

Invenția se referă la medicină și este destinată restabilirii metabolismului ideal al mamiferelor obeze, în special la oameni, sau profilaxiei obezității.

Obezitatea este o afecțiune cronică, care prevalează frecvent în societatea contemporană, fiind asociată nu numai cu stigmatele sociale, dar și cu scăderea duratei de viață și numeroase probleme medicale, inclusiv dezvoltarea psihologică nefavorabilă, dereglări reproductive, astfel ca afecțiunea polichistică a ovarelor, dereglări dermatologice, astfel ca infecțiile, varicoza venoasă, *acanthosis nigricans*, eczemă, intoleranță la sarcini fizice, diabet, rezistență la insulină, hipertensiune, hipercolesterolemie, litiază biliară, osteoartrită, traume ortopedice, boală tromboembolică, cancer, boală ischemică cardiacă.

Bolnavii de obezitate au tendința la un nivel scăzut al hormonului de creștere (GH) și nu sunt în stare să secrete o cantitate suficientă de GH ca răspuns la varietatea de stimulente, inclusiv la releasing-factorul hormonului somatotrop (GHRM). O astfel de secreție insuficientă este rezultatul unei dereglări hipotalamice, care conduce la o stare cronică de hipersecreție somatostatinică. Această deficiență de secreție de GH este în mai mare măsură o consecință decât un motiv al obezității, aceasta fiind reversibilă la reducerea greutateii.

Pe timp ce se presupunea că rezistența pacienților obezi la secreția GH este în legătură inversă cu inhibiția, ce are loc la nivelurile majorate ale factorului de creștere de tip insulenic (IGF-1) în plasmă, în realitate, însă, nu a fost găsită legătura între IGF-1 și indicii greutății excesive. Astfel, obezitatea nu este legată de scăderea nivelului IGF-1.

Unele afecțiuni, astfel ca diabetul, în special la maturi sau diabetul de tipul II, prevalează cel mai frecvent în obezitate. A fost demonstrat că nivelurile reduse ale IGF-1 în cadrul obezității țin de creșterea nivelurilor insulinei, care, la rândul său, țin de distribuirea grăsimii în organism și rezistența la insulină. Nivelurile cronice depresive ale IGF-1 pot provoca bioactivitatea IGF, precum și reglarea legăturii inverse a acestuia cu secreția GH, contribuind astfel consecințele metabolice și mitogenice ale obezității.

GH joacă un rol important în reglarea creșterii somatice și a metabolismului. Efectul metabolic al GH constă în efectele premature de tip insulenic, legate de creșterea utilizării glucozei și deplasării aminoacizilor și efectele de tip antiinsulenic, legate de stimularea lipolizei și reducerea utilizării glucozei.

Terapia contemporană a obezității include diete hipocalorice și exerciții, terapia farmaceutică bazată pe supresiunea poftelor de mâncare, administrarea preparatelor termogenice, preparatelor ce inhibă adsorbția hranei, aparate mecanice cum ar fi stimularea electrică a maxilarelor etc.

Este cunoscută metoda de tratament sau profilaxie a obezității, ce include diete deproteizate. Reducerea caloriilor în calitate de tratament a obezității condiționează catabolismul rezervelor de proteine în organism și bilanțul negativ al azotului. Din acest motiv dietele îmbogățite cu proteine au devenit populare în calitate de remedii pentru reducerea conținutului de azot la micșorarea consumului de calorii. Diferite moduri de tratament de acest fel includ și modul de tratament Weintraub, Bray [1].

Dezavantajul metodei constă în faptul că astfel de diete exclud numai o cantitate mică de azot și nu condiționează arderea accelerată a grăsimii în organism, ceea ce reduce eficacitatea metodei.

Este cunoscută metoda de tratament al obezității, ce include administrarea unei compoziții lipolitice, ce conține factor de creștere, astfel ca factorul de creștere al nervului, al epidermei și al fibroblastului [2].

Sunt cunoscute exemple de modele, care demonstrează că administrarea GH la indivizii ce suferă de obezitate poate stimula lipoliza, și care constau în localizarea hipofizectomizatului în mijlocul cavității abdominale. În aceste cazuri GH a prevenit și hiperfagia, și dezvoltarea obezității (York, Bray, *Endocrinology*, 90: 885-894 [1972]), și obezitatea genetică la șobolanii Zucker fa/fa, la care s-a redus depunerea grăsimii [3].

Este cunoscută metoda de administrare a GH prin injectare la pacienții obezi pe fond de dietă bogată în glucide. În acest caz conținutul grăsimii în organism s-a redus mai considerabil decât la injectarea unui vehicul (Snyder et al., *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 69: 745, 1989). A fost, de asemenea, evidențiat că GH exogen reduce conținutul grăsimii în organism și sporește masa de grăsime liberă la femeile în vârstă, care suferă de deficiență de secreție a GH endogen, și la maturii normosecretori fizic sănătoși. Aceste schimbări se petreceau fără o modificare în dietă sau activitate fizică. Însă nu a fost evidențiată o reducere a conținutului de grăsime în organism la administrarea GH maturilor bolnavi de obezitate în cazul alimentației cu restricții calorice. A fost demonstrat că GH exogen reduce conținutul de grăsime în organismul femeilor obeze în lipsa evidentă de reducere considerabilă a kilocaloriilor, influența cărora nu este legată cu eliminarea endogenă a GH sau constituția organismului [4].

Administrarea GH de trei ori pe săptămână a demonstrat reducerea unor manifestări de îmbătrânire, precum și reducerea masei țesutului [5].

Este cunoscută capacitatea IGF-1 de a reduce nivelul de glucoză în sânge la șoareci și oameni, care se utilizează în tratamentul diabetului și efectelor secundare ale hiperinsulinemiei, inclusiv la indivizii obezi (Froesch et al., *TEM*, May/June 1990, p.254-260; Guler et al., *N. Engl. J. Med.*, 317: 137-140, 1987; SA 4,988,675; Carlsson et al., *J. Endocrin.*, 122: 661-67, 1989; Zenobi et al., *J. Clin. Invest.*, 89: 1908-1913, 1992). În comparație cu GH, IGF-1 și insulina posedă un efect antilipolitic cunoscut (Zapt et al., *J. Clin. Invest.*, 77: 1768-1775, 1986; Guler et al., *N. Engl. J. Med.*, 317: 137-140, 1987; Zapt et al., *Eur. J. Biochem.*, 87: 285-296, 1978; Bolinder et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65: 732-737, 1987; Giacca et al., *Diabetes*, 39: 340-347, 1990). În afară de aceasta, s-a observat că șobolanii obezi Zucker sunt rezistenți la influența IGF-1 și a insulinei asupra metabolismului glucozei și aminoacizilor (Jacob et al., *Diabetes*, 41: 691-697, 1992).

Cel mai recent studiu al efectului IGF-1 asupra constituției fizice a fost realizat de Cottam et al. (Endocrinology, 130: 2924-2930, 1992), care au administrat IGF-1 uman recombinant (câte 150 mg/kg de trei ori pe zi în decurs de 8 săptămâni) unui berbec castrat, care se alimenta cu pastile și paie de lucernă tăiată mărunt. Tratamentul a provocat creșterea nivelului IGF-1 în plasmă, reducerea insulinei în plasmă, precum și creșterea greutateii tibiei, splinei și rinichilor. Dat fiind faptul că eficacitatea IGF-1 este evidentă, nu a fost depistată o influență deosebită asupra grăsimii în organism. Acești autori afirmă că rezultatele obținute coincid cu cercetările anterioare ale acestora (Siddiqui et al., J. Endocrinol., 124: 151-158, 1990), ce demonstau constituții fizice similare la șoareci cu aceeași greutate, selectați având concentrații înaltă și redusă ale IGF-1 în plasmă. A fost trasă concluzia că influența GH asupra reducerii conținutului de grăsime depinde nu numai de IGF-1 circulant [6].

În alte cercetări a fost creată o stare catabolică la șobolani prin inducerea diabetului, administrarea de dexametazonă sau rezecția intestinului, apoi animalele catabolizate au fost tratate cu IGF-1 sau analogii acestuia (Ballard et al., în Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors, ed. Spencer, p. 617-627, 1991). Autorii au relevat că IGFs au condiționat o tendință de scădere a conținutului procentual al grăsimii.

În cercetările de lungă durată (Guler et al., Acto Endo, 121 : 456-464, 1990) cu minipudeli s-au administrat în decurs de 130 zile câte 6 mg/zi de IGF-1 uman recombinant. Schimbări în creșterea acestora nu au avut loc, dar indicii de masă corporală a scăzut, ceea ce, după opinia autorilor, a fost determinat de IGF-1. Cu toate acestea, ei consideră că astfel de rezolvare este necesar să fie aplicată cu mare precauție și că acest IGF-1 uman recombinant poate schimba metabolismul glucidic și lipidic în comparație cu GH.

Tratamentul cu IGF-1 în doze, ce cauzau o creștere considerabilă a greutateii corpului și organelor, nu a influențat asupra structurii pielii sau a scheletului la șobolani cu hipofiza extirpată. În special, conținutul procentual al grăsimii nu s-a schimbat după tratamentul cu IGF-1 (Clark, Cronin, Abstract D8, 2nd International IGF Symposium, San Francisco, CA, 1991).

În optica generală recentă, care totalizează informațiile acumulate în prezent, privind influența insulinei și IGF-1 asupra diverselor țesuturi (Froeseh et al., TEM, 254-260, mai, iunie 1990), este stabilit și relevat pe pag. 256 că niște doze mici de IGF-1 pot să nu influențeze asupra lipolizei în țesuturi și acest fapt a fost observat la șobolani. Acestea, de asemenea, afirmă că IGF-1 administrat șobolanului *in vivo* manifestă o influență mai pronunțată asupra mușchiului decât asupra țesutului adipos (Zapt et al., J. Clin. Invest., 77: 1768, 1986). A fost stabilit că la oameni, comparativ cu insulina, potențialul hipoglicemic al IGF-1 este relativ mai mare decât cel antilipolitic (Guler et al., N. Engl. J. Med., 317: 147, 1987).

A fost, de asemenea, stabilit că deși șobolanii cu hipofiza extirpată, care au fost tratați cu insulină, au mărit consumul de hrană în mai mare măsură decât cei care nu au primit insulină (Salter et al., Can. J. Biochem. Physiol., 35: 913, 1957), hrana consumată de șobolanii pitici tineri neobezi nu a fost supusă influenței nici GH-ului, nici IGF-1 (Skotner et al., Endocrinology, 124: 2519-2526, 1989).

Informațiile demonstrează că majoritatea efectelor GH asupra rozătoarelor depinde de genul acestora. Animalele au fost tratate cu GH în diferite regimuri de doze. Infuzia continuă a GH a demonstrat o reducere a greutateii corporale la șobolanii genetic obezi Zucker-rat (Martin et al., April 1992, FASEB Meeting, Anaheim CA). În special, regimurile GH de două ori pe zi și zilnic, și o dată, de două ori și de trei ori pe săptămână, și regimurile "intermitente" au fost testate privind influența asupra creșterii organismului la copiii cu deficiență de GH. Rezultatele au demonstrat că administrarea frecventă a GH (zilnică) este regimul de preselectie (acesta, în timpul de față, este regimul fixat în clinică). Informațiile privind șobolanii indică, de asemenea, că administrarea frecventă a GH asigură în mai mare măsură creșterea oaselor și a greutateii, decât administrarea nefrecventă a GH, și că administrarea continuă a GH nu este atât de eficace, ca administrarea frecventă intermitentă a acestuia [7].

Dezavantajele metodelor menționate de tratament al obezității folosind GH constau în efectele secundare indesezirabile, de ex., hiperinsulinismul. În afară de aceasta, metodele indicate nu asigură reversibilitatea greutateii corporale la optim pentru individul concret și, totodată, nu asigură menținerea greutateii optime pentru o perioadă durabilă.

Ținând cont de faptul că în societatea contemporană există un număr mare de oameni, care suferă de obezitate și de consecințele serioase legate de aceasta, orice mijloace terapeutice potențial utile pentru reducerea greutateii persoanelor obeze trebuie să manifeste o influență profund benefică asupra sănătății acestora.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este crearea unei metodei noi de tratament și profilaxie a obezității și unui nou remediu, ce ar asigura:

- regimurile de tratament necesare pentru a reîntoarce greutatea corporală la indivizii obezi la normal sau la greutatea ideală a corpului fără efecte adverse semnificative;
- menținerea greutateii corporale reduse pentru o perioadă de timp durabilă;
- prevenirea obezității și în cazul, în care tratamentul este deja început, stoparea progresării sau prevenirea apariției afecțiunilor reprezentând consecința obezității sau fiind secundare referitor la obezitate, cum ar fi ateroscleroza și afecțiunea polichistică a ovarelor.

În prezenta invenție este propusă o metodă de tratament sau profilaxie a obezității la mamifere, care include administrarea unei cantități eficiente de hormon somatotrop în combinație cu o cantitate eficientă a factorului somatotrop de tip insulinic IGF-I. Optim GH se administrează în modul în care concentrația terapeutică eficientă se menține continuu în sângele mamiferului pe parcursul perioadei de administrare a acestuia. O astfel de administrare a

GH include utilizarea GH cu acțiune durabilă prin continuitatea prezenței GH în sânge sau prin eliberarea lentă a GH din locul injecției. O astfel de administrare neîntreruptă a GH, de asemenea, include administrarea prin infuzie continuă sau prin injecții mai frecvente decât o dată pe zi.

În varianta preferențială de administrare GH este legat covalent cu radicalii aminoacizilor, prin cel mult zece radicali, de preferință cu radicalii N-terminali de metionină sau lizină ai GH uman (hGH) cu substituiri sporite, care majorează durata de circulație a proteinei. Este de dorit ca aceste componente să fie legate la GH prin legătură amidă formată de la esterul sulfonic al 4-hidroxi-3-nitrobenzenului sau esterul N-hidroxisuccinimidic (NHS) al polietilenglicolului (PEG), al homopolimerului PEG monometil-substituit sau al acidului carboxilic polioxietilenglicerinic. Polimerul cel mai preferabil este PEG adăugat la cel mult 10 radicali, de preferință, 2 – 8 molecule de PEG la o moleculă de hGH.

Utilizarea GH în combinație cu IGF-I (infuziei IGF-I și infuziei GH sau injecției GH) a prezentat un rezultat surprinzător, demonstrând o acțiune lipolitică semnificativă. Deosebit de surprinzătoare s-a dovedit a fi acțiunea sinergică pronunțată a infuziei de GH și IGF-I în pierderea greutatei și a masei țesutului adipos, în care are loc inhibarea și/sau deprimarea totală a lipogenezei la mamiferele ce suferă de obezitate.

Tratamentul indivizilor obezi prin metoda propusă permite de a preveni sau de a împiedica progresarea unor astfel de consecințe ale obezității ca ateroscleroza, diabetul de tipul II, afecțiunea polichistică a ovarelor, bolile cardiovasculare, osteoartritele, bolile de piele, hipertensiunea, rezistența la insulină, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia și colelitiaza. În cazul polichistozei ovariene utilizarea metodei previne sau stopează progresarea acesteia astfel că pacienta nu mai este infertilă, iar în cazul diabetului (juvenil sau de tipul II) - mărește sensibilitatea bolnavului la insulină până la excluderea necesității în folosirea insulinei de către pacientul ce suferă de obezitate.

