываться и/или распознаваться рецептором стимулятора секреции гормона роста типа 1a (GHSR-1a) или рецептором грелина. В одном воплощении грелин с посттрансляционной модификацией может представлять собой грелин, ацилированный жирной кислотой по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3, который связывается и/или распознается GHSR-1a или рецептором грелина. Полипептид может происходить из природного биологического источника или может быть получен по рекомбинантной технологии, но не обязательно транслирован из заданной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза. Термин "полипептид" или "пептид" также относится к соединениям, содержащим множество аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. При этом аминокислоты (которые также называют аминокислотными остатками) включают встречающиеся в природе аминокислоты, представленные формулой $\text{NH}_2\text{-CH(R')-COOH}$, где R' означает природную замещающую группу, а также их оптические D,L-изомеры и т.п. Также существуют пептиды, у которых определенные природные аминокислоты заменены модифицированными аминокислотами. Модифицированные аминокислоты включают в себя аминокислоты по вышеприведенной формуле, у которых замещающая группа R' дополнительно модифицирована, их оптические D,L-изомеры и не встречающиеся в природе аминокислоты, у которых, к примеру, с замещающей группой R' в вышеприведенной формуле связаны различные замещающие группы через или не через сложноэфирные, простые эфирные, сложные тиоэфирные, простые тиоэфирные, амидные, карбамидные или тиокарбамидные связи. Модифицированные аминокислоты также включают не встречающиеся в природе аминокислоты, у которых аминогруппы замещены низшими алкильными группами.

В настоящем изобретении термин "стимулятор секреции (secretagogue)" означает вещество, стимулирующее высвобождение гормона роста, типа грелина. В некоторых воплощениях грелин связывается с рецептором стимулятора секреции гормона роста (GHSR) типа 1a (GHSR-1a). Описанные здесь соединения грелина действуют на рецептор стимулятора секреции гормона роста (GHS), например рецептор GHSR-1a. Эти соединения могут связываться с GHSR-1a и стимулировать активность рецептора. В некоторых воплощениях эти соединения могут связываться и с другими рецепторами и необязательно стимулировать их активность. В некоторых воплощениях грелин повышает экспрессию разобщающего белка-2 (UCP-2). В некоторых воплощениях грелин повышает экспрессию UCP-2 в митохондриях. В некоторых воплощениях грелин предотвращает метаболические последствия mBI и любые связанные с этим хронические заболевания.

Лечение легких травм головного мозга (mBI) и других неврологических заболеваний.

Настоящее изобретение направлено на идентификацию нового применения для грелина при mBI. Легкие BI, в том числе сотрясения мозга, имеют существенно другую патологию, чем другие травмы, связанные с заболеваниями головного мозга, и тяжелые черепно-мозговые травмы (тяжелые TBI) типа тех, что вызывают ишемию. Легкие BI не вызывают массивных тканевых и клеточных повреждений, как это наблюдается при тяжелых травматических заболеваниях головного мозга. Скорее mBI вызывает тонкие метаболические изменения в головном мозге, а именно окислительный стресс и избыток активных форм кислорода (ROS), что в свою очередь может повредить нервные связи и привести к повреждению нейронов и энцефалопатическим и психологическим изменениям при рецидивах травмы.

В настоящем изобретении при лечении mBI применяется грелин. В отличие от тяжелых черепно-мозговых травм при mBI не проявляются острые гистологические изменения нейронов, тяжелое воспаление нейронов или значительный клеточный или вазогенный отек (т.е. пробой гематоэнцефалического барьера). Скорее mBI представляет собой клиническое состояние, которое обычно связано с рядом клинических симптомов. Иногда оно связано с потерей сознания, но не обязательно проявляются существенные рентгенологические изменения. Часто приводятся такие симптомы, без ограничения, как головная боль, "давление в голове", боль в затылке, тошнота или рвота, головокружение, помутнение зрения, проблемы с равновесием, чувствительность к свету, чувствительность к шуму, ощущение заторможенности, "как в тумане", плохое самочувствие, трудно сосредоточиться, трудности с запоминанием, усталость или мало энергии, спутанность сознания, сонливость, проблемы с засыпанием, повышенная эмоциональность, раздражительность, грусть и нервозность или тревожность. В некоторых неограниченных воплощениях приведенные здесь способы могут включать в себя или касаться лечения или уменьшения одного или нескольких из перечисленных выше симптомов. Самое главное то, что повторные сотрясения, как это наблюдается в армии и в таких видах спорта, как футбол и хоккей, вызывают ряд метаболических нарушений и образование ROS. Эти серии событий приводят к хронической травматической энцефалопатии (CTE), что засвидетельствовано при вскрытии нескольких умерших профессиональных футболистов.

В некоторых воплощениях грелин обладает способностью снижать уровень ROS и последующее повреждение нейронов при mBI. Это особенно важно при хронических сотрясениях мозга, когда предот-

вращение воспалительного, возбуждающего уровня ROS может иметь существенное клиническое значение. При лечении грелином снижается уровень ROS и тем самым предотвращаются метаболические последствия сотрясений и связанные с этим хронические заболевания.

В некоторых воплощениях лечебное действие грелина при mBI сравнивается с его лечебным действием при тяжелых TBI. Этиология, томография и оценка mBI не дают внятного объяснения наблюдаемых когнитивных дефектов типа хронических головных болей, потери памяти и нарушения сна. Только самые передовые и обременительные технологии могут выявить тонкие изменения, связанные с mBI. Поэтому в отличие от тяжелых TBI, при которых полная масса поражения устанавливается по анатомическим и клеточным изменениям, mBI не обнаруживается рентгенологически. Тем не менее происходят определенные метаболические нарушения. В настоящем изобретении показано, что грелин может быть сильным нейрозащитным средством при mBI.

Не придерживаясь какой-либо теории, в настоящем изобретении авторы также описали биологическую функцию грелина при mBI. После mBI возрастают метаболические потребности клетки, включая потребность в глюкозе. При легких травмах в клетках происходят значительные метаболические нарушения, вызывающие образование активных форм кислорода в нейронах. Этот метаболический стресс и повышение метаболических потребностей является фундаментальной концепцией, лежащей в основе лечения острого сотрясения. Снижение ROS и улучшение поглощения глюкозы в мозге или нервных клетках и аксонах может восстановить внутриклеточные функции и они останутся жизнеспособными. Это предотвращает или уменьшает вызванную сотрясением мозга дисфункцию и вообще улучшает нейрокогнитивные показатели, а также предотвращает потерю памяти и хронические головные боли при mBI и возникновение хронической травматической энцефалопатии.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения легких травм головного мозга (легких BI или mBI) у субъектов, который включает введение субъекту (например, субъекту с mBI) эффективного количества соединения, включающего грелин, тем самым происходит лечение mBI. Грелин может вводиться с целью лечения mBI в терапевтически эффективном количестве для mBI. В некоторых воплощениях способы также могут включать выбор или идентификацию субъектов, пострадавших, с риском получения, предрасположенных к травмам и/или собирающихся заниматься активностью с высоким риском получения mBI перед введением грелина.

В некоторых воплощениях легкие травмы головного мозга включают сотрясение мозга. В некоторых воплощениях субъекты, подвергающиеся способу лечения, являются млекопитающими. В некоторых воплощениях субъектами являются люди, обезьяны, коровы, козы, овцы, мыши, крысы, кошки, собаки, лошади, хомяки, свиньи, рыбы и куры. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах 72 ч после mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах 24 ч после mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится через 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48 или 72 ч после mBI.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ лечения легких травм головного мозга (mBI) у субъектов, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина, тем самым происходит лечение mBI, причем грелин является единственным активным средством. В некоторых воплощениях грелин имеет последовательность Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях грелин модифицирован одной или несколькими жирными кислотами. В некоторых воплощениях жирная кислота представлена октановой кислотой. В некоторых воплощениях грелин модифицирован по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3 в SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях грелин модифицирован октановой кислотой по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3. В некоторых воплощениях модификация грелина представляет собой ацилирование грелина октановой кислотой по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3. В некоторых воплощениях модифицированный таким образом грелин представлен октаоилгрелином с ацилированием октановой кислотой по серину в положении аминокислоты 3. В некоторых воплощениях mBI включает в себя сотрясение мозга. В некоторых воплощениях субъектами являются млекопитающие. В некоторых воплощениях грелин вводится, по крайней мере при первом введении (но не ограничиваясь этим), в пределах или менее чем через 24 ч, или менее чем через 48 ч, или менее чем через 72 ч после mBI или в любом промежуточном значении или промежуточном диапазоне между временем сразу после травмы и этими промежутками времени. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах не более 8 ч после mBI. В некоторых воплощениях грелин может вводиться примерно через 6 ч после mBI. В некоторых воплощениях грелин может вводиться в виде однократной дозы или нескольких доз, к примеру 2, 3 доз. Множественные дозы могут включать по меньшей мере одну первую дозу, вводимую в указанный здесь промежуток времени, и одну или несколько последующих доз после этого промежутка времени. В некоторых воплощениях грелин вводится в количестве, которое приводит к такому уровню грелина в крови, который по меньшей мере в 1, по меньшей мере в 1,5, по меньшей мере в 2 раза (или больше) превышает уровень эндогенного грелина в крови у субъекта. В некоторых воплощениях грелин вводится в виде однократной дозы. В некоторых воплощениях грелин вводится в дозе от 10 нг/кг в день до 10 мг/кг в день или на 1 дозу. В некоторых воплощениях дозировка грелина может составлять от 1 мкг/кг до 15 мкг/кг, к примеру 10 мкг/кг. В неко-

торых воплощениях грелин вводится в дозе 2 мкг/кг на 1 дозу или в некоторых случаях в день. В некоторых воплощениях грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt).

