

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



Mgr. Martina Holubová

**Vliv stabilních agonistů a antagonistů ghrelinového receptoru
na regulaci příjmu potravy**

**Impact of stable ghrelin receptor agonists and antagonists
on food intake regulation**

Dizertační práce

Vedoucí dizertační práce: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha 2014

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze

MARTINA HOLUBOVÁ

.....

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:

HOLUBOVÁ, Martina. *Vliv stabilních agonistů a antagonistů ghrelinového receptoru na regulaci příjmu potravy. [Impact of stable ghrelin receptor agonists and antagonists on food intake regulation]*. Praha, 2014. 143 stran, 3 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i. Vedoucí práce Maletínská, Lenka.

ABSTRAKT

Dizertační práce se zabývá vlivem agonistů a antagonistů ghrelinového receptoru (GHS-R1a) na regulaci příjmu potravy. Ghrelin je doposud jediný známý periferní orexigenní hormon a jediný acylovaný hormon. Agonisté GHS-R1a by mohli být využiti k léčbě kachexie, antagonisté GHS-R1a by mohli sloužit k léčbě obezity.

V první části dizertační práce byli charakterizováni nově navržené peptidové agonisté GHS-R1a. Agonisté byli stabilizováni náhradou Ser³ s esterově vázaným oktanoylem za kyselinu diaminopropionovou, k níž je mastná kyselina vázána stabilní amidovou vazbou, a dále začleněním dalších nekódových aminokyselin. Analogy ghrelinu byly modifikovány záměnou oktanoylu za jiné mastné kyseliny, začleněním druhé mastné kyseliny či zkrácením peptidového řetězce. Většina agonistů GHS-R1a se s vysokou afinitou ($K_i = 10^{-9}$ - 10^{-10} nM) vázala k receptoru GHS-R1a, aktivovala signalizační dráhy ghrelinu a po podkožním (SC) podání myším signifikantně a dlouhodobě zvyšovala příjem potravy.

Ve druhé části dizertační práce byly testovány akutní a dlouhodobé účinky pseudopeptidového agonisty GHS-R1a JMV1843. Jednorázové SC podání JMV1843 sytým myším C57BL/6 vedlo k dávkově závislému zvýšení příjmu potravy ($ED_{50} = 1.94$ mg/kg). Při inkubaci v krevním séru *in vitro* byl JMV1843 stabilní po dobu 24 hod. 10-denní SC podávání JMV1843 štíhlým myším vedlo ke zvýšení příjmu potravy, tělesné hmotnosti a exprese orexigenních neuropeptidů v mediobazálním hypothalamu a snížení exprese termogenního uncoupling proteinu 1 v hnědé tukové tkáni.

Ve třetí části práce byly testovány akutní a dlouhodobé účinky nepeptidových antagonistů GHS-R1a JMV3002 a JMV4208, sloučenin na bázi 1,2,4-triazolu. Jejich jednorázové SC podání hladovým štíhlým myším vedlo k dávkově závislému snížení příjmu potravy ($ED_{50} = 2.05$ a 5.25 mg/kg). Obě sloučeniny byly stabilní v myší krvi *in vivo*. 14-denní podávání myším s obezitou indukovanou vysokotukovou dietou (DIO) vedlo ke snížení příjmu potravy, tělesné hmotnosti (až o 15 %), hmotnosti tukové tkáně a exprese lipogenetických enzymů.

Klíčová slova:

Ghrelin, agonista GHS-R1a, antagonistista GHS-R1a, příjem potravy, myši, kachexie, obezita

ABSTRACT

The thesis is focused on the effect of ghrelin receptor (GHS-R1a) agonists and antagonist on food intake regulation. Ghrelin is the only known peripherally produced orexigenic hormone and the only known acylated hormone. GHS-R1a agonists and antagonists could be useful in the treatment of cachexia and obesity, respectively.