Combinația IGF-I și GH conduce la reducerea efectelor indesezabile secundare ale ambilor hormoni (de exemplu, hipoglicemie în cazul IGF-I și hiperinsulinismului în cazul GH) și la restabilirea nivelului GH în sânge, secreția cărui se deprimă de către IGF-1.

Tratamentul cu IGF-I și GH poate fi efectuat fără a folosi rația limitată de alimentare, astfel ca limitarea consumului zilnic al hranei sau al caloriilor, în mărimea în care este nevoie pentru pacientul dat.

În afară de aceasta, IGF-I și GH poate fi folosit, corespunzător, în combinație cu alte metode de tratament destinate luptei cu obezitatea sau profilaxiei acesteia.

Astfel, rezultatul invenției constă în efectele sinergice ale GH și IGF-1 de deprimare a lipogenezei și lipolitice, în reducerea efectelor secundare ale ambilor hormoni și în prevenirea dezvoltării afecțiunilor-consecință ale obezității, iar în cazul diabetului - în diminuarea necesității în insulină până la excluderea folosirii ei.

Descrierea succintă a desenelor

Figura 1: Creșterea greutatei corporale la o femeie tânără (de 6-9 săptămâni) de șobolan, neobeză, peste 8 zile după administrarea de excipient (dungii de culoare deschisă), injecții de GH o dată pe zi (linii diagonale late), injecții de GH de două ori pe zi (linii diagonale înguste), GH administrat prin minipompă (dungii de culoare închisă neîntrerupte). Toate figurile și textul reprezintă remedii cu devieri standard, semnificația statistică fiind descrisă în text.

Figura 2: Nivelurile serurilor IGF-1 peste 8 zile după tratamentul efectuat șobolanilor tratați cum este descris în fig.1.

Figura 3: Surplusul de greutate zilnic cumulativ la șobolanii, care posedă greutate sporită dw/dw după o perioadă de tratament de 14 zile. Prin cerculețe de culoare deschisă sunt desemnați excipienții, cu cerculețe de culoare închisă - hGH pompă, cu pătrate de culoare închisă - hGH câte 500 mg o dată pe zi, iar pătratele de culoare deschisă - hGH câte 250 mg de două ori pe zi.

Figura 4: Surplusul de greutate definitiv dw/dw al șobolanilor obezi după 14 zile de tratament, unde dungile de culoare deschisă reprezintă excipient, dungile de culoare închisă - hGH 500 mg prin pompă, dungile hașurate - hGH o dată pe zi, liniile diagonale - hGH 250 mg de două ori pe zi.

Figura 5: Greutatea grăsimii retroperitoneale după 14 zile de tratament al șobolanilor obezi dw/dw, unde dungile sunt similare celor descrise în fig.4.

Figura 6: Schimbarea greutatei corporale a femelelor dw/dw de șobolani după un tratament de 14 zile.

Grupele de șobolani au fost: grăsime/grăsime control (dungii de culoare deschisă), grăsime/grăsime injecția hGH (hașurate din stânga), grăsime/grăsime pompă cu hGH (de culoare închisă), grăsime/grăsime control (diagonale late), grăsime/grăsime injecții hGH (diagonale mijlocii), grăsime/grăsime hGH pompă (diagonale înguste) și grăsime/grăsime control (sectoare umbrite din dreapta).

Figura 7: Greutatea depozitării grăsimii retroperitoneale la șobolanii dw/dw după un tratament de 14 zile conform metodei descrise în fig.6.

Figura 8: Schimbările cumulative ale greutatei corporale la femelele obeze de șobolani dw/dw după un tratament de 14 zile. Grupele au fost controlate (pătrate de culoare deschisă), hGH a fost administrat zilnic (cercuri de culoare închisă), sau hGH au fost administrate prin minipompă (pătrate de culoare închisă).

Figura 9: Rația zilnică a femelelor obeze de șobolani dw/dw după un tratament de 14 zile conform metodei descrise în fig.8.

Figura 10: Greutatea depozitelor adipoase în grame ale femelelor obeze de șobolani dw/dw după un tratament de 14 zile.

Greutatea grupelor de control (dungii de culoare deschisă), hGH la administrarea zilnică a acestuia (linii diagonale) sau administrarea hGH prin minipompă (dungii de culoare închisă).

Figura 11: Este prezentată media creșterii greutateii cumulative la zece grupe de femele obeze de șobolani dw/dw după un tratament de 14 zile. Grupele au fost supuse, de la stânga spre dreapta: unui control al creșterii conținutului de grăsime (dungii de culoare deschisă), hGH 300 mg prin pompă (linii de culoare închisă), hGH 100 mg prin pompă (hașurare intermediară), hGH 300 mg injectare (linii diagonale înguste), hGH 100 mg injectare (linii orizontale), IGF-1 (hașurare de culoare închisă), hGH pompă/IGF-1 (dungă de culoare închisă), hGH injectare/IGF-1 (hașurare de culoare deschisă), PEG-GH (linii diagonale late) și control prin inaniție (hașurare de culoare foarte deschisă).

Figura 12: Schimbările totale ale greutateii de corp după un tratament de 14 zile la femelele obeze de șobolani dw/dw. Grupele au trecut: controlul (pătrate de culoare deschisă), IGF-1 (pătrate de culoare închisă), GH - injectare zilnică (cercuri de culoare deschisă), infuzie de GH (cercuri de culoare închisă), infuzie de GH plus IGF-1 (pătrate de culoare închisă).

Figura 13: Greutatea depozitării adipoase retroperitoneale după un tratament de 14 zile la zece grupe de femele obeze de șobolani dw/dw conform sistemului din fig.11.

Figura 14: Corelația depozitării adipoase retroperitoneale și abaterea greutateii de corp (X10) după un tratament de 14 zile la zece grupe de femele obeze de șobolani dw/dw conform sistemului din fig.11.

Figura 15: Greutatea depozitării adipoase gonadice după un tratament de 14 zile la 10 grupe de femele obeze de șobolani dw/dw conform sistemului din fig 11.

Figura 16: Nivelurile de insulină în ser după un tratament de 14 zile la 10 grupe de femele obeze de șobolani dw/dw conform sistemului din fig.11.

Figura 17: Nivelurile IGF-1 în ser după un tratament de 14 zile a 10 grupe de femele obeze de șobolani dw/dw conform sistemului din fig.11.

Figura 18: Nivelurile în ser (mg/dl) ale glucozei, colesterolului și ale trigliceridelor după un tratament de 14 zile la 10 grupe de femele obeze de șobolani dw/dw conform sistemului din fig.11.

Figura 19: Nivelurile în ser (mg/dl) ale nitrogenului de uree, calciu și fosfor după un tratament de 14 zile la 10 grupe de femele obeze de șobolani dw/dw conform sistemului din fig.11.

Figura 20: Influența IGF-1, GH și combinațiilor de GH și IGF-1 asupra masei adipoase, la administrarea subcutanată pacienților bolnavi de SIDA.

Dungile neîntrerupte de culoare închisă demonstrează placebo. Dungile cu fondul de culoare închisă și cu dungii albe (tăieturi) indică GH, dungile în buline indică IGF-1, iar dungile cu fondul alb, posedând tăieturi negre indică GH și IGF-1. Numărul de pacienți, care trec tratamentul în grupe sunt indicați cu litera N sub grafic, iar axa y indică modificările în masa adipoasă (kg) față de cea inițială.

Descrierea metodei preferabile de realizare

A. Definiții

Noțiunea “obezitate” se referă la condițiile în care mamiferul posedă indicele greutateii corporale (BMI), care se calculează ca raportul dintre greutate (kg) și statură (metri) cu coeficientul relativ 25.9. Convențional, indivizii cu greutatea normală posedă indicele (BMI) de la 19.9 până la 25.9.

Obezitatea poate fi cauzată de diverse pricini, fie genetice fie în funcție de condițiile ambianței. Exemple de dereglări, care pot rezulta în obezitate sau fi drept motiv al apariției acesteia, pot fi polifagia și bulimia, afecțiunea polichistică a ovarelor, sindromul Prader-Willi, sindromul Frohlich, diabetul de tipul II, deficiența de hormon somatotrop (GH), modificări de scurtă durată ale constituției corporale, sindromul Turner și alte situații patologice caracterizate prin reducerea activității metabolice sau a consumului energetic în raport procentual la masa adipoasă totală liberă, de exemplu la copii cu leucemie limfoblastică acută.

Noțiunea “tratament” se referă la reducerea la mamifer a BMI până la mai puțin de 25.9 și menținerea acestei greutateii în decurs de cel puțin 6 luni.

Tratamentul, în mod corespunzător, conduce la reducerea utilizării caloriilor de către mamifer.

Noțiunea “prevenire” se referă la prevenirea obezității, dacă tratamentul este efectuat până la începutul obezității. Afară de aceasta, dacă tratamentul începe să fie efectuat la indivizii deja suferinzi de obezitate, astfel de tratament se consideră ca tratament de prevenire a progresării complicațiilor medicale ale obezității cum ar fi, de exemplu, arterioscleroza, tipul II de diabet, disfuncție polichistică ovariană, dereglări cardiovasculare, osteoartrite, afecțiuni dermatologice, hipertensiunea, rezistența la insulină, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia și boală coleritiazică. Astfel, pe de o parte această invenție se referă la inhibiția și/sau deprimarea deplină a lipogenezei la mamiferele obeze, adică la acumularea excesivă a lipidelor în celulele adipoase, ceea ce reprezintă una din caracteristicile principale ale obezității la om și animal, precum și la reducerea greutateii corporale totale. Din altă parte, invenția ameliorează destituirea consecințelor afecțiunilor, adică previne sau stopează progresarea disfuncției polichistice ovariene, întrucât pacientul nu mai este steril, sporește sensibilitatea la insulină și/sau reduce sau destituie necesitatea de utilizare a insulinei la bolnavii de diabet, de exemplu, la pacientul matur suferind de diabetul de tipul II.

“Mamifere” - noțiunea include animalele având importanță economică, cum ar fi bovinele, ovinele, porcinele, în special, animalele crescute pentru obținerea cărnii, precum și animalele domestice, animalele pentru sport, animalele din grădinile zoologice, și oamenii, celor din urmă li se dă prioritate. Noțiunea “nematur” presupune mamiferele de la vârsta perinatală până la perioada de pubertate, ultimele fiind acelea, care nu au pierdut funcția de creștere. Oamenii obezi cu deficiență de GH sunt acei la care lipsește funcția GH, astfel ca oamenii cu hipopituitarism, precum și oamenii la care asistă deficiențe de GH receptori sau a proteinei ce leagă GH.

În textul prezent “GH” reprezintă hormonul somatotrop de orice fel, inclusiv de bovine, de oi, de porc, de cal și, preferențial, hormonul somatotrop uman în secvență nativă sau de la oricare sursă naturală, sintetică sau recombinantă. Preferențială pentru animale este forma de utilizare a GH de o specie de animal anumită pentru tratarea unei specii similare acesteia, cum ar fi GH de porc pentru tratarea porcilor, de oi - pentru tratarea oilor, de bovine - pentru tratarea bovinelor etc.

Preferențial pentru om este utilizarea GH matur uman în secvență nativă cu sau fără metionină în punctul N-terminal al acestuia.

Astfel, este preferabil hGH recombinant, adică obținut prin metodele tehnologiilor de recombinare a ADN. Mai preferabil este hormonul somatotrop de metionină al omului (met-hGH) obținut în *E.coli*, de exemplu, prin metoda descrisă în brevetul SU 4,755,465 și Goddel et al. Nature, 282 : 544 (1979). Met-hGH, care este comercializat cu marca de comerț Protropin de firma Genentech, Inc., este identic cu polipeptida naturală, excluzând prezența în acesta a radicalului de metionină N-terminală. Acest aminoacid adăugat reprezintă rezultatul procesului de sinteză a proteinei bacteriene.

Preferențial de asemenea este hGH recombinant util pentru examinări clinice și științifice, care este fabricat de firma Genentech, Inc., cu marca de comerț Nutropin®, comercial disponibil de la firma Eli Lilly. Acest hGH este lipsit de radicalul de metionină și are o succesiune de aminoacizi identică cu succesiunea hormonului natural, vezi Grau et al., Biotechnology, 2 : 161 (1984).

Ambii hormoni metionin-hGH și hGH posedă proprietăți și valoare farmaceutică echivalente (Moore et al., Endocrinology, 122: 2920-2926 (1988)). Un alt hGH asemănător este varianta hGH, care reprezintă o formă placentară a GH cu activitate somatogenă și lactogenă pură (SU 4,670,393). Sunt incluse de asemenea variantele GH, descrise în WO 90/04788 și WO 92/09690.

Conform utilizării în acest text, “IGF-1” se referă la factorul de creștere de tip insulinic a unor specii, inclusiv bovinele, oile, porcii, caii, păsările și preferențial omul, în secvență nativă sau în formă de variante, și din oricare sursă naturală, sintetică sau recombinantă. IGF-1 a fost extras din serul uman și preparat în mod recombinant (EP 123,228 și EP 128,733).

Preferențial pentru animale este tratamentul cu IGF-1 de specii particulare, astfel cu IGF-1 de porcine să fie tratați porcii, IGF-1 de ovine să fie tratate oile, IGF-1 de bovine să fie tratate vitele cornute etc. De preferință pentru om este utilizarea IGF-1 matur uman în secvență nativă, cel mai preferabil este fără metionina N-terminală (EP 230.869; EP 128,733; EP 288,451).

Cel mai preferabil este ca secvența nativă de IGF-1 să fie obținută recombinant, după cum este fabricat de Genentech, Inc., South San Francisco, CA pentru cercetări clinice. De asemenea preferențial pentru utilizare este IGF-1, care posedă o activitate specifică mai mare decât 14.000 unități/mg determinată prin cercetările radioreceptoare cu aplicarea membranelor placentare, astfel ca cele fabricate de Kabi Gen AB Stockholm, Suedia.

Formele preferabile de IGF-1 sunt formele, descrise în SU 5,077,276, în PCT WO 87/01038 și în PCT WO 89/05822, adică astfel de forme, în care lipsește cel puțin un radical al acidului glutamic în poziția 3 a punctului N-terminal al moleculei mature sau acelor, care au o omitere de până la 5 aminoacizi în N-terminal. Forma cea mai preferabilă este forma, în care sunt omiși primii trei radicali ai aminoacizilor în N-terminal (desemnate diferit ca IGF al creierului, t IGF-1, des (1-3) - IGF-1, sau des - IGF-1).

Avantajul administrării GH, care constă în aceea ca concentrația terapeutic eficientă a acestuia să se mențină constant în sângele mamiferului în decursul perioadei de administrare a acestuia, se referă la administrarea GH, în special la modul, formularea, regimul, forma, schema de aplicare sau alte metode, ceea ce conduce la obținerea unei concentrații terapeutice eficiente a GH în plasmă sau ser pe parcursul perioadei de administrare mamiferului a GH. Pe lângă această definiție, GH este prezent într-o concentrație suficientă și eficientă pentru tratarea obezității.

B. Metode de realizare a invenției

GH în combinație cu IGF-1 este introdus direct mamiferului aplicând oricare tehnologie aptă, inclusiv administrarea parenterală, intranasală, orală sau prin absorbție prin piele. Acestea nu cer administrarea prin metode identice și pot fi administrate local sau conform schemei.