Настоящим изобретением также предусмотрен способ лечения легких травм головного мозга (mBI) у субъектов, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина в количестве, которое обеспечивает такой уровень грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у субъекта, тем самым происходит лечение mBI. Грелин может быть единственным активным средством. В некоторых воплощениях грелин имеет последовательность Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях грелин модифицирован одной или несколькими жирными кислотами. В некоторых воплощениях жирная кислота представлена октановой кислотой. В некоторых воплощениях грелин модифицирован по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3 в SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях грелин модифицирован октановой кислотой по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3. В некоторых воплощениях модификация грелина представляет собой ацилирование грелина октановой кислотой по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3. В некоторых воплощениях модифицированный таким образом грелин представлен октанол-илгрелином с ацилированием октановой кислотой по серину в положении аминокислоты 3. В некоторых воплощениях mBI включает в себя сотрясение мозга. В некоторых воплощениях грелин вводится в виде однократной дозы. В некоторых воплощениях вводимое количество обеспечивает такой уровень в крови, который по меньшей мере в 1,0-100 раз превышает эндогенный уровень у субъекта. В некоторых воплощениях вводимое количество приводит к уровню в крови по меньшей мере в 55 пкг/мл. В некоторых воплощениях грелин вводится в дозе от 10 нг/кг в день до 10 мг/кг на 1 дозу или в день. В некоторых воплощениях дозировка грелина может составлять от 1 мкг/кг до 15 мкг/кг, к примеру 10 мкг/кг. В некоторых воплощениях грелин вводится в дозе 2 мкг/кг на 1 дозу или в некоторых случаях в день. В некоторых воплощениях грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt). В некоторых воплощениях грелин вводится в количестве, которое обеспечивает такой уровень грелина в крови, который по меньшей мере в 1,0, 2,0 раза или больше превышает уровень эндогенного грелина в крови у субъекта, тем самым происходит лечение mBI.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения легких травм головного мозга (mBI) у субъектов, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, состоящей в основном из грелина. В некоторых воплощениях грелин является единственным активным средством. В некоторых воплощениях грелин вводится субъекту в количестве, которое обеспечивает такой уровень грелина в крови, который по меньшей мере в 1,0, 1,5, 2,0 или больше раз превышает уровень эндогенного грелина в крови у субъекта, тем самым происходит лечение mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится субъекту в количестве, которое обеспечивает такой уровень грелина в крови, который по меньшей мере в 2,0 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у субъекта, тем самым происходит лечение mBI.

В некоторых воплощениях у субъекта нет внутричерепной гипертензии. В некоторых воплощениях у субъекта нет проницаемости сосудов гематоэнцефалического барьера. В некоторых воплощениях у субъекта нет некроза тканей мозга. В некоторых воплощениях у субъекта нет массивного повреждения тканей или клеток мозга в связи с травмой головного мозга. В некоторых воплощениях у субъекта нет сильного воспаления нейронов или значительного клеточного или вазогенного отека в его голове. В некоторых воплощениях у субъекта нет связанных с травмой макроскопических анатомических изменений в его мозге.

В некоторых воплощениях у субъекта нет внутричерепной гипертензии, проницаемости сосудов гематоэнцефалического барьера или некроза тканей мозга. В некоторых воплощениях у субъекта нет массивного повреждения тканей или клеток мозга в связи с травмой головного мозга, сильного воспаления нейронов или значительного клеточного или вазогенного отека в его голове или связанных с травмой макроскопических анатомических изменений в его мозге.

В некоторых воплощениях у субъекта нет внутричерепной гипертензии, проницаемости сосудов гематоэнцефалического барьера, некроза тканей мозга, массивного повреждения тканей или клеток мозга в связи с травмой головного мозга, сильного воспаления нейронов или значительного клеточного или вазогенного отека в его голове или связанных с травмой макроскопических анатомических изменений в его мозге. В некоторых воплощениях у субъекта нет внутричерепной гипертензии, проницаемости сосудов гематоэнцефалического барьера, некроза тканей мозга, массивного повреждения тканей или клеток мозга в связи с травмой головного мозга, сильного воспаления нейронов или значительного клеточного или вазогенного отека в его голове и связанных с травмой макроскопических анатомических изменений в его мозге либо их комбинаций.

В некоторых воплощениях mBI связана с потерей когнитивных или двигательных навыков. В некоторых воплощениях mBI связана с метаболическими нарушениями. В некоторых воплощениях mBI связана с хронической травматической энцефалопатией (СТЕ). В некоторых воплощениях mBI связана с повреждением нервных связей. В некоторых воплощениях mBI связана с энцефалопатическими и/или

психологическими изменениями. В некоторых воплощениях mBI связана с потерей сознания.

В некоторых воплощениях mBI связана с потерей когнитивных или двигательных навыков и с метаболическими нарушениями. В некоторых воплощениях mBI связана с хронической травматической энцефалопатией (СТЕ) и повреждением нервных связей. В некоторых воплощениях mBI связана с психологическими изменениями и потерей сознания. В некоторых воплощениях mBI связана с потерей когнитивных или двигательных навыков, метаболическими нарушениями, хронической травматической энцефалопатией (СТЕ), повреждением нервных связей, психологическими изменениями или потерей сознания. В некоторых воплощениях mBI связана с потерей когнитивных или двигательных навыков, метаболическими нарушениями, хронической травматической энцефалопатией (СТЕ), повреждением нервных связей, психологическими изменениями и потерей сознания либо их комбинацией.

Настоящим изобретением предусмотрен способ снижения, ингибирования и/или сведения к минимуму повреждения нейронов, связанного с окислительным стрессом и избытком активных форм кислорода (ROS) при одном или нескольких случаях легкой травмы головного мозга (mBI) или сотрясения мозга у субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина, причем при таком введении грелина уменьшается окислительный стресс и избыток ROS, тем самым ингибируя повреждение нейронов, связанное с окислительным стрессом и избытком активных форм кислорода (ROS) при одном или нескольких случаях mBI или сотрясения мозга у субъекта. В одном воплощении грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt). В одном воплощении грелин является единственным активным средством. В одном воплощении грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt) и грелин является единственным активным средством.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ ингибирования повреждения нейронов, связанного с окислительным стрессом и избытком активных форм кислорода (ROS) при одном или нескольких случаях легкой травмы головного мозга (mBI), включая сотрясение мозга, у субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина, причем при таком введении грелина уменьшается окислительный стресс и избыток ROS и при этом грелин является единственным активным средством, тем самым ингибируя повреждение нейронов, связанное с окислительным стрессом и избытком активных форм кислорода (ROS) при одном или нескольких случаях mBI или сотрясения мозга у субъекта.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ ингибирования повреждения нейронов, связанного с окислительным стрессом и избытком активных форм кислорода (ROS) при одном или нескольких случаях легкой травмы головного мозга (mBI) или сотрясения мозга у субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина с содержанием углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt), причем при таком введении грелина уменьшается окислительный стресс и избыток ROS, тем самым ингибируя повреждение нейронов, связанное с окислительным стрессом и избытком активных форм кислорода (ROS) при одном или нескольких случаях mBI или сотрясения мозга у субъекта.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ ингибирования повреждения нейронов, связанного с окислительным стрессом и избытком активных форм кислорода (ROS) при одном или нескольких случаях легкой травмы головного мозга (mBI) или сотрясения мозга у субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина с содержанием углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt), причем при таком введении грелина уменьшается окислительный стресс и избыток ROS и при этом грелин является единственным активным средством, тем самым ингибируя повреждение нейронов, связанное с окислительным стрессом и избытком активных форм кислорода (ROS) при одном или нескольких случаях mBI или сотрясения мозга у субъекта.

Кроме того, в настоящем изобретении представлен способ восстановления внутриклеточных функций после легкой травмы головного мозга (mBI) у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина с тем, чтобы уменьшить ROS и улучшить поглощение глюкозы в мозге или нервных клетках и аксонах, тем самым восстанавливая внутриклеточные функции после mBI у субъекта. В одном воплощении грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt). В одном воплощении грелин является единственным активным средством. В одном воплощении грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt) и является единственным активным средством.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ восстановления внутриклеточных функций после легкой травмы головного мозга (mBI) у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина с тем, чтобы уменьшить ROS и улучшить поглощение глюкозы в мозге или нервных клетках и аксонах, причем грелин является единственным активным средством, тем самым восстанавливая внутриклеточные функции после mBI у субъекта.