In the first part of the thesis, newly designed peptidic GHS-R1a agonists were characterized. The agonists were stabilized by replacing octanoylated Ser³ with a fatty acid coupled to diaminopropionic acid by a stable amide bond. Other noncoded amino acids were also incorporated. Ghrelin analogs were modified by replacing the octanoyl group with another fatty acid, incorporation of the second fatty acid or shortening the peptide chain. Most of the tested GHS-R1a agonists were found to possess high affinities for GHS-R1a ($K_i = 10^{-9}$ - 10^{-10} nM) and to activate signaling pathways of ghrelin. After subcutaneous (SC) administration to mice, agonists showed significant and prolonged orexigenic effect.

In the second part of the thesis, acute and long-term effects of pseudopeptide GHS-R1a agonist JMV1843 were tested in lean C57BL/6 mice. Acute SC administration of JMV1843 to fed mice increased food intake in a dose-dependent manner ($ED_{50} = 1.94$ mg/kg). JMV1843 was stable in blood serum *in vitro* for 24 h. 10-day treatment with JMV1843 (SC administration) significantly increased food intake, body weight and mRNA expression of the orexigenic neuropeptides in the medial basal hypothalamus and decreased the expression of thermogenic uncoupling protein 1 in brown adipose tissue.

In the third part of the thesis, acute and long-term effects of nonpeptide GHS-R1a antagonists JMV3002 and JMV4208, compounds based on 1,2,4-triazole structure, were tested. Their acute SC administration decreased food intake in fasted lean mice in a dose-dependent manner ($ED_{50} = 5.25$ and 2.05 mg/kg). Both compounds were stable in mouse blood *in vivo*. 14-day treatment with the ghrelin antagonists decreased food intake, body weight, adipose tissue mass and expression of the lipogenesis-promoting enzymes in mice with diet-induced obesity (DIO).

Key words:

Ghrelin, GHS-R1a agonist, GHS-R1a antagonist, food intake, mice, cachexia, obesity

PODĚKOVÁNÍ

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha) za vynikající vedení při mém postgraduálním studiu, za cenné rady a trpělivost jak během provádění experimentů, tak při sepisování mé dizertační práce. Dále děkuji za odborné rady mému konzultantovi prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc. (3. interní klinika, 1. LF UK, Praha). Velké díky patří také Ing. Blance Železné, CSc. (ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha) za podporu, vstřícnost, cenné rady během celého mého studia a připomínky k mé dizertační práci.

Kolektivu skupiny Antiobezitní peptidy (ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha) patří mé poděkování za vytvoření příjemného pracovního prostředí a za pomoc při experimentální části práce.

Dále bych ráda poděkovala dalším spolupracovníkům: Ing. Miroslavě Blechové (ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha) za syntézu peptidů, doc. RNDr. Tomáši Elbertovi, CSc. (ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha) za jodaci peptidů, prof. Jeanu Martinezovi a prof. Jean-Alainovi Fehrentzovi (IBMM, Montpellier, Francie) za poskytnutí nepeptidových analogů ghrelinu a umožnění stáže a experimentů v jejich laboratoři, Céline M'Kadmi (IBMM, Montpellier, Francie) za spolupráci při provádění funkčních studií, RNDr. Zdeně Lacinové, Miloslavě Čechové (3. interní klinika, 1. LF UK, Praha), doc. Ing. Janě Jurčovičové, CSc. a PharmDr. Andree Štofkové, PhD. (Ústav normální, patologické a klinické fyziologie, 3. LF UK, Praha) za stanovování exprese mRNA, PharmDr. Zdeny Pirníkovi, PhD. a RNDr. Alexanderu Kissovi, DrSc. (Ústav experimentální endokrinologie SAV, Bratislava) za izolaci mediobazálního hypothalamu, doc. RNDr. Dr. Davidu Sýkorovi (Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha) za LC-MS analýzu, RNDr. Jaroslavu Kunešovi, DrSc. (Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.) za spolupráci při experimentech na potkanech a kritické připomínky k mé dizertační práci.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a partnerovi za psychickou podporu a trpělivost během mého studia.