Metoda specifică de administrare a fiecărui remediu va depinde, de exemplu, de fișa de observație clinică a pacientului, inclusiv orice efecte adverse sau de reducerea efectului anabolic la utilizarea hGH sau IGF-1.

Exemplele de administrare parenterală includ administrarea subcutanată, intramusculară, intravenoasă, intraarterială și intraperitoneală.

GH și IGF-1 sunt administrate astfel, ca să fie în cantități eficiente. GH poate fi administrat inconstant într-un timp stabilit (de exemplu o dată pe zi) în formă de injecție în doză stabilită, totodată, ca rezultat va crește concentrația GH

în plasmă în procesul administrării injecțiilor, iar apoi va avea loc reducerea concentrației GH în plasmă până la injecția ulterioară. Altă metodă de administrare periodică a GH este utilizarea unei diversități de dispozitive de implantare, care asigură cedarea continuă a ingredientelor active, cum ar fi ruperea inițială, iar apoi o perioadă de reținere înainte de cedarea ingredientului activ. Vezi, de exemplu, brevetul SU 4,767,628, col.2, pag.19-37.

Cu toate acestea metoda cea mai preferabilă este administrarea GH în așa mod, ca să fie asigurată prezența constantă a acestuia în sânge, menținută în procesul de administrare a GH. Aceasta se asigură cu mijloacele de infuzie continuă, de exemplu, prin minipompă osmotică. Alternativă reprezintă utilizarea injecțiilor GH frecvente (în special, mai mult de o singură dată pe zi, de exemplu, de 2-3 ori pe zi).

Altă metodă de realizare este administrarea formulărilor de GH de cedare durabilă, care reține eliminarea GH din sânge sau condiționează eliberarea lentă a GH, după injecție de ex.

Formularea GH de cedare durabilă, care reduce viteza de eliminare a GH din sânge poate fi în formă de GH complex sau covalent conjugat (prin legătura reversibilă sau ireversibilă) la o macromoleculă a uneia sau a câtorva proteine, care îl leagă (WO 92/08985) sau un polimer solubil în apă selectat din PEG și polipropilenglicol (POG) homopolimeri și polioxietilenpolioli, în special, cei solubili în apă la temperatura camerei.

Una din proteinele bine caracterizate ce leagă GH este proteina de legare a hormonului somatotrop cu o afinitate înaltă (GHBP), constituind regiunea extracelulară a receptorului GH, care circulă în sânge și acționează ca GHBP în specii anumite (Ymer and Herington, *Mol. Cell Endocrinol.*, 41 : 153 [1985]; Smith and Alamantes, *Endocrinology*, 123 : 1489 - 1494 - [1988]; Emtner și Roos, *Acta Endocrinologica (Copenh.)*, 122: 396-302 [1990]), inclusiv uman (Baumann et al., *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 134-141 (1986); EP 366,710 publicat la 9 May 1990; Herington et al., *J. Clin. Invest.*, 77: 1817-1823 (1986); Leung et al., *Nature*, 330: 537-543 (1987)). O a doua proteină liantă cu afinitate la GH mai redusă, care a fost de asemenea descrisă în literatură, pare a nu fi structural relatată la receptorul de GH (Baumann and Shaw, *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 680-686 (1990)).

În mod corespunzător, GH poate fi compus sau legat la un polimer pentru creșterea semiperioadei de circulație a acestuia. Exemple de polietilenpolioli și polioxietilenpolioli utile pentru astfel de scopuri, includ polioxietilenglicerolul, polietilenglicolul, polioxietilensorbitolul, polioxietilenglucoza sau similare acestora. Baza glicerolului, polioxietilenglicerolului este aceeași bază, care intră, de exemplu, în mono-, di- și trigliceridele animalelor și ale omului.

Polimerul nu este necesar să posedă o masă moleculară anumită, dar este preferențial ca masa moleculară să constituie 3500 și 100.000, cel mai preferențial - între 5000 și 40.000. Este de dorit ca homopolimerul PEG să fie nesubstituit, dar el poate fi și substituit la unul din capetele grupei alchilice. Este de dorit ca grupa alchilică să fie grupa C₁ - C₄ și cel mai preferențial - grupa metilică. Cel mai preferențial ca polimerul să fie homopolimerul PEG nesubstituit, homopolimerul PEG monometil-substituit (mPEG) sau polioxietilenglicerol (POG) cu masa moleculară 5000 - 40.000.

GH este covalent conjugat prin unul sau câțiva radicali ai aminoacidului GH cu grupa reactivă terminală a polimerului, în funcție de condițiile reacției, masa moleculară a polimerului etc. Polimerul cu grupa (grupele) reactivă este aici indicat ca un polimer activat. Grupa reactivă intră în reacție selectiv cu grupa amino liberă sau altă grupă reactivă a GH. Se cuvine însă de înțeles că tipul și numărul de grupe reactive, precum și genul polimerului, utilizate pentru obținerea unor rezultate optime vor depinde de genul GH pentru a evita faptul ca grupa reactivă a acestuia să intre în reacție cu o cantitate foarte mare de grupe active specifice ale GH. Dacă acest fapt nu poate fi evitat deplin, se recomandă să fie folosit de la 0,1 până la 1000 moli, preferabil 2 - 200 moli, de polimer activat pe 1 mol de proteină, în funcție de concentrația proteinei. Cantitatea definitivă a polimerului activat pe 1 mol de proteină este o balanță pentru menținerea activității optime și, după posibilitate, optimizând semiperioada de circulație a proteinei.

Deoarece în calitate de radicali pot fi orice aminoacizi reactivi cu proteină cum ar fi unul sau doi ai cisteinei sau grupa N-terminală a aminoacidului, de preferință este ca în calitate de aminoacid reactiv să fie lizina, care este legată cu grupa reactivă a polimerului activat prin aminogrupa epsilon liberă a acesteia, sau acizii glutaminic sau asparagic, care sunt legați cu polimerul prin intermediul amidei liante.

Reacția covalentă de modificare poate fi efectuată prin orice metodă general utilizată pentru introducerea în reacție a substanțelor biologice active cu polimeri inerti, preferențial la pH 5 - 9, cel mai preferențial pH 7 - 9, dacă grupele reactive în GH sunt grupele de lizină. Metoda, în special, include obținerea unui polimer activat (cel puțin cu o grupă hidroxilică terminală), obținând un strat activ al acestui polimer cu introducerea ulterioară în reacție cu stratul activ pentru obținerea GH cu formula respectivă. Reacția de modificare descrisă mai sus se poate efectua prin câteva metode, incluzând una sau câteva etape. Exemplele de modificare a agenților, care pot fi utilizați pentru obținerea polimerilor activați în reacția într-o etapă, includ cloridul acidului cianuric (2,4,6-triclor-5-tirozina) și fluoridul acidului cianuric.

În fond, reacția de modificare se realizează în două etape, în care polimerul este introdus în reacție la început cu anhidrida succinică sau glutarică pentru obținerea acidului carbonic, iar acidul carbonic este introdus apoi în reacție cu un compus capabil de a intra în reacție cu acidul carbonic pentru a forma un polimer activat cu o grupă reactivă de ester, care reacționează cu GH. Spre exemplu, astfel de compuși pot fi: N-hidrosuccinimida, 4-hidroxi-3-nitrobenzenul acidului sulfuric și alții similari acestora, de preferință, sunt folosite N-hidrosuccinimida sau 4-

hidroxi-3-nitrobenzenul acidului sulfuric. De exemplu, PEG monometil substituit poate intra în reacție la temperatură înaltă, preferențial 100 - 110°C, în decurs de 4 ore cu acidul glutaric.

Acidul monometil PEG - glutaric intră apoi în reacție cu N-hidroxisuccinimida în prezența unui reagent carboimidic de așa fel ca diciohexil sau izopropilcarboimidă pentru obținerea unui polimer activat de glutorat metoxipolietilenglicol-N-succinimidă, care poate apoi intra în reacție cu GH. Această metodă este descrisă detaliat în Abuchowski et al., *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984). În alt exemplu PEG monometil substituit poate intra în reacție cu anhidrida glutarică urmată de reacția cu 4-hidroxi-3-nitrobenzenul acidului sulfuric (HNSA) în prezența diciohexilcarboimidei pentru obținerea polimerului activat HNSA descris de Bhatnagar et al., *Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium*, Rich et al., (Pierce Chemical Co., Rockford IL, 1981), p. 97-100 și în Nitecki et al., *High-Technology Route to Virus Vaccines* (American Society for Microbiology: 1986) denumit "Agent nou pentru legarea peptidelor sintetice cu purtătorii și aplicarea acestuia".

Procedeele specifice de preparare a hGH conjugat cu PEG includ procedeele, descrise în brevetul SU 4,179,33,7 pentru PEG - hGH și în brevetul SU 4,935,465, care dezvăluie PEG, care se află în legătură covalentă inversă cu hGH. Alte procedee specifice de preparare a PEG - hGH includ următoarele.

Formarea PEG cu aldehida metoxipolietilenglicolului (Me - PEG aldehydă) prin alchilarea reducătoare și purificare. Aceasta se realizează prin adăugarea a 2 mg/ml de hGH în PBS cu pH 7.0, 5 mM de Me-PEG aldehydă - 5000 (masa moleculară 5000 daltoni) și 20 mM de NaCNBH₃, amestecând minuțios la temperatura camerei în decurs de 3 ore. Apoi se adaugă etanolamină până la 50 mM pentru aminarea reducătoare a Me - PEG restant, care nu a intrat în reacție. Amestecul se separă în coloana schimbătoare de anioni, FPLC Mono Q. Surplusul de PEG, care nu a intrat în reacție nu este legat în coloană și se poate elimina din ea. Se obțin două fracții de bază ale hGH saturate cu PEG cu masa moleculară de 30 K și 40 K pe SDS- PAGE contra 20 K hGH redus, care nu a intrat în reacție. Compusul complex hGH - hGH proteină liantă se tratează cu PEG în același mod pentru obținerea derivatului de 150 K prin filtrarea în gel. Tratarea PEG cu ajutorul N-hidroxisuccinimidei PEG (NHS - PEG) și purificarea este realizată prin adăugarea de NHS-PEG la surplusul molar de 5 - divizibil al concentrației totale a lizinei de hGH în soluție, conținând 2 mg/ml de hGH în 50mM de soluție-tampon de borat de sodiu cu pH 8.5 sau PBS cu pH 7, amestecând la temperatura camerei în decurs de o oră. Produsele se separă în coloana Superose 12 sau Mono Q FPLC. hGH tratat cu PEG variază în dimensiuni în funcție de pH-ul reacției aproximativ cu 300 Kd pentru reacția care se derulează la pH 8,5 și până la 40 Kd pentru reacția, care se derulează la pH 7,0, măsurate prin filtrarea în gel. Complexul hGH-hGH proteină liantă se tratează cu PEG, în mod similar, cu masa moleculară 400 - 600 Kd rezultată din filtrarea în gel.

Formarea mutanților cisteinei hGH cu PEG-maleimidă este realizată prin obținerea unui mutant hGH cisteinic cu ajutorul mutagenzei unidirecționale secretând acesta din tulpina *E.coli* 16C9 (W3110 delta tonA phoA delta E15 delta (argF-lac) de C2), care nu produce deo C proteină și descris în brevetul SU 07,224,520, solicitat la 26 iulie 1988 (în timpul de față anulat) și purificarea acestuia în coloana schimbătoare de anioni. Maleimida PEG se obține prin introducerea în reacție a monometoxiPEG aminei cu sulfo-MBs în 0,1 M fosfat de sodiu cu pH 7.5 în decurs de o oră la temperatura camerei și înlocuind tamponul cu cel fosfatic cu pH 6.2. Apoi hGH se amestecă cu extracisteină liberă în decurs de o oră și produsul terminal este separat în coloana Mono Q ca și în Me-PEG aldehydă hGH tratată cu PEG.

Deoarece legăturile eterice sunt chimic și fiziologic labile, ar fi preferabil de utilizat reagentul PEG într-o reacție conjugată, care nu conține o dependență funcțională de eter. De exemplu, legarea carbamată poate fi obținută prin introducerea în reacție a eterului de monometil PEG cu fosgen pentru obținerea clorformatului PEG. Acest reagent poate fi apoi utilizat în același mod ca și eterul NHS pentru a pune în acțiune ramificarea aminelor catenei laterale de lizină. În alt exemplu compusul carbamidic este obținut prin introducerea eterului amino-PEG-monolital cu fosgenul. În consecință se obține PEG-izocianat, care poate intra în reacție cu aminele lizince.

Procedeele preferabile de preparare a PEG-hGH, care nu conține un eter ușor scindabil în reagentul PEG, este descris în felul următor.

Metoxipoli (etilenglicol) se transformă în acid carbonic prin titrare cu naftalena de sodiu pentru formarea alcoolatului cu tratarea ulterioară cu brometilacetat pentru obținerea eterului etilic, cu hidroliza ulterioară a acidului carbonic respectiv prin tratarea cu hidroxidul de sodiu și apă așa cum relevă Bückmann et al., *Macromol. Chem.*, 182: 1379-1384 (1981). Acidul carbonic obținut este transformat apoi în eterul PEG-N-hidroxisuccinimidului util pentru acilarea hGH cu ajutorul reacției acidului carbonic obținut cu diciohexilcarbondimida și NHS în etilacetat. Reagentul NHS-PEG obținut este introdus în reacție cu 12 mg/ml GH, utilizând surplusul molar de GH de 30 de ori în soluția-tampon de borat de sodiu la temperatura camerei în decurs de o oră și se aplică în coloana Q Sepharose în soluția Tris tampon și se spală cu gradient salin. Apoi acesta se aplică în altă coloană (fenil Toyoperl) echilibrată în soluția-tampon 0,3 M de citrat de sodiu cu pH 7.8. hGH tratat cu Peg se spală cu un component salin reversiv, se sedimentează folosind G25 în manitol, glicină și soluție-tampon de fosfat de sodiu cu pH 7.4 pentru obținerea PEG-hGH respectiv. Moleculele hGH, tratate cu PEG și complexul hGH-hGH proteină liantă pot fi caracterizate prin SDS-PAGE, gel-filtrare, NMR, tryptic mapping, cromatografie lichidă - spectrofotometrie de masă și prin testarea biologică *in vitro*. Gradul de tratare cu PEG este prezentat de la început cu SDS - PAGE și gel-filtrare, apoi a fost analizat cu ajutorul NMR, care posedă vârful specific de rezistență pentru metilendihidrogenul PEG. Numărul de grupe

PEG în fiecare moleculă poate fi calculat cu ajutorul spectrului NMR sau prin spectrometrie de masă. Electroforeza cu gel de poliacrilamidă în 10% SDS în mod corespunzător trece în 1 OmM Tris - HCl pH 8.0, 100 mM NaCl în calitate de soluție-tampon de spălare. Pentru a demonstra, care din radicali este tratat cu PEG se poate efectua tryptic mapping.

Astfel, hGH tratat cu PEG se asimilează de tripsină în proporția proteină/enzimă 100 : 1 în mg la temperatura de 37°C în decurs de 4 ore în 100 mM de acetat de sodiu, 10 mM Tris-HCl, 1mM clorid de calciu, pH 8.3 și se oxidează până la pH<4 pentru stoparea asimilării până la separarea în HPLC Nucleosil C-18 (4,6 mm x 150 mm, 5μ, 100Å). Cromatograma se compară cu materialul inițial netratat cu PEG.