Настоящим изобретением также еще предусмотрен способ восстановления внутриклеточных функций после легкой травмы головного мозга (mBI) у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина с содержанием углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt) с тем, чтобы уменьшить ROS и улучшить поглощение глюкозы в мозге или нервных клетках и ак-

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или уменьшения симптомов легкой травмы головного мозга (mBI) у субъектов, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина, тем самым происходит лечение или уменьшение симптомов mBI. В одном воплощении грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt). В одном воплощении грелин является единственным активным средством. В одном воплощении грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt) и является единственным активным средством.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или уменьшения симптомов легкой травмы головного мозга (mBI) у субъектов, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина, причем грелин является единственным активным средством, тем самым происходит лечение или уменьшение симптомов mBI.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или уменьшения симптомов легкой травмы головного мозга (mBI) у субъектов, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина с содержанием углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt), тем самым происходит лечение или уменьшение симптомов mBI.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или уменьшения симптомов легкой травмы головного мозга (mBI) у субъектов, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина с содержанием углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt), причем грелин является единственным активным средством, тем самым происходит лечение или уменьшение симптомов mBI.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или уменьшения симптомов легкой травмы головного мозга (mBI) у субъектов, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина в количестве, которое обеспечивает такой уровень грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у субъекта, тем самым происходит лечение или уменьшение симптомов mBI. В одном воплощении грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt). В одном воплощении грелин является единственным активным средством. В одном воплощении грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt) и является единственным активным средством.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или уменьшения симптомов легкой травмы головного мозга (mBI) у субъектов, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина в количестве, которое обеспечивает такой уровень грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у субъекта, причем грелин является единственным активным средством, тем самым происходит лечение или уменьшение симптомов mBI.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или уменьшения симптомов легкой травмы головного мозга (mBI) у субъектов, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина в количестве, которое обеспечивает такой уровень грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у субъекта, причем грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt), тем самым происходит лечение или уменьшение симптомов mBI.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или уменьшения симптомов легкой травмы головного мозга (mBI) у субъектов, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества грелина в количестве, которое обеспечивает такой уровень грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у субъекта, причем грелин имеет содержание углерода-14 (^{14}C) менее 1 части на триллион (ppt) и является единственным активным средством, тем самым происходит лечение или уменьшение симптомов mBI.

В некоторых воплощениях симптомами mBI являются головная боль, "давление в голове", боль в затылке, тошнота или рвота, головокружение, помутнение зрения, проблемы с равновесием, чувствительность к свету, чувствительность к шуму, ощущение заторможенности, "как в тумане", плохое самочувствие, трудно сосредоточиться, трудности с запоминанием, усталость или мало энергии, спутанность сознания, сонливость, потеря сознания, проблемы с засыпанием, повышенная эмоциональность, раздражительность, грусть и нервозность или тревожность.

Как изложено здесь, грелин может применяться для лечения и/или уменьшения тяжести легких травм головного мозга, таких, к примеру, как сотрясение мозга. Грелин можно давать или вводить так, как описано здесь. Как описано здесь в другом месте, грелин может быть единственным активным средством, которое вводится субъекту. К примеру, грелин может быть единственным активным ингредиентом для лечения mBI или уменьшения тяжести mBI. В некоторых воплощениях специально исключаются другие активные средства. Например, в некоторых из приведенных здесь способов, в которых вводится грелин, способы могут специально исключать применение или введение других соединений, таких, к примеру, как избирательные модуляторы андрогенных рецепторов, модуляторы стероидных рецепторов, лиганды глюкокортикоидных рецепторов или модуляторы сигнального пути NF-kB.

В описанных здесь воплощениях следует иметь в виду, что mBI отличается от тяжелой TBI и не является тяжелой TBI.

В некоторых воплощениях диагноз mBI или сотрясения мозга ставится методом неинвазивной

функциональной томографии после удара. В некоторых воплощениях диагноз mBI или сотрясения мозга ставится методом нейропсихологической оценки после удара. В некоторых воплощениях диагноз mBI или сотрясения мозга ставится методом нейроанатомической оценки мозга после удара. В некоторых воплощениях нейроанатомическая оценка головного мозга после удара проводится на клеточном уровне или на молекулярном уровне. В некоторых воплощениях диагноз mBI или сотрясения мозга ставится методом когнитивной оценки после удара. В некоторых воплощениях диагноз mBI или сотрясения мозга ставится по оценке внимательности после удара. В некоторых воплощениях диагноз mBI и сотрясения мозга может быть поставлен и/или установлен по оценке одного или нескольких из следующего: оценка сознания, оценка внимательности, оценка ориентации, оценка когнитивной функции, оценка психологического состояния, нейропсихологическая оценка.

В некоторых воплощениях диагноз mBI или сотрясения мозга ставится по шкале Glasgow Coma Scale (GCS) при 13-15 баллах. В некоторых воплощениях диагноз mBI или сотрясения мозга ставится по шкале Glasgow Coma Scale (GCS) при 13 баллах или больше.

Напротив, для примера, тяжелая TBI обычно дает показатель GCS в 8 баллов или меньше.

В некоторых воплощениях применяется внутривенное введение грелина. Способ введения должен обеспечивать то, что преобладающей формой в кровообращении будет неразложившаяся, биоактивная форма пептида, которая достигнет и будет стимулировать рецепторы грелина с тем, чтобы получить максимальный эффект применения грелина на mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах 30 мин после инцидента, приведшего к mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах от 30 мин до 2 ч после инцидента, приведшего к mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах от 30 мин до 6 ч после инцидента, приведшего к mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах от 30 мин до 12 ч после инцидента, приведшего к mBI.

Типичная дозировка составляет эквивалент дозы от 10 нг до 10 мг грелина на кг массы тела. В некоторых воплощениях грелин вводится в дозе, эквивалентной от 0,1 мкг до 1 мг грелина на кг массы тела, как то; от 0,5 мкг до 0,5 мг грелина на кг массы тела, от 1,0 мкг до 0,1 мг грелина на кг массы тела, от 1,0 мкг до 50 мкг грелина на кг массы тела, от 1,0 мкг до 10 мкг грелина на кг массы тела. В некоторых воплощениях примерно 10 мкг порошка грелина восстанавливают примерно в 100 мкл стерильного солевого раствора перед введением. В некоторых воплощениях стерильный солевой раствор содержится в мешочке для в/в вливания для легкости введения.

В некоторых воплощениях грелин или агонист грелина используется при анализе для оценки способности соединений-кандидатов повышать экспрессию разобщающего белка-2 (UCP-2), включая повышение экспрессии UCP-2 в митохондриях. При таких анализах грелин используется в качестве контроля для определения относительной эффективности соединений-кандидатов. Подходящие методы анализа включают, но только в качестве примера, конкурентный метод связывания соединений-кандидатов с рецептором стимулятора секреции гормона роста 1a (т.е. GHSR-1a) в присутствии грелина, а также метод фронтальной аффинной хроматографии.

Для анализа связывания соединений-кандидатов с рецептором стимулятора секреции гормона роста в присутствии грелина применимы любые методы конкурентного связывания, известные в данной области, как гетерогенные, так и гомогенные, с одним или несколькими реагентами, с метками и методами их обнаружения. В качестве не ограничительного примера методы обнаружения могут включать радиоактивные методы; ферментные методы с использованием интактных ферментов различного типа, включая, к примеру, β -галактозидазу, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, щелочную фосфатазу, пероксидазу хрена или глюкозооксидазу; методы с использованием фрагментов ферментов типа методов комплементации β -галактозидазы; системы детектирования с помощью хромогенных субстратов; флуоресцентные методы с детектированием непосредственно по флуоресценции, по флуоресценции с временным разрешением, поляризации флуоресценции или флуоресценции с переносом энергии; и химические или биOLUMиНесцентные системы детектирования.

В некоторых воплощениях для скрининга библиотек соединений может применяться фронтальная аффинная хроматография (FAC). Основная предпосылка FAC состоит в том, что непрерывное вливание соединения позволяет уравнивание лиганда между свободным и связанным состоянием, причем известна точная концентрация свободного лиганда. Выявление соединений, выходящих из колонки, может осуществляться такими методами, как флуоресценция, радиоактивность или масс-спектрометрия с электрораспылением. В первых двух методах обычно используется меченая библиотека либо меченое индикаторное соединение, которое конкурирует с известными немечеными соединениями и быстро вытесняется в присутствии более сильного связывающегося лиганда.

В некоторых воплощениях пациенты, страдающие потерей когнитивных или двигательных навыков вследствие mBI, в частности повторной mBI, могут подвергаться мониторингу в отношении терапии или прогрессирования этих навыков путем соотношения уровня грелина в мозге пациента по времени. По мере снижения уровня грелина будет возрастать потребность во вмешательстве.

Настоящим изобретением также предусмотрены способы измерения уровня грелина перед началом спорта или активности, к примеру перед началом футбольного сезона (или любого другого вида спорта

или активности, включая те, что перечислены здесь в другом месте), и мониторинга уровня грелина в течение сезона, чтобы установить, позволяет ли его уровень у игрока или участника выступать или принимать участие. Способы могут включать использование любого подходящего метода измерения или анализа для измерения уровня грелина, скажем, в крови, чтобы определить, коррелирует ли уровень в крови с уровнем в мозге.