Fiecare vârf poate fi apoi analizat cu ajutorul spectrometriei de masă pentru verificarea dimensiunii fragmentului, care corespunde vârfului. Fragmentul (fragmentele), care conțin grupele PEG, de obicei, nu se rețin pe coloana HPLC după injecție și dispar din cromatograf. O astfel de dispariție din cromatograf indică tratarea cu PEG a acestui fragment special, care trebuie să conțină cel puțin un radical de lizină. hGH tratat cu PEG poate fi apoi examinat în vederea capacității de a se uni cu proteinele ce leagă hGH (hGHBP) prin metodele obișnuite.

Diverse metode de tratare cu PEG au produs diverse forme haotice de hGH cu masa moleculară evidentă de 35 Kd, 51 Kd, 250Kd și 300Kd în dimensiuni exclusiv cromatografice, care este necesar să fie foarte apropiate de dimensiunile hidrodinamice proprii ale acestora. Acestea au fost desemnate PEG-1-hGH, PEG2-hGH, PEG3-hGH și PEG7-hGH, respectiv. Privind rezultatele tryptic mapping PEG1-hGH și PEG2-hGH aveau fragmentul 9-aminoacid N-terminal, absent în cromatogramă și posibil tratat cu PEG, care au putut fi confirmate prin spectrometria de masă a speciilor înalt moleculare, care au fost descoperite în fluxul avansat în cromatograf. Din masa moleculară determinată la SDS-PAGE, PEG1-hGH poate avea un PEG într-o amină N-terminală, iar PEG2-hGH are 2 molecule PEG în amina N-terminală, formând o amidă terțiară. PEG3-hGH are mai mult de 5 grupe de PEG pe o moleculă conform rezultatelor NMR, iar conform rezultatelor tryptic mapping lipsesc cel puțin cinci fragmente de peptidă, presupunând, că acestea sunt tratate cu PEG. Este de așteptat că molecula PEG7-hGH va avea 6-7 grupe de PEG pe o moleculă obținută prin spectrometrie de masă.

Sectoarele pentru adăugarea grupelor PEG la hGH și sectoarele care au preferat radicali pentru o astfel de conjugare reprezintă metionina N-terminală sau fenilalanina, lizina 38, lizina 41, lizina 70, lizina 140, lizina 158 și lizina 168. Două lizine, care se consideră că nu au fost tratate cu PEG sunt lizina 115 și lizina 172.

GH este administrat prin sisteme de cedare durabilă. Exemplele de cedare durabilă reprezintă matricele polimere semipermeabile în formă de articole profilate, de exemplu, filme (pelicule) sau microcapsule. Matricele de cedare durabilă includ polilactide (SU 3,773,919; EP 58,481), copolimerii acidului L-glutaminic și gama-etil-1-glutamat (Sidman et al., *Biopolymers*, 22, 547-556 [1983]), poli(2-hidroxiethylmetacrilat) (Langer et al., *J.Biomed. Mater. Res.*, 15 : 167-227 [1981], și Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 [1982]), etilvinilacetat (Langer et al.,) sau acid poli-D-(-)-3-hidroxi-butiric (EP 133,988), sau PLGA microsferelor. Compozițiile GH de cedare durabilă includ de asemenea GH antrenate liposomic. Liposomele conținând GH sunt preparate prin metodele cunoscute din DE 3,218,121; Epstein et al., *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; JP 83-118008; SU 4,485,045 și SU 4,544,545; EP 102,324. De obicei liposomele posedă dimensiuni mici de tip unilamelar (circa 200 - 800 angstromi), în care conținutul lipidic este mai mare de 30 procente moleculare de colesterol, proporția selectată pentru terapia optimă. Suplimentar formularea biologic activă de cedare durabilă poate fi obținută din aductul GH legat covalent cu polizaharida activată cum este descris în SU 4,857,505. Afară de aceasta în SU 4,837,381 este descrisă compoziția microsferelor de grăsime sau ceară, sau a amestecului acestora și GH pentru eliminare lentă.

IGF-1 poate fi administrat prin diferite mijloace, inclusiv injecții (singulare sau multiple, de exemplu, 1-4 pe zi) sau infuzii îndelungate. Ca și GH, IGF-1 se poate formula în așa mod, ca să asiste în sânge în procesul tratamentului cum este prescris și pentru GH. Așadar, acesta de asemenea poate fi atașat covalent la un polimer sau poate fi executat într-o formulare de cedare durabilă cum este descris mai sus.

Afară de aceasta, IGF-1 corespunzător este administrat împreună cu una sau mai multe proteine care îl leagă, de exemplu, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 sau IGFBP-6 cunoscute curent. IGF-1 poate fi de asemenea legat pentru administrare cu receptorul sau cu un anticorp, sau cu un fragment de anticorp. Proteina mai preferențială pentru IGF-1 este IGFBP-3, după cum este descris în WO 89/09268 publicat la 5.10.1989 și Martin and Baxter, *J.Biol.Chem.*, 261: 8754-8760 (1986). Această IGFBP-3-proteină tratată cu glicol reprezintă un component rezistent la acizi cu 53 Kd în SDS-PAGE gel inoxidabil al complexului glicoproteic 125 - 150 Kd, depistat în plasma omului, conținând cea mai mare cantitate de IGF endogene și care de asemenea este reglat de GH.

Administrarea proteinei ce leagă IGF în cumul cu IGF-1 poate fi realizată prin mijlocul descris în SU 5,187,151. Pe scurt, IGF-1 și IGFBP au fost administrate în cantități necesare subcutant în raportul molar 0,5 : 1 până la 3 : 1, de preferință 1 : 1.

Este de dorit să fie realizată administrarea IGF-1 și GH prin infuzie continuă, de exemplu, intravenoasă sau subcutanată. Mai preferabilă este administrarea subcutanată a ambelor remedii: IGF-1 și GH. GH în combinație cu IGF-1 pentru scopuri terapeutice se formulează și se dozează conform unei practici medicale bune, având în vedere condițiile chimice și particularitățile individuale ale pacienților (în special efectele secundare ale tratamentului cu GH sau IGF-1 sau reținerea creșterii după un tratament continuu cu GH), locul furnizării compoziției (lor) de GH sau IGF-1, metoda de administrare, schema de administrare și alți factori cunoscuți de medicii practicieni. "Cantitatea

eficientă“ a fiecărui component pentru aceste scopuri se determină, însă, din astfel de considerente și în astfel de cantități, care reduc gradul de obezitate a subiectului depășind gradul de obezitate deja redus, care a fost atins prin utilizarea aceleiași cantități de IGF-1 sau GH administrate individual sau previne obezitatea sau condițiile care țin de obezitatea apărută prima dată. În general cantitatea totală farmaceutic eficientă a fiecărei doze IGF-1 și GH administrate parenteral constituie circa de la 1 mg/kg/zi până la 10 mg/kg/zi de greutate a pacientului, adică este necesar să fie subiectul de cercetare al medicului terapeut. Mai preferabil această doză este necesar să constituie 0,01 mg/kg/zi și cel mai preferabil pentru oameni circa 0,01 și 1 mg/kg/zi pentru fiecare hormon. La administrarea constantă IGF-1 și GH este fiecare administrat în doze de la 1 mg/kg/oră până la 50 μg/kg/oră, sau prin 1-4 injecții pe zi sau prin administrare subcutanată continuă, de exemplu, folosind minipompa. Se pot folosi de asemenea și infuzii intravenoase. Factorul principal pentru selectarea unei doze corespunzătoare este rezultatul obținut la reducerea greutateii corporale sau raportul dintre grăsime și masa slabă sau alte criterii pentru controlul prin măsurări, sau prevenirea obezității ori prevenirea condițiilor care țin de obezitate, cum va considera medicul practician.

Este relevant că medicii practicieni divizând dozele de IGF-1 și GH trebuie să țină cont de efectele secundare cunoscute la tratamentul cu acești hormoni.

Pentru hGH efectele secundare sunt reținerea sodiului și creșterea volumului extracelular (Ikkos et al., Acta Endocrinol. (Copenhagen), 32: 341-361 [1959]; Biglier et al., J.Clin.Endocrinol. Metab., 21: 361-370 [1961]; precum și hiperinsulinemia și hiperglicemia. Efectul secundar de bază al IGF-1 este hipoglicemia (Guler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2868-2872 (1989)). Combinația IGF-1 și GH poate conduce la reducerea efectelor indesezirabile ale ambilor hormoni (de exemplu hipoglicemia la IGF-1 și hiperinsulinemia la GH), și la restaurarea nivelului GH în sânge, secreția căruia se suprimă de IGF-1.

Pentru administrarea parenterală a unui amestec de IGF-1 și GH, fiecare din aceștea se malaxează la un grad de puritate dezirabil într-o dozare unică în formă injectabilă (soluție, suspensie sau emulsie) cu ingrediente farmaceutic acceptabile, în particular, cu cele care nu sunt toxice pentru recipient în dozarea și concentrația compatibile cu alte componente ale formulării preparate. De exemplu, este preferabil, ca formulările să nu conțină oxidanți și alte componente cunoscute ca deterioranți ai polipeptidelor.

În general formulările sunt preparate prin contactul uniform și intim al IGF-1 și GH fiecare cu vehicule lichide sau vehicule solide mărunțite sau cu ambele. Apoi, la necesitate, produsul se modelează într-o formulare dorită. Preferabil, vehiculul este vehicul parenteral, cel mai preferabil - o soluție izotonică cu sângele recipientului. Exemple de astfel de vehicule includ apa, soluții saline, soluția Ringer și soluția dextrozei. Substanțe anhidre cum ar fi uleiurile fixate și etiloleatul de asemenea sunt utilizate în aceste scopuri, ca și liposomele.

Vehiculul conține o cantitate minoră de suplimente cum ar fi substanțele care ameliorează stabilitatea izotonică și chimică. Astfel de substanțe sunt netoxice pentru recipient în dozele și concentrațiile aplicabile și conțin tamponane cum ar fi fosfatul, citratul, acidul acetic și alți acizi organici sau sărurile acestora; antioxidanți așa ca acidul ascorbic, polipeptide cu masa moleculară redusă (mai puțin de zece radicali), de exemplu, poliarginina sau tripeptidele, proteine cum ar fi albumina, gelatina sau imunoglobulinele serice; polimerii hidrofilii cum ar fi polivinilpirolidona; aminoacizi cum ar fi acidul L-aminoacetic, acidul glutamic, acizii aminosuccinic sau aminovalerianic; monozaharide, dizaharide, carbohidrați, inclusiv celuloza sau derivații acesteia, glucoza, manoza sau dextrinele; agenți chelați cum ar fi EDTA; alcoolizaharați cum ar fi monitolul sau sorbitolul; contraioni cum ar fi sodiul; și/sau substanțe neionice tensioactive cum ar fi polisorbitații, poloxamerii sau PEG.

În astfel de lianți IGF-1 și GH se formulează fiecare individual la concentrațiile de circa 0,1mg/ml până la 100 mg/ml, preferabil 1-10 mg/ml la pH circa 4,5 până la 8. IGF-1 scurtat de obicei este stabil la pH de la 3,2 până la 5; hGH este stabil la un pH mai crescut, de exemplu 7,4 - 7,8. Se înțelege că în tehnologia de preparare a sărurilor IGF-1 sau GH este necesară utilizarea unor excipienți citați anterior, vehiculelor sau stabilizatorilor.

Afară de aceasta, IGF-1 și GH, preferabil IGF-1 scurtat, se pot formula cu un vehicul convenit pentru formarea unei compoziții farmaceutice, care preferabil nu conține celule. În compoziția unificată tipul tamponului utilizat pentru formulare va depinde de utilizarea imediată a compoziției după malaxare sau păstrarea acesteia pentru a fi utilizată mai târziu. La utilizarea compoziției imediat după malaxare amestecul din IGF-1 scurtat și GH poate fi obținut în manitol, glicină și fosfat, pH 7,4. Dacă amestecul este necesar să fie păstrat, atunci se prepară într-un tampon la pH circa 6, cum ar fi citratul, cu suplimente tensioactive care sporesc solubilitatea GH la astfel de pH, cum ar fi 0,1% polisorbitat 20 sau poloxamer 188. În final se poate prepara o soluție lichidă stabilă sau o compoziție liofilizată solidă. IGF-1 și GH utilizați pentru scopuri terapeutice este necesar să fie sterile. Sterilizarea se realizează prin intermediul filtrării printr-un filtru membranic steril (de exemplu, cu membrane de 0,2 μ). Compozițiile terapeutice de IGF-1 și GH sunt amplasate, în special, într-un container dotat cu un orificiu de acces steril, de exemplu, cutie sau veziculă pentru soluția intravenoasă, dotată cu dop care poate fi străpuns de un ac hipodermic pentru injecții.

IGF și GH, de obicei, este necesar să fie păstrate în containere de doză unică sau multidoze, de exemplu, în fiole sigilate ermetic sau vezicule în formă de soluție apoasă sau în formă liofilizată pentru reconstituire. În calitate de exemplu a unei forme liofilizate este vezicula cu un volum de 10 ml umplută cu 5 ml de soluție apoasă sterilă filtrată de 1% (w/v) de IGF-1 și GH, soluția obținută fiind liofilizată.

Soluția pentru infuzii se prepară prin diluarea IGF-1 și GH liofilizați cu utilizarea apei pentru injecții bacteriostatice.

Afară de aceasta GH și IGF-1 se administrează în combinație cu alte forme de tratament pentru combaterea sau prevenirea obezității. Substanțele utilizate în aceste scopuri includ, de exemplu, hormoni (cateholamine, glucagon,

ACTH); clofibrat; halogenat; cinhocaine; clorpromazine; medicamente, care inhibă apetitul, acționează asupra neurotransmișilor noradrenergice cum ar fi mazindolul și derivații fenetilaminei, de exemplu fenilpropanolamina, dietilpropionul, fendimetrazina, benzfetamina, amfetamina, metamfetamina și fenmetrazina; medicamente, care acționează asupra neurotransmișilor serotoninei, cum ar fi fenfluramina, triptofanul, fluoxetina și sertralina; medicamente, care acționează asupra sistemului central nervos cum ar fi nalaxon, neuropeptida-Y, galanina, corticotropina-releasing hormonul, colecistochinina; antagonist colinergic cum ar fi piridostigmina; sfginalipide cum ar fi lizosfingolipida sau derivații acestora (EP 321,287 publicat la 21 iunie 1989); medicamente termogenice cum ar fi hormonul tiroid, efedrina; antagoniști β -adrenergici; tablete, care acționează asupra tractului gastrointestinal cum ar fi enzimo inhibitori, de exemplu, tetrahidrolipostatina, hrana indigestibilă cum ar fi poliesterul zaharozei, inhibitorii stazei gastrice cum ar fi acidul treo-clorocitric sau derivații acestuia, antagoniști β -adrenergici cum ar fi izoproterenol și iohimbine; aminofilina pentru sporirea efectului similar efectului iohimbinei β -adrenenergetic; remediu medicamentos de blocare α_2 -adrenenergetic ca clopidin independent sau în combinație cu o peptidă, care blochează hormonul somatotrop (SU 5,120,713); medicamente, care servesc drept obstacol pentru absorbția intestinală cum ar fi biguanide, metformina și fenformina; ingrediente volumetrice cum ar fi metilceluloza; blocatori metabolici ca hidroxicitratul, progesteronul, colecistochinin-antagoniști; molecule mici ca chetoacizii mimici; antagoniștii corticotropin-releasing hormonului; compoziție ergoligantă prolactin-inhibitoare (SU 4,783,469); antagoniști beta-3; bromcriptin; antagoniștii peptidelor opioide; antagoniștii neuropeptidei Y; antagoniștii receptorilor glucocorticoizi; antagoniștii hormonului somatotrop; combinațiile acestora etc. Aceștea includ toate medicamentele descrise de Bray and Greenway, Clinics in Endocrinol. and Metabol., 5: 455 (1976).

Aceste remedii suplimentare pot fi administrate concomitent, până sau după administrarea GH și IGF-1 și prin aceleași metode sau diferite decât GH și IGF-1.

Invenția va fi mai accesibilă după cercetarea exemplurilor ulterioare. Însă acestea nu limitează cadrul invenției. Toată literatura și brevetele la care sunt date referiri, sunt indicate cu exactitate.

EXEMPLUL 1

Dezvoltarea unui nou model de animal de obezitate indusă în mod artificial și studierea particularităților de administrare a GH pentru reducerea greutateii depozitărilor lipolitice

Introducere

Obiectul de studiere reprezintă dezvoltarea unui nou model de animal cu obezitatea indusă artificial pe cale dietetică și compararea efectului diferitor modele de GH administrat în organism, în special în depozitățile lipolitice. Studierea recentă a datelor (Jorgenson, supra, p.190) demonstrează că injecțiile de GH pot conduce la reducerea depozităților lipolitice în întregul organism. Însă acestea nu au fost experiențe sistematice (similar studierii, privind optimizarea efectului GH în activizarea creșterii) privind definitivarea regimurilor optime de dozare pentru acționarea GH asupra metabolismului lipidic. Șobolanul pitic (dw/dw) reprezintă o rasă mutantă de șobolan recent depistată, care posedă o lipsă izolată a GH hipofizar, alte elemente ale hormonilor hipofizari fiind absolut normale (Charlton et al., J.Endocr., 119: 51-58 (1988); Skottner et al., Endocrinology, 124: 2519-2526 (1989)).

Interesul inițial a fost depistarea obezității, care ține de administrarea insulinei și/sau IGF-1 rezistent. Șobolanul obezar fi putut și în continuare să servească în calitate de model pentru bolile omului, în special pentru diabetul de tipul II, care ține de insulină și obezitate. Șobolanul pitic (dw/dw) a fost selectat datorită lipsei congenitale de GH și din cauză că deficitul de GH ține de adipozitate cum la animal așa și la om. Șobolanul dw/dw nu se îngrașă similar modelelor clasice ale șoarecilor îngrășați ob/ob (Mayer et al., Endocrinology, 52: 54-61 (1953)). Șobolanii dw/dw posedă GH redus în sânge și din această cauză acesta reprezintă un model bun de animal pentru studierea efectului GH și IGF-1 (Skottner et al., 1989).

Femelele șobolanilor au fost selectate pentru că acestea conțin un procent mai mare de grăsime și sunt mai dispuse la obezitate decât masculii (Schemmel et al., Anat.Rec., 166: 437-446 (1969)). Dieta tradițională utilizată de obicei pentru hrănirea animalelor de laborator, este bazată pe grăunțe și are un conținut redus de grăsimi (aproximativ 5% grăsimi din greutate). Hrana mai grasă (și de aceea mai des folosită în dieta oamenilor din vest) a fost aleasă pentru dezvoltarea obezității experimentale la șobolanii dw/dw.

Problemele experiențelor prezente sunt următoarele:

- 1) Tentativa de a induce obezitate șobolanilor dw/dw sau șobolanilor obișnuiți prin dietă.
- 2) A testa rezistența la insulină la animalele obeze.
- 3) A testa eficacitatea GH în reducerea depozităților lipidice la animalele obeze.
- 4) A testa posologia administrării GH pentru reducerea depozităților lipidice la animalele obeze.
- 5) A testa efectul dietei (returnarea de la dieta bogată în grăsimi la dieta săracă în grăsimi) în combinație cu diferite modele de administrare a GH, în particular, de a testa eficacitatea GH în procesul de reducere a greutateii pe fond de dietă.

Experiențele I și II

Metode și rezultate

Experiența I a comparat efectul unei diete hipercalorice asupra greutateii șobolanilor pitici cu deficiență de GH și la șobolanii normali (GH suficient), experiența confirmând efectul dietei asupra greutateii corporale și obezității la

șobolanii dw/dw. Gradul de obezitate se determina prin masa depozitărilor adipoase selectate și bine definite, în prezența rezistenței la insulină.

Experiența I

În prima experiență au fost utilizate niște femele de șobolani, 12 șobolani pitici (dw/dw, laboratorul Simonsen, Gilroy CA) și 12 șobolanii Splagul-Dawely (SD, Chale River, Portage). Șobolanii pitici au fost selectați după greutate (100-140 g) având vârsta de 120 zile. Șobolanii SD au fost selectați corespunzător celor pitici, cu greutatea de 100-140 g și vârsta de 40 zile. Șobolanii au fost împărțiți în 4 grupe câte 6 și cântăriți pentru prevenirea inegalității în greutatea primară. Câte o grupă din fiecare specie primea hrana *ad libitum* în decurs de 29 zile în formă de pilule obișnuite de laborator (4,5% de greutate și 9,6% calorii). Două alte grupe au primit într-o cantitate nelimitată hrană cu un conținut sporit de grăsimi (36,3% de greutate și 36,2%, calorii) de asemenea în decurs de 29 zile. Hrana cu un conținut sporit de grăsimi se prepara prin malaxarea unei părți de grăsimi vegetale și două părți de componente de bază, care îi atribuie o consistență de pastă omogenă.

Șobolanii se cântăreau de 5 ori pe săptămână. În timpul experienței I ambele specii de șobolani au demonstrat o creștere substanțială în greutate. Ambele grupe de șobolani SD sporeau greutatea în decursul cercetărilor. Însă a fost surprinzător că nu s-a observat diferență statistică în greutatea finală la șobolanii SD care au primit hrană grasă și șobolanii care au primit grăunțe (care au primit grăsimi $102,6 \pm 20,2$ g, grăunțe $108,1 \pm 18,3$ g, $t=0,83$, experiența Duncan Multiple Range; valoarea critică 2,90). Deoarece șobolanii SD n-au atins vârsta lor adultă până la începutul experienței, sporirea mare a greutății a fost rezultatul creșterii normale și nu a acumulării țesuturilor adipoase.

Ambele grupe de șobolani pitici de asemenea măreau greutatea sa în procesul studierii, iar, spre deosebire de șobolanii SD, la aceștea a fost o diferență clară și consistentă între grupele care au primit hrană grasă și grăunțe. Această diferență a devenit clară din prima zi de primire a hranei (cei care au primit hrană grasă $3,2 \pm 1,7$ g, grăunțe $1,0 + 3,3$ g, $t = 4,42$ experiență Duncan Multiple Range; valoarea critică 2,90), rămănea prezentă după 15 zile (cei care au primit hrană grasă $23,3 + 12,5$ g, grăunțe $10,4 + 5,3$ g, $t = 4,12$, experiența Duncan Multiple Range, valoarea critică 2,90) și în ziua a 29-a la finele experienței (cei care au primit hrană grasă $37,0 + 18,7$ g, grăunțe $13,3 + 6,4$ g, $t = 3,7$ experiența Duncan Multiple Range; valoarea critică 2,9). Deoarece greutatea șobolanilor pitici a încetat să crească la începutul experienței, adăugarea greutății, probabil, a fost pe baza acumulării țesuturilor adipoase.

Experiența II

În experiența II au fost 4 grupe câte 6 șobolani pitici pentru repetarea și confirmarea rezultatelor obținute anterior și măsurarea sensibilității la insulină și masa adipoasă. Șobolanii care au primit hrană grasă imediat și-au majorat greutatea. Peste 28 de zile acești șobolani au devenit substanțial ($p < 0,001$) mai grei ($155,7 + 6,2$ g) decât șobolanii care au primit grăunțe ($128,4 + 11,5$ g). Peste 7 zile de diferită dietă șobolanii au fost supuși analizei insulinice, cu utilizarea injecțiilor intravenoase de insulină (0,4 u/kg). În acest timp nu s-a semnalat diferență între reacțiile glucozei în sânge la ambele grupe. Ambelor grupe de șobolani obezi și neobezi li s-au făcut injecții i.v. de insulină (0,4 u/kg) peste 28 zile pentru efectuarea experienței. Sângele până la și după injecții a fost supus analizei la conținutul glucozei. Conținutul glucozei în sângele șobolanilor care au primit grăunțe s-a redus considerabil după injecțiile de insulină în comparație cu nivelul inițial $162,7 + 22$ mg % până la $94,0 + 25,0$ mg% sau cu 56,9% peste 20 min. Reducerea maximă a glucozei în sânge a fost peste 20 min, nivelul acesteia a început să crească peste 20 min. Animalele care primeau hrană grasă au fost rezistente la această doză de insulină. La acestea concentrația de glucoză în sânge s-a redus numai până la $89,4 + 2\%$ de la concentrația inițială ($210 + 23$ mg%) la reducerea maximă peste 20 min. Aceste reacții la insulină au fost diferite între grupe, demonstrând că rezistența evidentă la insulină a fost indusă șobolanilor care au primit hrană în a 28-a zi, dar nu în a 7-a zi a dietei. Prin urmare, rezistența la insulină depinde nu de dietă, ci de dezvoltarea obezității.

Obezitatea a fost măsurată direct după ce animalele au fost sacrificate (29 zile de dietă); depozitățile lipidice au fost disecate parametrial, retroperitoneal, cântărite și comparate între grupe. Depozitățile lipidice ale animalelor care au primit hrană grasă au fost semnificativ mai sporite decât depozitățile lipidice ale animalelor care au primit grăunțe. Greutatea medie a depozitării lipidice parametriale (medie + SD) a fost $2,3 + 0,6$ g pentru animalele care au primit grăunțe și $5,2 + 1,4$ g pentru animalele care au primit hrană grasă. Analiza unilaterală a variațiilor acestor date a rezultat cu o valoare egală cu 25,57 cu 1/14 grade de libertate ale celor mai mari semnificații de diferență ($p < 0,01$). În mod similar, cantitatea minimă a depozitării lipidice retroperitoneale a constituit $0,9 + 0,4$ g pentru animalele care au primit grăunțe și $2,39 + 0,7$ g pentru animalele care au primit hrană grasă. Analiza unilaterală a variațiilor a rezultat cu valoarea F egală cu 24,67 cu 1/14 grade de libertate pentru aceste măsurări contra datelor statistice foarte diferite.

Discuția experiențelor 1 și 2

Scopul primei experiențe a fost compararea tendințelor șobolanilor pitici și șobolanilor SD în dezvoltarea obezității. La șobolanii pitici s-a obținut obezitate, iar la șobolanii SD nu. Probabil, nivelul normal al GH endogen la șobolanii SD prevenea obezitatea, iar nivelul redus al acestuia la șobolanii pitici a condiționat obezitatea acestora. De aici rezultă că se poate aștepta ca tratamentul profilactic al șobolanilor cu GH poate preveni obezitatea.

Obiectul și scopul experienței a doua a fost prezentarea faptului că șobolanii pitici grași devin rezistenți la insulină la momentul de dezvoltare a obezității.

Pentru dieta foarte lipidică conținutul caloric al grăsimilor a fost stabilit de 56%, acesta se consideră un maximum rezonabil. Nivelul mai înalt ar putea probabil conduce la o alimentare proteinică proastă din cauza lipsei unei

cantități suficiente de proteine în dietă. Afară de aceasta, consistența dietei la raportul grăsimii către grăunțe 1 : 2 prezenta o mixtură simplă la preparare și alimentare.

Studiile descrise mai sus au demonstrat clar că deficiența de GH condiționează dezvoltarea obezității la animale. Setul de experiențe ulterioare a arătat în ce mod GH poate revoca obezitatea.

Experiențele III și IV

Premisele

Înainte de a studia efectul diferitelor regimuri de administrare a GH asupra șobolanilor pitici obezi, au fost efectuate experiențe privind influența acestui tratament asupra șobolanilor pitici neobezi.

Primei studieri au fost supuse femelele tinere ale șobolanilor pitici; celei secunde masculii mai maturi ai acestei rase.

Femelele tinere ale șobolanilor

La femelele șobolanilor pitici neobeze tinere (vârsta 6-9 săptămâni) posologia GH determină răspunsul anabolic la GH. În fig. 1 este prezentată sporirea greutateii peste 8 zile (n=5/grupa) la șobolanii care au primit Nutropin®, marca a hGH recombinant (5 mg vezicula cu 2 mg/ml în 18 mg/ml manitol 0,68 mg/ml glicină și 5 mM fosfat, pH 7,4) într-o doză de 240 mg/zi în condiții obișnuite standard în trei regimuri diferite și la cei care au primit hGH excipient (tamponul manitolului fără hGH). GH introdus în doză determinată în formă de injecții de 2 ori pe zi a avut cel mai pronunțat efect anabolic, următorul tratament cel mai eficient consta în infuzii continue, pe când injecțiile introduse în fiecare zi au demonstrat cel mai mic efect anabolic. Nivelurile IGF-1 în serul acestor șobolani tineri (fig. 2) prelevate în decurs de 24 ore (injecție unică) sau 16 ore (injecție dublă) după ultima injecție de GH au fost de asemenea reduse (injecția zilnică) sau sporite (de două ori pe zi și infuzia prin minipompă).

Din acest motiv greutatea cea mai mare (fig.1) a fost obținută prin infuzii sau injecții de GH administrate de două ori pe zi, care au fost însoțite de sporirea IGF-1 în ser.

Masculii maturi ai șobolanilor

Masculii dw/dw ai șobolanilor în vârstă de peste 30 săptămâni au fost supuși experiențelor privind efectul posologiilor de GH asupra sporirii greutateii și depozitărilor lipidice. Stadiul maturității sexuale a șobolanilor survine la 5-6 săptămâni și greutatea corporală se stabilește la vârsta de 15 săptămâni, astfel la vârsta de 30 săptămâni șobolanul atinge maturitatea sexuală și constituția corporală de șobolan matur. Masculul de șobolan de 30 săptămâni de asemenea dispune de depozitari lipidice mai mari decât șobolanul de 8-10 săptămâni. Din acest motiv la trei grupe de șobolani pitici în vârstă de 30 săptămâni a fost introdus hGH (Nutropin® 5 mg din veziculă) prin injecții în fiecare zi sau mini-pompă, sau introducerea excipientului de hGH. Toți șobolanii au primit alimentare standard în formă de pilule grăunțoase cu un conținut redus de grăsimi. Nu au fost dovezi că hrana supusă tratării a fost absorbită de șobolanii tineri sau maturi neobezi. Rezultatele (tabelele 1 și 2) obținute de la șobolanii maturi care au primit grăunțe au fost similare rezultatelor obținute de la șobolanii tineri, adică infuzia de GH a determinat o majorare sporită a greutateii în comparație cu injecțiile de GH introduse în fiecare zi (mai ales în intervalele precoce după începutul infuziei). Asupra depozitărilor lipidice (epididimale și retroperitoneale) nu a influențat semnificativ tratamentul cu GH.

Greutatea medie a depozitărilor lipidice a crescut numeric după tratamentul cu GH, dar valoarea statistică a acestuia nu a fost obținută (SU 5.126.324).