При помощи представленных воплощений специалист сможет выбрать любой подходящий метод измерения уровня грелина. Для измерения уровня грелина применимы многие методы, известные в данной области для измерения уровня белков или гормонов. В качестве не ограничительного примера содержание грелина можно количественно оценить такими методами, как тест на сахар в крови путем извлечения капли крови и внесения её в устройство или методом, включающим измерение содержания вещества, в котором фотометрически отслеживается специфическая химическая реакция по времени, например, с помощью антитела, специфичного к грелину, которое наносят на частицы латекса и измеряют повышение мутности, вызванное тем, что измеряемый грелин будет способствовать агрегации частиц латекса по мере протекания реакции между грелином и антителом против грелина. Это измерение повышения мутности может осуществляться с помощью обычного фотометра с использованием связанных с этим научных принципов фотометрических измерений. Затем зависящие от концентрации значения мутности сравнивают со значениями, полученными от стандартов, принятых в данной области.

Другие совместимые, но не ограничительные методики включают проведение серии связанных с ферментами реакций в растворе, при этом грелин во фракции плазмы из образца цельной крови подвергается изменению при выполняемой ферментом реакции и в конечном счете дает цветную окраску из бесцветных компонентов. Окраска развивается в зависимости от времени и отслеживается фотометрически. Такое измерение изменения окраски также может осуществляться с помощью обычного фотометра с использованием связанных с этим научных принципов фотометрических измерений. Затем такое зависящее от концентрации изменение пропускания сравнивают со значениями, полученными от стандартов.

В образцах цельной крови гематокрит или процент эритроцитов по объему в образце цельной крови является переменной величиной и может приниматься во внимание при анализе уровня грелина, присутствующего в виде компонента плазмы. При повышении гематокрита в крови пациента уменьшается объем плазмы в пробе фиксированного объема, которая вводится в тест-устройство, и наоборот. Поскольку измеряется именно уровень грелина в плазме, то чем меньше объем плазмы, добавленной в реакционную смесь, тем ниже будет концентрация вещества, измеряемого в этой реакционной смеси, и полученные при анализе значения, и наоборот.

При анализе, дающем концентрацию вещества плазмы в цельной крови, можно делать поправку на изменения гематокрита, чтобы получить истинную концентрацию в плазме. В таких ситуациях очень полезным может быть измерение двух веществ, одним из которых будет исследуемый грелин, а другое будет служить маркером, по которому можно оценивать или нормализовать гематокрит в образце. Концентрация гемоглобина в цельной крови после лизиса эритроцитов прямо пропорциональна объему эритроцитов в пробе цельной крови.

Фармацевтические композиции.

Описанный здесь грелин может быть составлен в виде фармацевтической композиции, например, подвергнут быстрому замораживанию или лиофилизации для хранения и/или транспортировки. В некоторых воплощениях соединение может входить в композицию, к примеру, со стерильным солевым раствором. В некоторых воплощениях грелин может быть восстановлен в таком солевом растворе или другом приемлемом разбавителе. В некоторых воплощениях примерно 10 мкг порошка грелина восстанавливают примерно в 100 мкл солевого раствора перед введением. Кроме того, композиции можно вводить по отдельности или в сочетании с носителем типа фармацевтически приемлемого носителя или биосовместимого матрикса. Композиции по изобретению обычно вводятся парентерально путем инъекции, к примеру, внутривенно, подкожно или внутримышечно. Другие композиции, которые подходят для других способов введения, включают формы для приема внутрь. Формы для приема внутрь включают такие обычно используемые наполнители, к примеру, как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.п. Такие композиции имеют вид растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, форм с пролонгированным высвобождением или порошков и содержат от 10 до 95% активного ингредиента или от 25 до 70%.

Как правило, композиции вводятся способом, совместимым с дозовой формой, и в таком количестве, которое будет терапевтически эффективным для подлежащего лечению заболевания. Вводимое количество зависит от субъекта, подлежащего лечению. Точное количество композиции для введения зависят от суждения лечащего врача. Подходящие режимы для первоначального введения и последующего введения также различаются, но типично первоначальное введение, за которым следуют последующие введениями.

В некоторых воплощениях субъекту вводятся дополнительные фармацевтические композиции для поддержания или усиления описанных здесь композиций. Различные аспекты настоящего изобретения включают введение эффективного количества композиции субъектам. Кроме того, такие композиции могут вводиться в комбинации с другими средствами. Такие композиции обычно растворяют или дис-

пергируют в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Выражения "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относятся к таким молекулярным частицам и композициям, которые не вызывают неблагоприятных, аллергических или других отрицательных реакций при введении животным или человеку. В настоящем изобретении "фармацевтически приемлемый носитель" включает всевозможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т.п. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением тех случаев, когда какая-либо стандартная среда или средство несовместимы с активными ингредиентами, предусмотрено их применение в иммуногенных и терапевтических композициях.

Подходящие фармацевтические носители включают инертные твердые разбавители или заполнители, стерильные водные растворы и различные органические растворители. Примеры твердых носителей: лактоза, каолин, сахароза, циклодекстрин, тальк, желатин, агар, пектин, гуммиарабик, стеарат магния, стеариновая кислота или низшие алкиловые эфиры целлюлозы. Примеры жидких носителей: сироп, арахисовое масло, оливковое масло, фосфолипиды, жирные кислоты, амины жирных кислот, полиоксиэтилен или вода. Назальные аэрозоли или формы для ингаляции могут быть получены, к примеру, в виде растворов в физрастворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, усилителей всасывания для повышения биодоступности, фторуглеродов и/или других солюбилизирующих или диспергирующих средств.

Эффективное количество терапевтической композиции определяется на основании намеченной цели. Термин "единица дозы" или "дозировка" относится к физически дискретным единицам, пригодным для применения у субъектов, причем каждая единица содержит заданное количество композиции, рассчитанное на получение требуемых реакций, приведенных выше в связи со введением, т.е. соответствующим способом и режимом введения. Вводимое количество в отношении количества раз и единицы дозы зависит от требуемого результата и/или степени защиты. Точное количество композиции также зависит от суждения лечащего врача и индивидуально для каждого индивида. Факторы, влияющие на дозу, включают физическое и клиническое состояние субъекта, способ введения, намеченные цели лечения (ослабление симптомов или же излечение), а также активность, стабильность и токсичность данной композиции. После приготовления растворы должны вводиться способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое будет терапевтически или профилактически эффективным. Лекарственные формы легко вводятся в виде различных дозовых форм типа описанных выше растворов для инъекций.

Композиции грелина могут быть получены методами, хорошо известными в данной области. Например, полипептидная область грелина может быть синтезирована и модифицирована химическим или биохимическим способом. Методы химического синтеза полипептидов хорошо известны в данной области (Lee V.H.L. in "Peptide and Protein Drug Delivery", New York, N.Y., M. Dekker, 1990). Примеры методов биохимического синтеза с введением нуклеиновой кислоты в клетки и экспрессированием нуклеиновых кислот представлены в Ausubel F.M. et al.: "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley, 1987-1998; и Sambrook J. et al.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2d Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; каждая из которых включена сюда путем ссылки. Другой типичный метод, описанный в US Pat. № 5304489, включенном сюда путем ссылки, заключается в использовании трансгенных млекопитающих с прицельными мутациями в молочной железе, позволяющими вырабатывать и секретировать синтезированный грелин в молоке трансгенных млекопитающих.

Грелин также можно получить рекомбинантным способом, используя стандартные методы экспрессии, известные в данной области. Полинуклеотид, кодирующий нужный грелин (например, главным образом последовательность грелина, приведенную в SEQ ID NO: 1), функционально соединяют с промотором в экспрессирующем векторе, пригодном для любого подходящего хозяина. При получении рекомбинантного грелина используются как эукариотические, так и прокариотические системы хозяина. Затем грелин выделяют из лизированных клеток или из культуральной среды и очищают до степени, необходимой для его применения по назначению. Выделенный грелин может подвергаться модификации или дальнейшей модификации по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3 путем ацилирования жирной кислотой *in vivo* или *in vitro*, причем условия последней реакции ацилирования *in vitro* включают тиоэфир жирной кислоты, грелин и микросомы, содержащие грелин-О-ацилтрансферазу (GOAT). В некоторых воплощениях ацилгрелин, модифицированный жирной кислотой по серину в положении аминокислоты 2 и/или по серину в положении аминокислоты 3, выделяют из клеток или компонентов реакции.

Композиции грелина могут включать фармацевтически приемлемые соли его соединений. Эти соли должны быть приемлемыми при фармацевтическом применении, что означает, что соль должна сохранять биологическую активность исходного соединения и не должна иметь отрицательных или вредных эффектов при ее применении при лечении заболеваний. Фармацевтически приемлемые соли получают стандартными способами.

Композиции грелина могут вводиться в виде его солей с щелочными металлами или щелочнозе-

мельными металлами, параллельно, одновременно или вместе с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, в особенности в виде фармацевтической композиции, различными способами введения (например, перорально, ректально, парентерально, подкожно) в эффективном количестве.

Введение композиций.

Настоящим изобретением предусмотрен способ снижения частотности или тяжести mBI у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества соединения, содержащего грелин, тем самым снижается частота или тяжесть mBI. Настоящим изобретением также предусмотрены способы снижения частотности или тяжести mBI у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества грелина, тем самым снижается частота или тяжесть mBI. Изобретением также предусмотрены способы уменьшения количества времени, необходимого для восстановления от легкой травмы головного мозга, включающие введение пациенту, страдающему от легкой травмы головного мозга, терапевтически эффективного количества грелина в пределах определенного времени (например, 72 ч) после легкой травмы головного мозга.

В некоторых воплощениях грелин вводится перед событием или деятельностью, создающей возможность возникновения mBI. В некоторых воплощениях событием или деятельностью является участие в спортивных соревнованиях, тренировках или боевых действиях. В некоторых воплощениях событием или деятельностью является бейсбол, баскетбол, регби, американский футбол, хоккей, лакросс, футбол, велоспорт, бокс, гимнастика, боевое искусство, смешанное боевое искусство, военные учения, автомобильные гонки, катание на лыжах, на сноуборде, катание на коньках, на скейтборде, мотокросс, катание на горном велосипеде, мотоцикле или вездеходе и т.п. В некоторых воплощениях субъект не страдает от mBI. В некоторых воплощениях субъект имеет историю mBI или подвержен mBI.

В некоторых воплощениях способ введения грелина выбирают из: буккального введения, сублингвального введения, трансдермального введения, ингаляции и безигольной инъекции типа способов, разработанных на PowderJet. Для ингаляции грелин может быть составлен способами, известными специалистам в данной области, к примеру, в виде аэрозоля, сухого порошка или солюбилизированного типа микрокапель в устройстве, предназначенном для такого введения (типа коммерчески доступных устройств и рецептурных технологий фирмы Aradigm Corp. (Hayward, Calif.), Alkermes, Inc. (Cambridge, Mass.), Nektar Therapeutics (San Carlos, Calif.), Windgap Medical, Inc. (например, Abiliject™) или MannKind Corporation (Valencia, Calif.; например, технологии Technosphere®, Dreamboat® и Cricket™).

В некоторых воплощениях грелин вводится в виде порошка или стабильной лекарственной формы, в которой грелин входит в состав дозовой формы, выбранной из группы, состоящей из жидкостей, напитков, лекарственных спортивных напитков, порошков, капсул, жевательных таблеток, каплеток, таблеток для проглатывания, буккальных таблеток, пастилок, леденцов, жвачек, растворов, суспензий, спреев, свечей, настоек, отваров, вытяжек и их комбинаций.

В некоторых воплощениях грелин вводится посредством ингаляции, перорально, внутривенно, парентерально, буккально, подкожно, чрескожно, с помощью пластыря, сублингвально, внутримышечно или интраназально. В некоторых воплощениях грелин вводится в виде однократной дозы. В некоторых воплощениях грелин вводится в виде нескольких доз. В некоторых воплощениях грелин вводится в дозе от 10 нг/кг в день до 10 мг/кг в день (или любое промежуточное значение или в промежуточном диапазоне между ними, например, от 0,1 мкг/кг в день до 5 мг/кг в день). В некоторых воплощениях введение дозы (2 мкг/кг, к примеру, внутривенно) применяется в пределах 8 ч после травмы. Введение дозы представляет собой введение дозы за один раз с возможным повторным введением исходя из симптомов пациента.

Интраназальное введение является неинвазивным способом доставки лекарств в центральную нервную систему вследствие относительно высокой проницаемости эпителия носовой оболочки, избегая пресистемного метаболизма в печени. Назальное введение легко выполняется и позволяет самостоятельное введение индивидом. Важным фактором, ограничивающим назальное введение лекарств, является клиренс через носовой реснитчатый эпителий. Носовой мукоцилиарный клиренс существенно ограничивает время, доступное для всасывания лекарств, и может эффективно мешать пролонгированному введению лекарств. Однако было показано, что интраназальное введение определенных гормонов приводит к более полному введению. В некоторых воплощениях настоящего изобретения применяется интраназальное введение грелина.

В некоторых воплощениях композиция, содержащая грелин, которая пригодна для интраназального введения, может включать в себя один или несколько биоадгезивных полимеров. Некоторые полимеры типа карбопола могут прилипать к слизистой оболочке носа в течение достаточно длительного времени, предотвращая быстрое выведение из носа. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание биоадгезивного полимера в подходящем растворе грелина составляет около 0,1%. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание биоадгезивного полимера в подходящем растворе грелина составляет около 0,5%. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание биоадгезивного полимера в подходящем растворе грелина составляет около 1%. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для

назального введения, содержание биоадгезивного полимера в подходящем растворе грелина составляет около 5%.

В некоторых воплощениях композиция, содержащая грелин, которая пригодна для интраназального введения, может включать в себя одно или несколько поверхностно-активных веществ (ПАВ). Поверхностно-активные вещества, которые можно использовать в композициях настоящего изобретения, включают различные полиэтиленгликоли (ПЭГ) и производные полиэтиленгликолей. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание ПАВ в подходящем растворе грелина составляет около 1%. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание ПАВ в подходящем растворе грелина составляет около 2%. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание ПАВ в подходящем растворе грелина составляет около 5%. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание ПАВ в подходящем растворе грелина составляет около 10%.

В некоторых воплощениях композиция, содержащая грелин, которая пригодна для интраназального введения, может включать в себя одно или несколько буферных веществ для контролирования pH композиции. Буферные вещества, которые можно использовать в композициях настоящего изобретения, включают лимонную кислоту и двухводный цитрат натрия. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание буферного вещества в подходящем растворе грелина составляет около 0,001%. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание буферного вещества в подходящем растворе грелина составляет около 0,005%. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание буферного вещества в подходящем растворе грелина составляет около 0,01%. В некоторых воплощениях композиций, пригодных для назального введения, содержание буферного вещества в подходящем растворе грелина составляет около 0,1%.

В некоторых воплощениях осмолярность композиций, содержащих грелин, можно контролировать с помощью пропиленгликоля. Если композиция, содержащая грелин, представляет собой гель, то она может включать в себя гелеобразующее вещество типа гидроксипропилцеллюлозы, карбопола, карбоксиметилцеллюлозы и этилцеллюлозы. В некоторых воплощениях композиция, содержащая грелин, может содержать консервант типа этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и бензалкония хлорида. Неограничительные примеры подходящих растворителей для композиций настоящего изобретения включают воду, растительное масло и этанол. В некоторых воплощениях применение назальной ингаляции снижает концентрацию, необходимую для лечения mBI, и предотвращает нежелательные побочные эффекты.

В некоторых воплощениях интраназальное введение является более практичным способом введения в военной или спортивной обстановке. В некоторых воплощениях настоящего изобретения предусмотрен способ повышения уровня медицинской помощи для профилактики или лечения mBI у военнослужащих или спортсменов посредством профилактического и посттравматического интраназального введения лекарственных средств. В некоторых воплощениях активным ингредиентом лекарственного средства является грелин. В некоторых воплощениях грелин может входить в состав лекарственной формы, которая вводится интраназально с тем, чтобы облегчить доступ и применение в полевых условиях и минимизировать дозу, необходимую для дальнейшего ограничения побочных эффектов. Применение грелина в качестве лекарственного средства может уменьшить плохие исходы после травмы, в особенности нейropsychологические и нейродегенеративные расстройства, в том числе хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ) и посттравматический стрессовый синдром (PTSD) в связи с повторяющимися травмами головного мозга, что вызывает все большее беспокойство для современных военнослужащих и спортсменов.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предусмотрены композиции, содержащие грелин, которые применяются в виде капель в нос, глазных капель и назальных аэрозолей. Для назального применения можно использовать растворы или суспензии, которые применяются в виде аэрозоля, т.е. в виде тонкой дисперсии в воздухе, или при помощи стандартного пульверизатора или распылителя. Подходящие нетоксичные фармацевтически приемлемые носители для систем введения лекарственных средств для интраназального введения грелина могут включать в себя, без ограничения, носители, используемые для назальных лекарственных форм для других стероидов типа эстрогена.

В некоторых воплощениях лекарственные формы по настоящему изобретению могут содержать консерванты и/или стабилизаторы. К ним относятся, без ограничения, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и её соли щелочных металлов (к примеру, двухзамещенные соли типа двуназиевой соли, кальциевой соли, кальций-натриевой соли), п-гидроксibenзоаты низших алкилов, хлоргексидин (например, в виде ацетата или глюконата) и фенилртутьборат. Другие подходящие консерванты: фармацевтически применимые четвертичные аммониевые соединения, к примеру цетилпиридиний хлорид, тетрадецилтриметиламмоний бромид, общеизвестный как "цетримид", N-бензил-N,N-диметил-2-[2-[4-(2,4,4-триметилпентан-2-ил)фенокси]этокси]этанаминий хлорид, общеизвестный как "бензетоний хлорид", и миристилпиколиний хлорид. Каждое из этих соединений можно использовать в концентрации от 0,002 до 0,05%, к примеру около 0,02% (вес/объем в жидких формах, в других случаях вес/вес). В некоторых

воплощениях консервантами из числа четвертичных аммониевых соединений служат, без ограничения, алкилбензилдиметиламмоний хлорид и его смеси, к примеру бензалконий хлорид.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предусмотрена стратегия лечения для спортсменов, перенесших mBI, которая может не только сократить время, необходимое для безопасного возвращения к игре, но и обеспечивает защиту от будущих mBI.