Din acest motiv la animalele mature neobeze, care au primit hrana cu conținutul redus de grăsimi GH a determinat sporirea greutateii fără schimbări în țesuturile adipoase la introducerea acestuia în formă de injecții sau infuzii de GH, care determină sporirea greutateii și nu a fost observat vreun efect diferit asupra constituției corporale.

Afară de aceasta, în tab. 2 se arată că infuziile de GH au mărit concentrația în ser a GHBP și IGF-1 în comparație cu injecțiile de GH. Concentrația glucozei în ser nu s-a schimbat, iar concentrația colesterolului și a trigliceridelor a fost semnificativ sporită la introducerea de lungă durată a GH comparativ cu animalele de control sau cu animalele la care a fost injectat GH.

Tabelul 1

Parametrii creșterii masculilor maturi ai șobolanilor dw/dw:

Tratați cu excipient,

hGH (500 μg în condiții normale) sau cu injecții sau infuzii în fiecare zi

Grupa	Creșterea greutateii (a 4-a zi) (g)	Creșterea greutateii (a 14-a zi) (g)	Greutatea depozitării peritoneale tipice (g)	Greutatea depozitării epididimale (g)
Excipient	-7,8+5,6	-3,7+2,5	3,1+1,2	2,6+1,0
hGH Injecții	4,0+3,4	28,1+9,2	3,5+1,8	2,9+1,1
hGH Infuzii	12,9+4,4*	31,2+13,0	4,0+1,8	3,3+1,2

Tabelul 2

Parametrii sângelui la masculii maturi ai șobolanilor dw/dw tratați cu excipientul hGH (500 μg condiții normale) prin injectarea în fiecare zi sau prin infuzii

Grupa	IGF-1 în plasmă (ng/ml)	GHBP în plasmă (ng/ml)	Gluciza în ser (mg/dl)	Colesterolul în ser (mg/dl)	Trigliceride în ser (mg/dl)
Excipient	154+43	11+1	130 +9	75+8	118+19
hGH Injecții	202+31	14+3	130+5	83+10	119+25
hGH Infuzii	285+41*	78+17*	134+6	133+27*	185+47*

Valorile în ambele tabele + Sds, n = 7-8/grupă.

* p < 0.05 vs. hGH la o injecție

Introducere

În două experiențe ulterioare (experiențele III și IV) femelele șobolanilor pitici au primit în decurs de 8 săptămâni o hrană bogată în grăsimi. O astfel de dietă a determinat inițial o creștere rapidă a greutateii; șobolanii care au primit hrană grasă au fixat apoi stabil masa adipoasă. Această concluzie a fost făcută din sporirea relativ modestă a greutateii în perioada între 6 și 8 săptămâni de dietă foarte grasă. S-a tras concluzia că studierea animalelor stabil grase, de altfel și animalelor în faza dinamică de creștere a obezității, poate să reflecte situația comună, care se raportează la omul suferind de obezitate în decursul unei perioade de lungă durată (unde efectul lipolitic al GH este așteptat).

Din această cauză au fost efectuate două stadii succesive de studiere, unde șobolanii au fost în stadiul de obezitate, iar apoi au fost tratați cu hGH pentru studierea efectului acestuia asupra majorării greutății corporale, greutății organelor și dimensiunii depozitărilor adipoase. Posologia de administrare a GH a fost investigată pentru a determina importanța acesteia în activitatea lipolitică a GH. În stadiul inițial de studiere, șobolanilor pitici obezi un timp îndelungat li se făceau infuzii sau una ori două injecții subcutanate pe zi. A fost emisă o ipoteză cu privire la efectul anabolic al GH, cum că efectul lipolitic al diferitelor forme de GH ar putea avea o eficiență similară, adică două injecții de GH pe zi puteau fi mai eficiente decât infuzia GH, care, la rândul său, putea fi mai eficientă decât o injecție de GH pe zi. Stadiul al doilea de studiere a fost orientat spre dublarea efectului stadiului inițial (tratând șobolanii cu GH și menținând dieta bogată în grăsimi) și, astfel, a testa efectele concomitente ale "dietei" (returnând șobolanii la dieta cu un conținut redus de grăsimi) și regimurile de tratament cu GH.

EXPERIENȚA III

Șaizeci de femele ale șobolanilor pitici (105-150 g, vârsta 90 de zile) au fost grupate și alimentate cu hrană bogată în grăsimi și apă într-o cantitate nelimitată în decurs de 8 săptămâni. Peste 8 săptămâni au fost selectați 40 șobolani cei mai obezi (greutatea medie 175 g) pentru utilizarea ulterioară. Apoi șobolanii au fost supuși anesteziei (cu chetamin/xilazină i.p.) și au fost introduse 2 minipompe osmatice Alza® (2002, viteza pompei 0,46 μ/oră, Alza Corporation, Palo Alto, CA), care au fost inserate subcutanate. În pompe a fost introdus de asemenea hGH recombinant (5 mg/veziculă, Nutropin®) sau excipientul de hGH. hGH a fost diluat până la 22,6 mg/ml astfel că 2 pompe conțineau 22 μl/zi sau aproximativ 500 μg/zi de hGH. Pentru injecțiile de hGH au fost preparate soluții de 5 mg/ml și 2,5 mg/ml de hGH astfel încât în fiecare zi se administrau 100 μl de soluție de 5 mg/ml (500 □g/zi) o dată pe zi sau 100 μl de soluție de 2,5 mg/ml de două ori pe zi (constituind doza de 500 □g/zi).

Tratamentul a continuat 14 zile, după ce șobolanii au fost sacrificați (n=10/grupă).

- 1) pompe de excipient, injecții de excipient
- 2) pompe de hGH, injecții de excipient
- 3) pompe de excipient, o injecție de hGH (500 μg)/zi
- 4) pompe de excipient, două injecții de hGH (2x250μg)/zi

EXPERIENȚA IV

Femelele șobolanilor pitici în vârstă de 70 zile au primit hrană bogată în grăsimi într-o cantitate nelimitată în decurs de 7 săptămâni și apă de asemenea într-o cantitate nelimitată. O grupă separată din 10 șobolani primea în calitate de hrană grăunțe. Peste 7 săptămâni de alimentare cu hrană grasă au fost selectați 42, de șobolani cei mai obezi (grei), pentru utilizarea ulterioară. Șobolanilor li s-a administrat anestezie cu chetamină (xilozina i.p.) și o minipompă osmatică Alza® (2 ML2, câte 5,12 μl/oră, Alza Corporation, Palo Alto, CA) a fost inserată subcutanată. Pompele au fost introduse fie cu recombinantul hGH (5 mg/veziculă, Nutropin®), fie cu excipient de hGH. hGH a fost diluat până la 4,1 mg/ml. Pompa 2ML2 elibera câte 5,12 μl/oră sau 5,12 ori 24 = 122,88 μl/zi, astfel încât cantitatea de hGH introdusă câte 4,1 μg/μl a constituit 122,88 ori câte 4,12 = aproximativ 500 μg/zi. Pentru injecții de hGH a fost preparată soluția de 5 mg/ml hGH, deci 100 μl de soluție câte 5 mg/ml putea fi introdusă în fiecare zi (500 μg/zi).

- 1) pompe de excipient, injecții de excipient
- 2) pompe de hGH, injecții de excipient
- 3) pompe de excipient, 1 injecție de hGH/zi

O dietă bogată în grăsimi în decurs de 7 săptămâni trecerea la o dietă cu conținutul redus de grăsimi (grăunțe).

- 4) pompe de excipient, injecții de excipient
- 5) pompe de hGH, injecții de excipient

6) pompe de excipient, o injecție de hGH/zi

Dieta constituită din grăunțe în decurs de 7 săptămâni și menținerea unei astfel de diete.

7) pompe de excipient, injecții de excipient

Peste 14 zile șobolanii au fost sacrificați și efectuată autopsia, în urma căreia organele și depozitățile lipidice au fost extrase și cântărite, sângele a fost supus măsurărilor conținutului de metaboliți și hormoni.

Rezultatele experiențelor III și IV

Experiența III

În fig. 3 și 4 și tab. 3 sunt prezentate creșterea greutateii șobolanilor obezi peste 14 zile. În fig. 3 este prezentată creșterea greutateii în funcție de timp. În fig. 4 și în tab. 3 este prezentată sporirea finală a greutateii. Efectele semnificative statistice sunt prezentate în tabelul 3. Șobolanii tratați cu excipient mențineau greutatea lor (-5 g); șobolanii care au fost supuși unui tratament cu injecții de GH o dată pe zi și-au sporit greutatea (21 g). Însă la administrarea GH prin infuzii sau de două ori pe zi reducerea greutateii a atins 34 sau 24 g corespunzător. O astfel de diferență evidentă în greutate determinată de posologia administrării GH a fost neașteptată. În particular, reducerea greutateii după tratamentul cu GH a fost opusă rezultatelor, prezentate în fig. 1 și tab. 1.

Greutatea retroperitoneală a depozitării lipidice la șobolanii pitici este prezentată în fig. 5 și tab. 3. GH introdus în formă de injecții zilnice în decurs de 14 zile câte 500 μg/zi/șobolan a redus nesemnificativ greutatea depozitării lipidice retroperitoneale, mezenterice sau ovariene (gonadice), dar dacă șobolanii au fost tratați cu GH prin infuzii sau 2 injecții pe zi reducerea a avut loc în toate trei depozitățile lipidice.

Această reducere semnificativă a greutateii de asemenea diferă de rezultatele prezentate în Tabelul I pentru șobolanii neobezi. Din acest motiv schimbările în greutate ale depozităților lipidice posedă aceeași tendință ca și schimbarea greutateii corporale și sunt determinate de diferite posologii de administrare a GH la șobolanii obezi.

Nivelurile de IGF-1, GHBP, colesterol și trigliceride la șobolanii pitici după sacrificarea acestora sunt prezentate în tab. 4. Nivelul IGF-1 la șobolanii obezi a fost sporit la injecțiile GH o dată pe zi, dar nu s-a schimbat la infuzie sau la 2 injecții de GH pe zi. Indicele GHBP în ser nu s-a schimbat. În comparație cu injectarea GH o dată pe zi, infuzia GH sau injectarea GH de 2 ori pe zi au indicat schimbări în concentrația glucozei și trigliceridelor în ser.

Este instructiv de comparat tratamentul cu GH al șobolanilor pitici neobezi (tab. 1 și 2) cu tratamentul cu Gh al șobolanilor pitici obezi (tab. 3 și 4). La șobolani neobezi (tab. 1) GH, independent de modul de administrare, a sporit greutatea și nu a produs nici un efect asupra depozităților lipidice. La șobolanii obezi (tab. 3) de asemenea se observă sporirea sau reducerea greutateii. La șobolanii neobezi au crescut indicii IGF-1, GHBP, colesterolului și trigliceridelor după infuzia de hGH în comparație cu injectarea hGH (tab. 2). Însă la șobolanii obezi IGF-1 și nivelul glucozei s-au redus la infuzia de GH în comparație cu injectarea GH și nu a fost observată sporirea nivelurilor GHBP, colesterolului sau trigliceridei (tab. 4). Evident că diferite regimuri de administrare a hGH determină diferite efecte în majoritatea analizelor șobolanilor obezi.

Tabelul 3

Parametrii de sporire la femelele șobolanilor obezi care au primit hrană grasă tratați cu excipient, hGH (500 μg în condiții normale) la infuzie, injectarea unică sau dublă

Grupa	Sporirea greutateii (14 zile) (g)	Greutatea depozitării lipidice retroperitone-ale (g)	Greutatea depozităților lipidice mesenterice (g)	Greutatea depozităților lipidice ovariene (g)
Excipient	-5+8	4,9+1,6	2,5+0,9	4,5+2,0
hGH Injecție	-34+21*	1,1+0,7*	1,6+0,9*	2,1+1,1*
hGH Injecție (1/zi)	21+13	4,5+1,7	2,8+0,9	4,6+2,1
hGH Injecție (2/zi)	-24+22*	1,8+0,6*	2,1+0,9	2,6+1,0*

Tabelul 4

Parametrii sângelui femelelor care au primit hrană grasă, tratate cu excipienți, hGH (500 μg în condiții obișnuite), prin infuzii sau injecții unice sau duble pe zi

Grupa	IGF-1 în ser (ng/ml)	GHBP în ser (ng/dl)	glucoză în ser (mg/dl)	colesterol în ser (mg/dl)	trigliceride în ser (mg/dl)
Excipient	143+24	14+4	158+27	82+13	93+30
hGH Infuzie	124+72*	16+9	93+30*	73+22	90+43*
hGH (1/zi)	210+66	17+13	164+29	76+6	130+18

Injecție					
hGH (2/zi)	103+58*	10+3	138+21*	88+19	118+28
Injecție					

Valorile în ambele tabele cu admisiunile + Sds, n = 10/grupă

* p < 0.05 litri soluție de hGH la injectare.

Experiența IV

În fig. 6 este prezentată sporirea totală a greutateii acumulate de șobolanii pitici în decurs de 14 zile. Primele trei grupe (grăsime/grăsime) au primit hrană grasă în tot decursul experienței; următoarele trei grupe au primit la momentul de tratare cu GH hrană diferită: de la hrană foarte grasă până la grăunțe (grăsime/grăunțe), iar grupa a șaptea a primit în tot decursul experienței grăunțe (grăunțe/grăunțe). GH a fost introdus în fiecare zi fie în formă de injecții, fie prin minipompă în decurs de 14 zile în cantitate de 500 μg/zi/șobolan. Șobolanii, care au primit în tot decursul experienței numai hrană grasă sau numai grăunțe își mențineau greutatea peste 14 zile, dar dacă șobolanii care au primit hrană grasă au fost trecuți la grăunțe, atunci aceștia își reduceau greutatea (cum a fost de așteptat). Dacă șobolanii au fost tratați cu injecții de GH în fiecare zi, greutatea lor a sporit independent de dietă. Din acest motiv efectul dietei de la grăsime la grăunțe s-a redus, dacă GH a fost introdus prin injecții subcutanate. Însă, dacă GH a fost introdus prin infuzie, reducerea greutateii se producea independent de dietă. La dieta grăsime/grăsime șobolanii, cărora li se făceau injecții de GH au adăugat în greutate (14+25 g), în timp ce șobolanii cărora li se făceau infuzii de GH adăugau -44+18 g, p < 0,001 vs. GH injectat. Șobolanii la dieta grăsime/grăunțe după injectări de GH au adăugat în greutate (27+17 g), iar la aceeași dietă infuzia de GH a condus la pierderea greutateii (-27+36g, p < 0.001 vs. GH injectat). Evident, că există o diferență în reacția greutateii corporale în funcție de posologia de administrare a GH șobolanilor obezi, chiar la respectarea dietei.

În fig. 7 este prezentată greutatea depozitărilor lipidice retroperitoneale la șobolanii obezi. Obezitatea șobolanilor care au primit hrană grasă poate fi prezentată prin compararea coloanelor 1 și 7; greutatea medie a depozitărilor de grăsime la șobolanii care au primit hrană grasă a constituit 5806 mg, în timp ce depozitățile șobolanilor, care au primit grăunțe au constituit 1137 mg (diferența în depozitari de 5 ori). Răspunsul la tratare cu GH a fost parțial surprinzător. GH introdus în formă de injecții în fiecare zi în decurs de 14 zile câte 500 μg/zi/șobolan a redus nesemnificativ greutatea corporală, pe când la infuziile de GH s-a observat o pierdere semnificativă independent de dietă. Greutatea depozitărilor lipidice retroperitoneale la șobolanii care au primit o hrană grăsime/grăunțe și tratați cu injecții de GH a fost mai mare decât la șobolanii care au primit grăsime/grăunțe și tratați cu infuzii de GH (2040±1075 mg). Ca și la compararea greutateii corporale a șobolanilor, la compararea depozitărilor lipidice există o dependență de posologia administrării GH la șobolanii obezi.