Интраназальное введение (IN) может иметь меньше побочных эффектов, чем внутривентриальное введение (IV) вследствие переключения фармацевтических исследований на назальные аэрозоли, капли и гели: назальный путь введения лекарственных веществ продолжает получать все большее внимание со стороны ученых и врачей в области фармацевтики, потому что этот способ обходит пресистемный метаболизм в печени, связанный с приемом внутрь, легко доступен и подходит для самостоятельного введения лекарств. Интраназальное введение также особенно подходит для препаратов, нацеленных на мозг, так как растворы некоторых препаратов могут обходить гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и достигать центральной нервной системы (ЦНС) прямо из полости носа - захват этих препаратов зависит от их молекулярной массы и липофильности. Интраназальное введение повышает уровень таких препаратов в мозге и в то же время снижает системные концентрации, поэтому оно должно иметь меньше вредных побочных эффектов.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предусмотрен способ профилактического введения композиций, содержащих грелин, лицам, принимающим участие в таких активностях, как контактные виды спорта, или проходящим службу в вооруженных силах, где они имеют возможность получить mBI. В некоторых воплощениях настоящего изобретения предусмотрен способ острого лечения лиц, перенесших mBI. При остром лечении назальное введение композиции, содержащей грелин, может уменьшить время для захвата и повысить концентрацию грелина, попадающего в кровь или мозг.

Для перорального введения такие наполнители включают, например, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, сахарина натрия, талька, целлюлозы, глюкозы, желатина, сахарозы, карбоната магния и т.п. В порошках носитель представляет собой мелко измельченное твердое вещество, которое образует смесь с мелкоизмельченным активным компонентом. В таблетках активный компонент смешан с носителем, обладающим необходимой связывающей способностью, в подходящих пропорциях и спрессован в требуемую форму нужного размера. Порошки и таблетки содержат от 1 до 70% активного соединения. Подходящими носителями являются карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактоза, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, натриевая карбоксиметилцеллюлоза, легкоплавкий воск, масло какао и т.п. Термин "препарат" служит для обозначения композиций, содержащих приведенное здесь активное соединение с инкапсулирующим материалом в качестве носителя, образующим капсулу, в которой активный компонент с носителем или без него окружен носителем, который связан с ним. Точно так же включены облатки и лепешки. Таблетки, порошки, капсулы, пилюли, облатки и лепешки могут служить твердыми формами, подходящими для перорального введения.

Также включены твердые формы препаратов, которые нужно превращать незадолго до применения в жидкие формы препаратов для перорального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии. Эти препараты могут содержать наряду с активным компонентом красители, ароматизаторы, стабилизаторы, буферы, искусственные и естественные подсластители, диспергаторы, загустители, солюбилизующие средства и др.

Другие формы, подходящие для перорального введения, включают жидкие формы препаратов, в том числе эмульсии, сиропы, эликсиры, водные растворы, водные суспензии, зубные пасты, гели для чистки зубов, жевательные резинки, или твердые формы препаратов, которые незадолго до применения нужно превращать в жидкие формы препаратов. Эмульсии можно получить в виде растворов в водных растворах пропиленгликоля, или же они могут содержать такие эмульгаторы, как лецитин, сорбитанмоноолеат или гуммиарабик. Водные растворы можно получить путем растворения активного компонента в воде и добавления подходящих красителей, ароматизаторов, стабилизаторов и загустителей. Водные суспензии можно получить путем диспергирования мелкоизмельченного активного компонента в воде с такими вязкими материалами, как природные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлоза, натриевая карбоксиметилцеллюлоза и другие хорошо известные суспендирующие вещества. Твердые формы препаратов включают растворы, суспензии и эмульсии и могут содержать наряду с активным компонентом красители, ароматизаторы, стабилизаторы, буферы, искусственные и естественные подсластители, диспергаторы, загустители, солюбилизующие средства и др.

Введение грелина основывается на подходящих режимах дозировки, в которых учитываются факторы, хорошо известные в данной области, включая, например, тип субъекта для введения; возраст, вес, пол и медицинское состояние субъекта; способ введения; функции почек и печени у субъекта; требуемый эффект; и конкретные используемые соединения. Оптимальная точность в достижении концентраций препарата в пределах диапазона, обеспечивающего эффективность без токсичности, требует режима, основанного на кинетике доступности препарата для намеченных сайтов. Это включает учет распределения, равновесия и элиминации препарата.

В некоторых воплощениях композиции грелина вводятся подкожно. В некоторых воплощениях композиции грелина вводятся болюсом, причем формой для введения может быть любая подходящая

парентеральная форма.

Фармацевтические композиции для парентерального введения включают стерильные водные и неводные растворы для инъекций, дисперсии, суспензии или эмульсии, а также стерильные порошки для разведения в стерильных растворах или дисперсиях для инъекций непосредственно перед применением. Другие подходящие формы для введения включают свечи, аэрозоли, мази, кремы, гели, ингаляции, кожные пластыри, имплантаты, пилюли, таблетки, пастилки и капсулы.

Типичная, без ограничения, дозировка составляет эквивалент дозы от 10 нг до 10 мг грелина на кг массы тела. В некоторых воплощениях грелин вводится в дозе, эквивалентной от 0,1 мкг до 1 мг грелина на кг массы тела, как то: от 0,5 мкг до 0,5 мг грелина на кг массы тела, от 1,0 мкг до 0,1 мг грелина на кг массы тела, от 1,0 мкг до 50 мкг грелина на кг массы тела, от 1,0 мкг до 10 мкг грелина на кг массы тела.

В некоторых воплощениях применяются внутривенные инъекции грелина. Способ введения должен обеспечивать то, что преобладающей формой в кровообращении будет неразложившаяся, биоактивная форма пептида, которая достигнет и будет стимулировать рецепторы грелина с тем, чтобы получить максимальный эффект применения грелина на mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах 30 мин после инцидента, приведшего к mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах от 30 мин до 2 ч после инцидента, приведшего к mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах от 30 мин до 6 ч после инцидента, приведшего к mBI. В некоторых воплощениях грелин вводится в пределах от 30 мин до 12 ч после инцидента, приведшего к mBI.

Композиции грелина могут быть составлены для парентерального введения (например, посредством инъекции, к примеру, болюсом или непрерывным вливанием) и могут быть представлены в стандартной дозовой форме в ампулах, предварительно заполненных шприцах, емкостях для вливания небольшого объема или в мультидозовых контейнерах с добавлением консерванта. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, к примеру растворы в водном полиэтиленгликоле. С другой стороны, активный ингредиент может иметь вид порошка, полученного путем асептического выделения стерильного твердого вещества или путем лиофилизации из раствора для восстановления перед применением в соответствующем носителе, например стерильной, свободной от пирогенов воде. Водные растворы следует соответствующим образом забуферить, если нужно, а жидкий разбавитель сначала сделать изотоническим с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривентриального введения. Все используемые стерильные водные среды можно легко получить стандартными методами, известными специалистам в данной области.

Фармацевтические дозовые формы, пригодные для инъекции или инфузии, могут включать стерильные водные растворы или дисперсии, содержащие активный ингредиент, которые приспособлены для введения путем инкапсулирования в липосомах. Во всех случаях окончательная дозовая форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях производства и хранения. Стерильные растворы для инъекций готовят путем введения грелина или его фармацевтически приемлемой соли в требуемом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по необходимости с последующей стерилизацией, например, фильтрованием.

Соединения грелина также можно вводить топически. Участки для топического введения включают поверхность кожи, а также слизистые оболочки тканей прямой кишки, носа, рта и горла. Композиции для местного введения через кожу и слизистые оболочки не должны вызывать признаков раздражения типа опухания или покраснения.

Композиции грелина могут включать фармацевтически приемлемый носитель, приспособленный для местного введения. Так, композиции могут иметь вид, к примеру, суспензий, растворов, мазей, лосьонов, кремов, пены, аэрозоля, спрея, свечей, имплантатов, ингаляций, таблеток, капсул, сухих порошков, сиропов, бальзамов или пастилок. Способы получения таких композиций хорошо известны в фармацевтической промышленности.

Композиции грелина можно вводить и трансдермально, что включает доставку фармацевтического средства для прохождения препарата через кожу в системный кровоток пациента. Участки кожи включают анатомические зоны для трансдермального введения лекарственных средств и включают предплечье, живот, грудь, спину, ягодицы и т.п. Трансдермальное введение осуществляется путем наложения источника активного соединения на кожу пациента на длительный период времени. Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, обеспечивая контролируемую доставку комплекса соединения в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены путем растворения, диспергирования или иным способом введения соединения грелина в соответствующую среду типа эластомерного материала матрикса. Также можно использовать усилители всасывания для увеличения потока соединения через кожу. Скорость такого потока можно контролировать путем обеспечения контролирующей скоростью мембраны или диспергирования соединения в полимерном матриксе или геле.