Concluzia

Concluzia inițială a acestor studieri este, că efectul GH asupra greutateii corporale depinde de posologia acestuia. Din aceste studieri urmează că numai prezența continuă a GH în sânge va fi eficientă pentru reducerea depozitărilor de grăsime, ceea ce a fost obținut, de exemplu, prin injectări frecvente de GH (de două ori și mai mult), precum și prin infuzii continue ale acestuia, sau prin alte metode de prelungire a prezenței GH în sânge pentru reducerea greutateii omului (incluzând încapsularea GH într-o formă cu acțiune susținută, adăugând un polimer la GH pentru a-l face durabil, sau administrând GH conjugat cu proteina, care îl leagă.

Nivelul sporit de IGF-1 în ser la GH-infuzii la șobolanii neobezi a lipsit la șobolanii neobezi. Afară de aceasta, nivelurile GHBP în ser nu s-au majorat la GH-infuzii. De aceea a apărut GH-rezistența (la utilizarea IGF-1 și GHBP în calitate de markeri) la șobolanii obezi când GH este introdus continuu. Însă reacția lipolitică la GH indică că rezistența la GH nu este globală.

Aceste studieri au fost primele, în care au fost utilizați șobolani având un deficit de hormon somatotrop (GHD). Oamenii cu GHD posedă o constituție deformată cu conținutul de grăsime sporit (Rudman, J. Amer. Geriatr. Soc., 33 p., 800-807, 1985). Femela șobolanului pitic, căreia prin dieta de alimentare i-a fost indusă obezitatea, poate servi ca model interesant de deficiență de GH apropiată omului cu GHD suferind de obezitate. Ar fi necesar de relevat că cu vârsta oamenii obțin un deficit de GH (vezi Rudman, 1985, supra p.804), astfel, este rezonabil de a trage concluzia că modelul rozătoarelor utilizat aici de asemenea poate servi drept model de sporire a greutateii la oamenii suferinzi de deficiența GH. Nu este clar dacă obezitatea la oameni este asociată atât deficienței relative de GH (din cauza secreției reduse de GH) sau lipsei relative a reactivității la GH (sunt reduși receptorii GH sau cuplarea receptorilor GH). Este demonstrat că animalul cu predispoziție genetică la obezitate poate repede să-și reducă greutatea la tratamentul cu GH corespunzător. Se poate face concluzia că alte mamifere cu predispoziție genetică la obezitate de asemenea pot prin tratamentul cu GH să-și reducă conținutul grăsimii.

EXEMPLUL II

Investigația deferitelor moduri de administrare a GH pentru reducerea lipolitică a greutateii

Introducere

Această studiere conduce la depistarea efectului diferitelor moduri de administrare a hGH asupra asimilării hranei de către femelele obeze de șobolani pitici

Metode

95 de femele de șobolani pitici în vârstă de 12-16 săptămâni (Simonsen Labs, Gilroy, CA) au primit hrană bogată în grăsimi, constituită dintr-o parte de grăsimi vegetale CriscoTM și din 2 părți de hrană în formă de pulbere pentru rozătoare Purina[®]. Până la începutul studierii șobolanii s-au aflat la astfel de dietă 11 săptămâni. 44 de șobolani au fost supuși studierii descrise în exemplul III de mai jos. Din animalele rămase, 23 de șobolani care au adăugat în greutate au fost utilizați pentru studiul prezent.

În timp de 3 zile până la începutul tratamentului (ziua 0) șobolanii au fost plasați pe hrana în formă de pulbere și amplasați în cuști metabolice NALGE pentru aclimatizare până la începutul tratării. Controlul asupra șobolanilor neobezi în experiența dată nu s-a efectuat. În ziua "0" șobolanului i s-a administrat anestezia cu utilizarea Chetaminei/Xilazinei i.p. (125 : 25 mg/kg) și subcutanat în spate a fost introdusă o minipompă osmatică AlzaTM 2002 (Alza Corporation, Polo Alto, CA), conținând fie hGH, fie excipient. Grupei a doua de șobolani i-a fost injectat subcutanat hGH sau excipient, ei au fost încălziți cu termoforul, apoi au fost amplasați în cuști. În continuare șobolanilor li s-au făcut injecții în fiecare zi, s-au cântărit în fiecare zi și peste 14 zile s-au sacrificat.

Grupele au fost distribuite în felul următor*:

Grupa	Injecțiile	Pompe	
1	excipient	excipient	N = 7
2	hGH 300 μg	excipient	N = 7
3	excipient	hGH 300 μg	N = 8

* Dozarea zilnică totală.

Reagenții aplicați au fost Nutropin[®] marca hGH, vezicula cu volumul de 5 mg, excipient de hGH (tampon, utilizat în Nutropin[®], 5 mg/ml echivalent). În ziua a 15-a șobolanii au fost sacrificați utilizând CO₂, serul și depozitățile lipidice au fost luate pentru analiza ulterioară și cântărite.

Rezultatele

Greutatea corporală:

Toți șobolanii au fost trecuți la hrană grăunțoasă de 3 ori pe zi când au fost amplasați în cuști metabolice, fapt ce poate explica pierderea greutateii la animalele de control. Schimbarea greutateii corporale cum este indicat în fig. 8 devine uniformă, începând cu ziua a 5-a. În acest timp șobolanii care au primit injecții de hGH au început să-și mărească greutatea, iar șobolanii care au primit infuzii au început să-și reducă greutatea. Grupa de animale care au primit infuzii de GH și-au redus greutatea până la ziua a 9-a, apoi au început iarăși să-și mărească greutatea. Peste 14 zile șobolanii de control și-au redus greutatea (-12+11 g). După GH-injecții greutatea a sporit (18,8+15 g) comparativ cu pierderea greutateii după GH-infuzii (-5+30 g, $p < 0,05$ vs. GH-injecții).

Asimilarea hranei

Asimilarea hranei de către grupa de șobolani cărora li s-au făcut infuzii, după cum este indicat în fig. 9, este proporțională cu schimbarea greutateii corporale și această grupa mânca mult mai puțin decât grupa care primea infuzii până la ziua a 9-a. În ziua a 8-a șobolanii de control au mâncat 8,6+31 g. Șobolanii, care au primit injecții de GH, au folosit semnificativ mai multă hrană ($p < 0,05$) (9,4+4,3 g) decât șobolanii cărora li s-au făcut infuzii (2,6+3,8 g). La acest moment, șobolanii care au primit infuzii au început să întrebuițeze hrană și până la a 15-a zi au mâncat o cantitate egală cu hrana mâncată de grupa care primea injecții. A fost stabilită o diferență evidentă între regimurile de administrare a GH șobolanilor obezi. Infuziile de hGH au redus nivelul de asimilare a hranei, în timp ce hGH injectat în fiecare zi sporea nivelul de asimilare a hranei.

Depozitățile lipidice

Greutatea depozităților lipidice prezentată în fig.10 indică că reducerea greutateii de la GH-infuzii probabil este rezultatul reducerii acumulărilor lipidice. Greutatea depozităților lipidice la șobolanii de control (2,9+12 g) a fost mai sporită semnificativ ($p < 0,05$) decât greutatea depozităților lipidice ale șobolanilor care au primit GH-infuzii (1,5 + 1,2 g), dar nu a celor care au primit GH-injecții.

Datele fizice

Șobolanii care au primit hGH-infuzii repede își reduceau greutatea și sporeau întrebuițarea hranei, apei, eliminau mai multă urină și fecalii în decurs de câteva zile. Posibil unii șobolani au fost mai mult afectați, alții mai puțin, dar nu a fost o mare deosebire dintre gradul de obezitate sau greutatea inițială și gradul de reducere a apetitului sau reducere a greutateii.

Concluzia

Datele privind greutatea corporală indică că modurile de introducere a hGH au un foarte mare efect asupra creșterii greutateii depozităților lipidice și asimilării hranei. Injecțiile zilnice de hGH cauzau creșterea greutateii, pe când infuziile de hGH cauzau pierderea greutateii. De asemenea, infuziile de hGH cauzau reducerea asimilării hranei până când greutatea corporală și sau depozitățile lipidice atingeau un nivel nou, când hrana începea din nou să se asimileze. Cantitatea de hrană asimilată a animalelor care au primit infuzii a fost statistic mai mică începând cu ziua a 8-a. La acest moment animalele care au primit infuzii de hGH începeau să mănânce și către ziua a 15-a asimilarea hranei a fost aceeași ca și la grupele care au primit injecții și nu se deosebea de la șobolanii de control. Același lucru s-a observat și în datele privind adăugarea greutateii.

În contrast cu asimilarea redusă a hranei de șobolanii care au primit infuzii, șobolanii care au primit injecții nu au demonstrat schimbări referitoare la asimilarea hranei comparativ cu șobolanii de control (tratați cu excipient).

Depozitățile lipidice de asemenea au fost mai reduse la GH-infuzii. În general GH-infuziile cauzau reducerea greutateții, anorexia și reducerea depozităților lipidice în timp ce (la aceeași doză de GH) injecțiile de GH zilnice sporeau greutatea corporală și nu aveau efect asupra asimilării hranei sau depozităților lipidice.

EXEMPLUL III

Utilizarea GH, IGF-1 sau GH și IGF-1 pentru tratarea șobolanilor obezi

Introducere

Acest studiu a condus la confirmarea efectelor diferitelor moduri de administrare a GH și studierea dependenței acestora de doză. Afară de aceasta, studiul a fost efectuat pentru a depista efectul administrării IGF-1 aparte sau coadministrării cu GH asupra greutateții scheletului, organismului întreg sau a organelor aparte, compoziției chimice a serului, nivelurilor hormonilor endocrini la șobolanii pitici obezi.

Metodele

Soluții dozate

PEG7-hGH a fost preparat în felul următor: Metoxipoli(etilenglicolul) a fost convertizat în eterul etilic corespunzător prin titrare cu sodiu naftalinic pentru generarea unui alcoxid corespunzător cu reacția ulterioară cu bromacetat. Eterul a fost tratat cu hidroxid de sodiu și apă la obținerea unui acid carbonic corespunzător, L-carboximetil-omega-carboximetoxipoli (oxietilen). Acest proces este descris în detaliu de Biickmann et al., supra.

Purificarea acidului carbonic s-a atins prin diluarea în etanol cald (20 ml/g) și cristalizarea la 4°C. Produsul a fost separat prin filtrare, spălat cu eter (de trei ori) și uscat în vacuum. Gradul de activitate al acestuia a fost determinat prin titrarea probei în soluție apoasă cu KOH 0,1 N și fenolftaleină în calitate de indicator. În condițiile de cromatografie în strat subțire a fost efectuată spălarea cu metanol/CH₂Cl₂ 3:17 și vizualizarea în vapori de iod. Componenta indică o linie Rf de la 0 până la 3,3.

Acidul (15 g, 3 mmol) a fost dizolvat în etilacetat (150 ml) la încălzire cu adăugarea carbodiimid dicitlohexil (1,55 g, 7,5 mmol) și N-hidroxisuccinimidei (0,86 g, 7,5 mmol), soluția a fost amestecată la t=30°C în decurs de 18 ore. Periodic produsul trebuie precipitat în procesul reacției, în acest caz suspensia densă albă se încălzește până când dicitlohexilurea floculată se va precipita din soluție. Amestecul reactiv a fost filtrat cu ajutorul unui material de filtrare Celite® pentru separarea ureei și lăsat până dimineața următoare la temperatura de 4°C, după ce produsul a fost colectat prin filtrare, a fost spălat cu etilacetat rece (de 3 ori) și uscat în vacuum până la obținerea omega-metaxipoli(oxietilen)oxietil-N-hidroxisuccinimidei (14,7 g, 98%).

NH₃-PEG rezultat a fost adăugat cu un exces molar de 30 de ori la soluția de hGH, care conținea 12 mg/mL hGH în 50 mM tampon de borat de sodiu cu pH 8,5, soluția fiind malaxată la temperatura de cameră în decurs de o oră. Amestecul reactiv a fost apoi introdus în coloana Q Sepharose (Pharmacia) în 30 mM tampon Tris, pH 7,8 și spălat cu NaCl. Apoi, acesta a fost introdus în coloana Toyopear 650S și echilibrat în 0,3 M tampon de citrat de sodiu, pH 7,8. HGH tratat cu PEG a fost spălat din coloană cu un component reversiv de sare de la citrat de sodiu 0,03 molar pH 7,8 până la citrat de sodiu 0 molar, apoi au fost unificate fracțiile care conțin hGH tratat cu PEG de dimensiuni corespunzătoare. Pulul a fost schimbat în tampon, utilizând coloana de desalinare, într-un tampon, conținând 0,25 M manitol, 0,02 M glicină și 5 mM fosfat de sodiu, pH 7,4, pentru a se obține concentrația de 1,75 mg/ml. PEG 7-hGH a fost apoi diluat cu tamponul de manitol pentru obținerea concentrației finale de 1 mg/ml, care și a fost utilizat pentru studierea șobolanilor.

GH uman recombinant a fost Nutropin® marca hGH, vezicula de 5 mg. IGF-1 uman recombinant [comercializat de către firma KabiGen AB, Stockholm, Suedia (activitatea specifică > 14.000 U/mg prin testare radioreceptoare utilizând membranele placentare) sau investigate în laboratoarele clinice Genentech, Inc., San Francisco de Sud] a fost aplicat în toate experiențele similare ale exemplelor citate. Pentru exemplul dat de IGF-1 a fost dizolvat în 18 mg/ml IGF-1 în 10 mM tampon de citrat și 126 mM NaCl, pH 6,0, în timp ce pentru hGH a fost utilizat un excipient în formă de 5 mM tampon de fosfat.

Animalele:

95 de femele de șobolani pitici în vârstă de 12-16 săptămâni (Simonsen Labs, Gilroy, CA) au primit o dietă bogată în grăsimi, constituită dintr-o parte de Crisco™ grăsimi vegetale și 2 părți de Purina™ - nutreț pulverulent pentru rozătoare. Zece șobolani maturi au primit nutreț cu conținutul de grăsime redus pentru control. Toți șobolanii rămâneau pe astfel de dietă în decursul întregii perioade de studiu. Animalele se cântăreau zilnic. Peste 8 săptămâni 54 de animale au avut greutate sporită.

Datele experienței*:

Grupa	Zilnic injecții	Pompa hGH	Pompa IGF-1
1	excipient	excipient	excipient
2	excipient	hGH 300 μg	excipient
3	excipient	hGH 100 μg	excipient
4	hGH 300 μg	excipient	excipient
5	hGH 100 μg	excipient	excipient
6	excipient	excipient	IGF-1 216 μg
7	excipient	hGH 300 μg	IGF-1 216 μg
8	hGH 300 μg	excipient	IGF-1 216 μg

9	PEG7-hGH 100 µg	excipient	excipient
10	slabe		

* Dozele primite în µg/zi.