Наборы.

Композиции грелина могут вводиться сами по себе или в комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями или наполнителями в виде однократных или многократных доз. Композиции для удобства могут быть представлены в стандартной дозовой форме известными специалистам в этой об-

ласти способами. Соединения могут быть представлены в виде набора. Такой набор обычно содержит активное соединение в дозовой форме для введения. Набор включает такое количество дозовых единиц, которое соответствует данному режиму дозирования. В некоторых воплощениях набор включает фармацевтическую композицию, содержащую соединение грелина или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, жидкий носитель и/или наполнитель, причем такой набор содержит несколько дозовых единиц. Дозовые единицы содержат такое количество грелина или его соли, которое эквивалентно от 0,3 мкг до 600 мг грелина, как то: от 2,0 мкг до 200 мг грелина, от 5,0 мкг до 100 мг грелина, от 10 мкг до 50 мг грелина, от 10 мкг до 5 мг грелина, от 10 мкг до 1,0 мг грелина.

Набор содержит инструкции, указывающие применение дозовой формы для достижения требуемого эффекта и количество дозовой формы, которое следует принять на протяжении определенного времени. Соответственно в одном воплощении набор включает инструкции по введению фармацевтической композиции. В частности, такие инструкции могут включать инструкции, относящиеся к введению данной фармацевтической композиции после mBI или сотрясения мозга либо не более чем через 12 ч после инцидента, вызвавшего mBI или сотрясение мозга, как то: не более 6 ч после инцидента, вызвавшего mBI или сотрясение мозга, не более 3 ч после инцидента, вызвавшего mBI или сотрясение мозга, не более 1 ч после инцидента, вызвавшего mBI или сотрясение мозга, не более 30 мин после инцидента, вызвавшего mBI или сотрясение мозга, не более 10 мин после инцидента, вызвавшего mBI или сотрясение мозга, не более 5 мин после инцидента, вызвавшего mBI или сотрясение мозга.

Примеры

Следующие примеры предназначены для дальнейшей иллюстрации определенных воплощений изобретения и не должны ограничивать его объем.

Пример 1.

Введение грелина уменьшает окислительную вспышку в воспалительных клетках после mBI. Поскольку еще нет общепринятой модели на животных для сотрясения мозга, то в качестве модели mBI использовали очень небольшое повреждение мозга, которое близко имитирует mBI. Мышам C57/B6, анестезированным 5% изофлураном в кислороде (1,7 л/мин), вводили подкожно 0,3 мг/кг бупренорфина для обезболивания перед нанесением легкой травмы головного мозга. Анестезию оценивали по щипковому рефлексу лап. После создания трепанационного отверстия через твердую оболочку мозга с помощью бормашины создавали очаг повреждения с помощью контролируемого кортикального импактора (CCI) на 1 мм сбоку и позади от брегмы (5,0 мм/с на глубину в 1,0 мм).

Животных разделяли на три опытные группы: 1) ложная обработка, 2) mBI и 3) mBI плюс грелин. Тестировали различные дозы в зависимости от конкретного грелина. Грелин получали, к примеру, от Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Burlingame, CA). Например, от 1 до 50 мкг в одной или нескольких временных точках. В качестве одного примера подкожного введения грелина - 1 доза в 10 мкг после mBI и дополнительная доза в 10 мкг через 1 ч после этого. Ткани мозга извлекали через 2-8 ч, предпочтительно через 6 ч после травмы. Активные формы кислорода (ROS) измеряли по окислительной вспышке нейтрофилов в лейкоцитах, выделенных из ткани головного мозга, как показано на фиг. 1, на которой представлен принцип определения окислительной вспышки в воспалительных клетках. Дигидрородамин 123 (DHR 123) диффундирует через клеточную мембрану. DHR 123 при столкновении с активными формами кислорода (ROS) окисляется и дает зеленую флуоресценцию. Затем флуоресценцию измеряли и выражали в произвольных единицах флуоресценции (AFU), причем большая интенсивность означает большую окислительную вспышку и тем самым большую концентрацию или содержание ROS. Выделяли клетки головного мозга (например, с помощью коллагеназы Dispase/ДНКазы и в градиенте Percoll с ресуспендированием осадка в 100 мкл HBSS). Окислительную вспышку, которая является маркером ROS, измеряли методом проточной цитометрии (например, канал FL1 с лазером на 488 нм).

Окислительная вспышка возрастает у животных после mBI по сравнению с контролем. Количество животных составляло по 3 в каждой группе (n=3 животных в каждой группе). Обработка грелином уменьшала окислительную вспышку по сравнению с необработанными животными с mBI (фиг. 2). Из фиг. 2 видно, что подкожное введение грелина уменьшает окислительную вспышку в воспалительных клетках после mBI. Воздействие на mBI при введении грелина можно количественно оценить, к примеру, по произвольным единицам флуоресценции (AFU) (фиг. 3). На фиг. 3 представлено количественное определение окислительной вспышки в ипсилатеральной части мозга после легкой BI. Окислительная вспышка возрастала у животных после mBI по сравнению с контролем. Обработка грелином уменьшала окислительную вспышку по сравнению с mBI без обработки (фиг. 2 и 3).

Как видно из фиг. 3, окислительная вспышка возрастала у животных после mBI по сравнению с контролем на ложную обработку (7963 ± 2900 AFU (легкая BI) в сравнении с 4624 ± 1858 AFU (ложная обработка); n=5 животных в каждой группе)). Обработка грелином уменьшала окислительную вспышку по сравнению с mBI (7963 ± 2900 AFU (легкая BI) в сравнении с 3257 ± 1031 AFU (легкая BI+грелин (2 дозы))); $p=0,048$ по t-критерию Стьюдента).

Пример 2.

Способность грелина к связыванию с GHS-R можно определить по анализу связывания. Получали

клетки линии CHO-K1 яичников китайского хомячка, экспрессирующие рекомбинантный рецептор GHS человека.

Клетки можно получить любым подходящим способом. Один из таких способов включает в себя клонирование кДНК для рецептора стимулятора секреции гормона роста человека (hGHS-R1a, или рецептора грелина) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя РНК головного мозга человека в качестве матрицы (Clontech, Palo Alto, CA), геноспецифичные праймеры, фланкирующие полноразмерную последовательность, кодирующую hGHS-R (S: 5'-ATGTGGAACGCGACGCCAGCGAAGAG-3' (SEQ ID NO: 2) и SA: 5'-TCATGTATTAATACTAGATTCTGTCCA-3') (SEQ ID NO: 3), и набор для ПЦР Advantage 2 (Clontech). Продукт ПЦР клонировали в вектор pCR2.1 с помощью набора Original TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Полноразмерный GHS-R человека субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA 3.1 для млекопитающих (Invitrogen). Эту плазмиду трансфецировали в клетки линии CHO-K1 яичников китайского хомячка (American Type Culture Collection, Rockville, MD) кальцийфосфатным методом (Wigler M et al., Cell 11, 223, 1977). Отдельные клоны клеток, стабильно экспрессирующие hGHS-R, получали путем отбора трансфецированных клеток, растущих на клонирующих кольцах в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1 мМ пирувата натрия, содержащей 0,8 мг/мл G418 (Gibco, Grand Island, NY).

Анализ связывания с GHS-R проводили путем гомогенизации клеток CHO-K1, экспрессирующих рекомбинантный рецептор GHS человека, в 20 мл ледяного 50 мМ трис-HCl с помощью Brinkman Polytron (Westbury, NY). Гомогенаты дважды промывали центрифугированием (39000 g, 10 мин), а конечные осадки ресуспендировали в 50 мМ трис-HCl, содержащем 2,5 мМ MgCl₂ и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Для анализа связывания с GHS-R порции (0,4 мл) инкубировали с 0,05 нМ ¹²⁵I-грелина (~2000 Ки/ммоль, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) в присутствии 0,05 мл немеченых конкурирующих тест-пептидов и без них. После 60 мин инкубации (4°C) отделяли связанный ¹²⁵I-грелин от свободного путем быстрой фильтрации через фильтры GF/C (Brandel, Gaithersburg, MD), которые были заранее пропитаны 0,5% полиэтиленимином/0,1% BSA. Затем фильтры промывали три раза по 5 мл 50 мМ трис-HCl с 0,1% бычьего сывороточного альбумина, а связавшуюся радиоактивность, удерживаемую на фильтрах, просчитывали на гамма-спектрометре (Wallac LKB, Gaithersburg, MD). Специфическое связывание определяли как общее количество связавшегося ¹²⁵I-грелина за вычетом связавшегося в присутствии 1000 нМ грелина.

Пример 3.

Функциональную активность грелина исследовали по анализам функциональной активности GHS-R *in vitro* и *in vivo*. Связывание грелина с рецептором GSH может опосредовать мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺ *in vitro*. Грелин также можно протестировать на способность стимулировать или подавлять высвобождение гормона роста (GH) *in vivo*.