În prima zi șobolanii au fost împărțiți în 9 grupe a câte 6. În ziua 0 șobolanilor obezi li sa introdus anestezia din Ketamină/Xilazină i.p. (125 : 25 mg/kg). Regiunea scapulară dorsală a fost tunsă și preparată pentru chirurgie, utilizând un tampon cu alcool izopropilic de 70%. S-a făcut o mică incizie subcutanată și s-au introdus subcutanat 2 minipompe osmatice Alza 2002, conținând fie hGH, IGF-1, fie excipient. Animalelor de asemenea li se injecta subcutanat hGH sau excipient, le acopereau cu termofor, apoi le amplasau în cuștile lor. Șobolanilor li se făceau zilnic injecții și îi cântăreau, peste 14 zile ei au fost sacrificați. Șobolanilor slabi de control li s-a administrat anestezie, li s-au făcut incizii chirurgicale, dar nu li s-au introdus nici minipompe, nici injecții.

Peste 14 zile șobolanii au fost sacrificați utilizând CO₂, după ce au fost colectate serul, splina, rinichii, ficatul, inima, ovarele și depozitățile lipidice retroperitoneale, tibia.

Serul, ficatul, depozitățile lipidice ovariene, pielea și scheletul au fost congelate, inima și tibia au fost amplasate în formalină pentru histologie. A fost efectuată analiza chimică a serului utilizând analizatorii chimici clinici Monarch. Insulina în ser a fost măsurată prin radioimunoscopie. IGF-1 total în ser a fost măsurat în același mod, după ce probele au fost extrase utilizând acizi/etanol.

Rezultatele

Șobolanii care au primit hrană grasă repede au adăugat în greutate în decurs de patru săptămâni de astfel de alimentare, după ce greutatea lor se menținea la un nivel. Peste 8 săptămâni de alimentare cu hrană grasă șobolanii pitici brusc au sporit greutatea lor. Au fost selectați 54 de șobolani, care și-au sporit greutatea cu 42 - 83% de la greutatea inițială, în medie 59% în comparație cu șobolanii care au primit grăunțe - 18-32%, în medie 23% de la greutatea inițială.

În fig. 11 este prezentată greutatea medie a 10 grupe de șobolani la ziua a 14-a. Șobolanii tratați cu excipient își mențineau starea lor de obezitate cu sporire sau pierdere mică (1,5 ± 90 g). Peste 14 zile după infuzii de hGH în combinație cu IGF-1 a apărut un efect catabolic foarte pronunțat și brusc cu pierdere în greutate în medie 50,2 ± 10,0 g, ceea ce este semnificativ mai mult decât $p < 0,05$ și de două ori mai mult decât în grupa care a primit infuzii numai de 300 µg de hGH (-23,8 ± 31,1 g). IGF-1 a avut un efect nesemnificativ asupra adăugării greutății, chiar peste 14 zile surplusul de greutate a constituit 10,0 ± 4,5 g în comparație cu pierderea greutății. Infuziile unei doze mici de hGH de 100 µg/zi condiționează sporirea greutății, ceea ce nu prea este diferențiat de la grupa de control (13,2 ± 16,1 g), dar este puțin comparabil cu sporirea semnificativă a greutății cauzată de injectarea a 100 µg/zi de hGH (30,1 ± 18,1 g). Două doze de hGH introdus prin injecții nu se deosebeau de la oricare alta, dar aveau un efect anabolic care era diferit statistic ($p < 0,05$) de efectul animalelor de control. La a 14-a zi sporirea greutății șobolanilor care au primit injecții zilnice câte 100 µg/zi de PEG7-hGH (2,6 ± 20 g) a fost semnificativ mai mică ($p < 0,05$) decât cea la șobolanii care au primit zilnic injecții de hGH.

În fig. 12 este prezentată sporirea greutății în funcție de timp pentru unele grupe. Aici este prezentată o mare diferență între două regimuri de administrare a hGH și dintre efectul produs de GH introdus aparte și GH introdus în combinație cu IGF-1.

Greutatea organelor:

A. Greutatea inimii: Nu a fost o diferență mare între grupe, atât în greutatea absolută cât și în raportul procentual față de greutatea corporală (greutatea relativă).

B. Greutatea rinichilor: Infuziile de hGH în doze mari au dus la sporirea greutății rinichilor și semnificativ a sporit greutatea relativă a acestora comparativ cu șobolanii sau animalele de control tratate cu GH-injecții. Șobolanii tratați cu IGF-1 posedau rinichi semnificativ mai mari decât rinichii la șobolanii de control obezi, dar fără diferențe statistice de la rinichii șobolanilor de control slabi. S-a resimțit efectul dozei asupra dimensiunii relative a rinichilor în grupa care a primit hGH-infuzii. Infuziile cu PEG7-hGH nu au avut prea mare efect asupra dimensiunii rinichilor.

C. Greutatea ficatului: Ficatul șobolanilor care primeau 300 µg de hGH-infuzii a fost semnificativ mai mare în funcție de greutatea corporală decât ficatul șobolanilor de control. IGF-1 nu a avut efect statistic comparativ cu cele de control și nu a avut un efect suplimentar la introducerea acestuia în combinație cu hGH în comparație cu grupa căreia i s-a administrat infuzii de hGH în doze mari. hGH-injecțiile nu au avut un efect deosebit asupra dimensiunii relative a rinichilor.

D. Greutatea splinei: Greutatea splinei șobolanilor care au primit numai IGF-1 a fost semnificativ mai sporită decât greutatea splinei șobolanilor care au primit IGF-1 în combinație cu hGH-infuzii. Aceasta ne sugerează că reacția IGF-1 asupra mărimii splinei a fost blocată de hGH-infuzii.

E. Greutatea depozităților lipidice: În fig. 13 este prezentată greutatea absolută retroperitoneală a depozităților lipidice, în fig. 14 - greutatea relativă, iar în fig. 15 - greutatea gonadică absolută. Șobolanii care primeau 300 µg de hGH prin infuzii își reduceau semnificativ greutatea și la aceștia au fost semnificativ mai puține depozitări adipoase. Infuzia a 100 µg de hGH a avut un efect semnificativ mai mic asupra masei lipidice și depozitățile lipidice cântăreau semnificativ mai mult ($p < 0,01$) decât depozitățile lipidice ale șobolanilor care au primit infuzii în doze mari. Și invers, șobolanii care primeau hGH-injecții câte 100 sau 300 µg/zi n-au semnalat schimbări în greutatea absolută a

depozitărilor retroperitoneale sau gonadice. IGF-1 administrat aparte și PEG7-hGH nu au avut un efect semnificativ asupra masei depozitărilor lipidice.

IGF-1- infuziile în combinație cu hGH-injecții reduceau semnificativ mai mult ($p < 0,05$) masa depozitărilor lipidice decât masa la șobolanii de control și efectul maxim asupra constituției corporale au avut infuziile combinate de GH și IGF-1. În ultima grupă masa adipoasă a fost semnificativ redusă comparativ cu șobolanii de control și s-a redus ($p < 0,05$) comparativ cu grupa care primea numai GH-infuzii.

F. Studiarea chimică a serului:

1. Insulina șobolanului: Nivelurile insulinei determinate conform ANOVA statistic nu se deosebeau în toate grupele (vezi fig. 16). Totuși, în grupa care primea combinația de infuzii hGH/IGF-1 la majoritatea animalelor concentrația insulinei a fost $\leq 0,2$ ng/ml, ceea ce reprezintă un minim pentru aceste studii. Astfel se poate trage concluzia că IGF-1 a redus nivelul insulinei și că GH-infuziile plus IGF-infuziile au redus-o și mai mult.

2. IGF-1 în ser: Concentrația IGF-1 în serul șobolanilor obezi nu a avut efect de la GH-infuzii (tabelul 4, vezi fig. 17). Cum era de așteptat, infuziile de IGF-1 sporesc concentrația acestuia în ser, dar aceste concentrații se reduc la coadministrarea lui cu GH.

3. Glucoza: Nivelul glucozei a fost semnificativ mai redus în grupa care primea hGH/IGF-1 infuzii ($59,6$ mg/dl \pm $6,3$) decât în grupa care primea hGH-infuzii în doze mari ($98,2$ mg/dl \pm $48,9$) (vezi fig.18). Pe baza datelor exemplului II asimilarea hranei în grupa care primea hGH-infuzii a fost invers proporțională la a 14-a zi, deși nivelul glucozei a fost redus. PEG7-hGH nu a avut efect asupra nivelului glucozei în ser.

4. Trigliceridele: Trigliceridele în ser au fost semnificativ reduse la infuzia hGH/IGF-1. Infuzia unuia din hormoni IGF-1 sau hGH avea un efect nesemnificativ asupra conținutului acestora în ser. hGH-injecțiile zilnice au sporit semnificativ conținutul trigliceridelor; însă la infuzia combinată de IGF-1 și hGH conținutul trigliceridelor statistic nu se deosebea mult de cel de control (vezi fig. 18). PEG7-hGH nu avea efect asupra conținutului trigliceridelor.

5. Colesterolul: Nu au fost diferențe semnificative între grupe (vezi fig. 18).

6. Azotul în uree: Șobolanii obezi conțin o concentrație redusă de azot în uree (BUN), (vezi fig. 19). Acești șobolani primeau hrană bogată în grăsimi, în timp ce șobolanii slabi primeau mai mult proteine decât calorii. Grupele care au primit IGF-1 au conținutul BUNs mai redus decât grupele care au primit numai hGH.

7. Calciul: Conținutul calciului sporea la infuziile de hGH și PEG7-hGH, dar se reducea dacă IGF-1 se administra aparte sau în combinație cu hGH (vezi fig. 19).

8. Fosforul: Conținutul fosforului a fost înalt la toți șobolanii obezi. Șobolanii slabi de control îl conțineau într-o cantitate semnificativ mai redusă (vezi fig. 19).

Concluzii

Rezultatele acestor studii confirmă rezultatele indicate în exemplele I și II privind faptul că administrarea continuă a hGH șobolanilor care au obținut, în rezultatul unei diete anumite de alimentare, obezitate a redus considerabil greutatea corporală. Contrar acestui fapt, aceeași doză de GH injectată zilnic sporește greutatea corporală și nu are astfel de activitate lipolitică. Aceste studii indică de asemenea că efectul este funcție de doză. Afară de aceasta, IGF-1 se aplica în combinație cu hGH pentru determinarea faptului dacă IGF-1 poate fi antagonist în vederea acțiunii lipolitice a hGH-infuziilor. Surprinzător a fost depistat că combinația a fost mai eficace decât tratamentul numai cu GH, mai ales când GH se administra prin infuzii.

La animalele neobeze infuziile de IGF-1 și injecțiile de GH dădeau un efect anabolic suplimentar, dar IGF-1 în combinație cu GH-infuzii nu îl producea (SU 5.126.324). Din acest motiv surprinzător a fost că combinația IGF-1 și GH (IGF-1- infuzii și GH-infuzii sau GH-injecții) produce un efect lipolitic la mamiferele obeze. Tot surprinzător a fost efectul sinergic al infuziilor de GH și IGF-1 asupra reducerii greutății corporale și masei țesuturilor adipoase, care s-a petrecut la șobolanii obezi.

În exemplul I a fost indicat, că șobolanii pitici obezi (dw/dw) au devenit rezistenți la insulină. GH a avut un efect "diabetogenic", adică asigură rezistența la insulină. Din acest motiv administrarea de GH, în special cu IGF-1, animalelor obeze, în rezultatul căreia conținutul glucozei se reduce (în majoritatea cazurilor) și concentrația insulinei se reduce (în majoritatea cazurilor) este contrar rezultatelor prezise anterior. Din rezultatele surprinzătoare reducerea masei lipidice (adipoase) până la nivelul de pre-obeziitate reconstituie sensibilitatea la insulină în așa mod încât la oamenii suferinzi de obezitate, care primesc tratament cu insulină, administrarea corespunzătoare a GH și IGF-1, cum a fost descris mai sus, contribuie la reducerea cantității de insulină administrată ori o stopează. Terapia cu GH și IGF-1 poate astfel să excludă sau să prevină progresarea diabetului uman de tipul II la pacienții suferinzi de obezitate.

Ar fi de așteptat ca datele obținute cu privire la șobolani să fie extinse pe cai, vaci și alte mamifere, corectând greutatea acestora în conformitate cu procedurile cunoscute veterinar și clinice. Utilizând protocoalele și procedurile standard, veterinar și clinicienii vor avea posibilitatea să regleze dozele, schemele și metodele de administrare a IGF-1 și GH, precum și variantele acestora pentru obținerea unui efect maxim privind tratamentul mamiferelor. În același mod este posibil de efectuat tratamentul uman, cum este relevat în exemplul IV mai jos.

EXEMPLUL IV

Utilizarea GH, IGF-1, sau GH și IGF-1 în tratamentul pacienților umani

Datele clinice au fost obținute ca rezultat al cercetării unor bărbați bolnavi de SIDA de vârstă mijlocie, 39 ani, comparând controlul, administrare numai de IGF-1, numai de GH și de GH în combinație cu IGF-1. În astfel de studii IGF-1 obținut conform tehnologiei descrise în exemplul III a fost administrat pacienților suferinzi de SIDA subcutanat într-o doză de 5 mg de două ori pe zi (circa 80 mg/kg de două ori pe zi, considerând greutatea medie de 60 kg). GH obținut cum a fost descris în exemplul I a fost administrat subcutanat pacienților bolnavi de SIDA în doza de 1,4 mg/zi (cca 23 mg/kg/zi considerând greutatea medie de 60 kg). Pacienții au fost tratați în decurs de 6-12 săptămâni cu acest protocol.

După tratament au fost măsurate schimbările în greutatea masei lipidice (kg) comparativ cu cea inițială, folosind absorbtometria cu raze X cu energie dublă (DEXA), tehnica bine adaptată pentru măsurarea diferiților parametri în organismul uman. În fiecare grupă erau câte 15 pacienți, iar numărul de pacienți rămași pentru tratament peste 12 săptămâni s-a redus până la 9 pentru grupa de control, 6 pentru grupa de GH, 4 pentru grupa de IGF-1 și 6 pentru grupa de GH și IGF-1.

Acest studiu a arătat că după 12 săptămâni de tratament cu combinația din IGF-1 și GH sporirea medie a masei slabe a constituit 7 funți cu reducerea concomitentă a masei lipidice. În majoritatea cazurilor pacientul adăuga 3 kg de masă slabă, dar pierdea 1 kg de grăsime. Administrarea separată de IGF-1 n-a arătat schimbări în placebo, în timp ce administrarea separată a GH a dat o creștere mică de masă slabă fără reducerea greutateii masei lipidice. Rezultatele prezentate grafic, fig. 20 și datele tab.5, indică că pacienții care au primit un tratament combinat au arătat o reducere mai pronunțată a masei lipidice, demonstrând efectul sinergic ca rezultat al administrării hGH în combinație cu IGF-1 în decurs de 12 săptămâni. Un efect analogic s-a observat și după un tratament medicamentos de 6 săptămâni.

Tabelul 5

Masa lipidică peste 12 săptămâni după tratament hormonal

Placebo ± SD*	GH ± SD	IGF-1 ±SD	GH +IGF-1 ± SD
0,00 ± 0,81	0,00 ± 0,83	-0,20 ± 8,0	-1,80 ± 1,94

* SD indică devierile standard.