Использовали клетки, экспрессирующие рецептор GSH человека. Например, собирали клетки CHO-K1, экспрессирующие рецептор GSH человека, путем инкубации в солевом растворе с фосфатным буфером и 0,3% ЭДТА (25°C) и дважды промывали центрифугированием. Промытые клетки ресуспендировали в буферном солевом растворе Хэнка (HBSS) для загрузки Fura-2AM - флуоресцентного индикатора Ca²⁺. Клеточные суспензии примерно в 10⁶ клеток/мл инкубировали с 2 мкМ Fura-2AM в течение 30 мин при 25°C. Свободный Fura-2AM удаляли центрифугированием два раза в HBBS, а конечные суспензии переносили в спектрофлуориметр (Hitachi F-2000), снабженный магнитной мешалкой и держателем кювет с регулируемой температурой. После уравнивания до 37°C добавляли грелин для измерения мобилизации внутриклеточного Ca²⁺. Длина волн возбуждения и излучения может составлять, к примеру, 340 и 510 нм соответственно.

Грелин можно протестировать на его способность стимулировать или подавлять высвобождение гормона роста (GH) *in vivo* (Deghenghi R. et al., Life Sciences, 1994, 54, 1321-1328; International Application WO № 02/08250; каждая из которых включена сюда путем ссылки во всей полноте). Так, например, для того, чтобы установить способность грелина стимулировать высвобождение гормона роста *in vivo*, соединение можно ввести подкожно 10-дневным крысам в дозе, например, 300 мг/кг. Циркулирующий GH можно определять, например, через 15 мин после инъекции и сравнивать с уровнем GH у крыс, получавших контрольный растворитель.

Следует иметь в виду, что хотя настоящее изобретение было описано в сочетании с вышеприведенными воплощениями, однако представленное выше описание и примеры предназначены для иллюстрации, а не ограничения объема настоящего изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации в рамках настоящего изобретения должны быть очевидны специалистам в той области, к которой относится настоящее изобретение.

Настоящее изобретение не должно ограничиваться в объеме конкретными описанными воплощениями, которые лишь служат в качестве иллюстрации отдельных аспектов настоящего изобретения, а также любыми композициями или способами, которые функционально эквивалентны и входят в рамки настоящего изобретения. Специалистам в данной области должно быть ясно, что в способах и композициях настоящего изобретения могут производиться различные модификации и вариации, не отходящие

от сущности или объема изобретения. Так, предусматривается, что настоящее изобретение охватывает модификации и варианты данного изобретения при условии, что они входят в рамки прилагаемой формулы изобретения и её эквивалентов.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены сюда путем ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была специально и отдельно указана как включенная путем ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

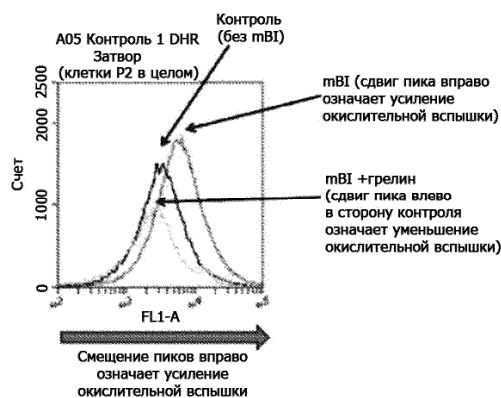
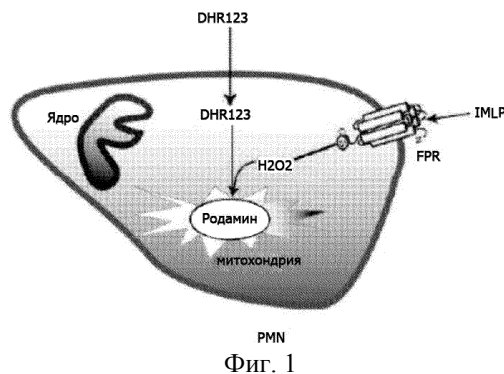
1. Применение грелина для лечения легких травм головного мозга (mBI) у пациента.
2. Применение грелина для лечения легких травм головного мозга (mBI) у пациента в количестве, достаточном для обеспечения такого уровня грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у пациента.
3. Применение по п.1 или 2, при котором грелин имеет последовательность Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 1).
4. Применение по п.1 или 2, при котором mBI представляет собой сотрясение мозга.
5. Способ лечения легкой травмы головного мозга (mBI) у пациента, включающий введение ему терапевтически эффективного количества грелина в дозе от 10 нг/кг в день до 10 мг/кг в день.
6. Способ по п.5, в котором грелин имеет последовательность Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 1).
7. Способ по п.6, в котором грелин модифицирован одной или несколькими жирными кислотами.
8. Способ по п.7, в котором жирная кислота представляет собой октановую кислоту.
9. Способ по п.6, в котором грелин модифицирован по серину в положении 2 и/или по серину в положении 3 в SEQ ID NO: 1.
10. Способ по п.9, в котором грелин модифицирован ацилированием октановой кислотой.
11. Способ по п.10, в котором грелин модифицирован ацилированием октановой кислотой по серину в положении 3 в SEQ ID NO: 1.
12. Способ по п.5, в котором mBI представляет собой сотрясение мозга.
13. Способ по п.5, в котором пациентом является млекопитающее.
14. Способ по п.5, в котором грелин вводится не позднее 24 ч после mBI.
15. Способ по п.14, в котором грелин вводится не позднее 8 ч после mBI.
16. Способ по п.5, в котором грелин вводится в количестве, достаточном для обеспечения такого уровня грелина в крови, который по меньшей мере в 2 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у пациента.
17. Способ по п.5, в котором грелин вводится однократной дозой.
18. Способ по п.5, в котором грелин вводится в дозе 2 мкг/кг в день.
19. Способ лечения легкой травмы головного мозга (mBI) у пациента, включающий введение ему терапевтически эффективного количества грелина, достаточного для обеспечения такого уровня грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у пациента.
20. Способ по п.19, в котором грелин имеет последовательность Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEQ ID NO: 1).
21. Способ по п.19, в котором грелин модифицирован одной или несколькими жирными кислотами.
22. Способ по п.21, в котором жирная кислота представляет собой октановую кислоту.
23. Способ по п.20, в котором грелин модифицирован по серину в положении 2 и/или по серину в положении 3 в SEQ ID NO: 1.
24. Способ по п.23, в котором грелин модифицирован ацилированием октановой кислотой.
25. Способ по п.24, в котором грелин модифицирован ацилированием октановой кислотой по серину в положении 3 в SEQ ID NO: 1.
26. Способ по п.19, в котором mBI представляет собой сотрясение мозга.
27. Способ по п.19, в котором грелин вводится однократной дозой.
28. Способ по п.19, в котором грелин вводится в количестве, достаточном для обеспечения такого уровня грелина в крови, который по меньшей мере в 2-100 раз превышает уровень эндогенного грелина в крови у пациента.
29. Способ по п.28, в котором грелин вводится в таком количестве, которое приводит к уровню грелина в крови по меньшей мере в 55 пкг/мл.
30. Способ по п.28, в котором грелин вводится в дозе от 10 нг/кг в день до 10 мг/кг в день.
31. Способ по п.30, в котором грелин вводится в дозе 2 мкг/кг в день.
32. Способ по п.5 или 19, в котором грелин является единственным активным средством.
33. Способ лечения легкой травмы головного мозга (mBI) у пациента, включающий введение ему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей выделенный гре-

лин в количестве, достаточном для обеспечения такого уровня грелина в крови, который по меньшей мере в 1,5 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у пациента.

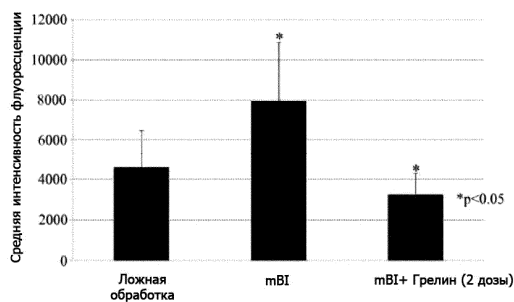
34. Способ по п.19 или 33, в котором выделенный грелин вводится в количестве, достаточном для обеспечения такого уровня грелина в крови, который по меньшей мере в 2 раза превышает уровень эндогенного грелина в крови у пациента.

35. Способ по п.5 или 19, в котором у пациента нет внутричерепной гипертензии, проницаемости сосудов гематоэнцефалического барьера, некроза тканей мозга, массивного повреждения тканей или клеток мозга в связи с травмой головного мозга, сильного воспаления нейронов или значительного клеточного или вазогенного отека в его голове либо связанных с травмой макроскопических анатомических изменений в его мозге.

36. Способ по п.5 или 19, в котором mBI связана с потерей когнитивных или двигательных навыков, метаболическими нарушениями, хронической травматической энцефалопатией (СТЕ), повреждением нервных связей, энцефалопатическими и психологическими изменениями или потерей сознания.



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2