Tato práce vznikla s finanční podporou Akademie věd České republiky (výzkumný záměr č. Z40550506 a RVO:61388963), Grantové agentury Univerzity Karlovy (grant č. 560112), Grantové agentury České republiky (granty č. 303/09/0744 a 303/10/1368) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (grant MSMT604613307).

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 10 |
| 1 ÚVOD | 14 |
| 1.1 Ghrelin | 14 |
| 1.1.1 Objev ghrelinu | 14 |
| 1.1.2 Výskyt ghrelinu | 14 |
| 1.1.3 Struktura ghrelinu | 14 |
| 1.1.4 Receptory pro ghrelin | 16 |
| 1.1.5 Signalizace ghrelinu do buňky | 16 |
| 1.1.6 Funkce ghrelinu v organismu | 19 |
| 1.1.6.1 Sekrece růstového hormonu a dalších hormonů | 20 |
| 1.1.6.2 Zapojení ghrelinu v regulaci příjmu potravy | 21 |
| 1.1.6.2.1 Centrální regulace příjmu potravy | 21 |
| 1.1.6.2.2 Periferní hormony podílející se na regulaci příjmu potravy | 23 |
| 1.1.6.2.2.1 Anorexigenní hormony | 23 |
| 1.1.6.2.2.2 Ghrelin – jediný periferní orexigenní hormon | 24 |
| 1.1.7 Analogy ghrelinu a jejich potenciální využití | 26 |
| 1.2 Ghrelin a další agonisté GHS-R1a pro léčbu kachexie | 27 |
| 1.2.1 Kachexie | 27 |
| 1.2.1.1 Zvířecí modely kachexie a anorexie | 28 |
| 1.2.2 Možné využití ghrelinu k léčbě kachexie | 29 |
| 1.2.3 Agonisté GHS-R1a | 30 |
| 1.2.3.1 Peptidy a pseudopeptidy | 30 |
| 1.2.3.1.1 GHRP-6 a od něj odvození agonisté GHS-R1a | 30 |
| 1.2.3.1.2 Agonisté GHS-R1a vytvoření zkrácením či modifikací molekuly ghrelinu | 32 |
| 1.2.3.2 Peptidomimetika | 34 |
| 1.2.3.3 Agonisté GHS-R1a testování jako potenciální léčiva pro terapii kachexie | 35 |
| 1.2.3.4 Další možné využití agonistů GHS-R1a | 35 |
| 1.3 Potenciální klinické aplikace ovlivnění funkce ghrelinu v léčbě obezity | 36 |
| 1.3.1 Obezita | 36 |
| 1.3.1.1 Zvířecí modely obezity | 37 |
| 1.3.2 Možné využití ovlivnění funkce ghrelinu v léčbě obezity | 38 |
| 1.3.2.1 Neutralizace ghrelinu | 38 |
| 1.3.2.2 Inhibice ghrelin-O-acyl transferázy | 39 |
| 1.3.2.3 Antagonisté GHS-R1a jako potenciální antiobezitika | 39 |
| 1.3.2.4 Inverzní agonisté GHS-R1a jako potenciální antiobezitika | 41 |
| 2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE | 43 |
| 3 MATERIÁL | 44 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4 | METODY | 47 |
| 4.1 | Syntéza analogů ghrelinu | 47 |
| 4.1.1 | Syntéza peptidových agonistů receptoru GHS-R1a | 47 |
| 4.1.2 | Syntéza pseudopeptidového agonisty receptoru GHS-R1a JMV1843 | 47 |
| 4.1.3 | Syntéza triazolových antagonistů receptoru GHS-R1a JMV3002 a JMV4208 | 47 |
| 4.2 | Testování analogů ghrelinu <i>in vitro</i> | 48 |
| 4.2.1 | Vazebné experimenty | 48 |
| 4.2.1.1 | Jodace ghrelinu | 48 |
| 4.2.1.2 | Kompetitivní a saturační vazebné experimenty | 48 |
| 4.2.2 | Buněčná signalizace – funkční studie | 50 |
| 4.2.2.1 | Pěstování buněčné linie a transientní transfekce | 50 |
| 4.2.2.2 | Akumulace inositolfosfátu | 50 |
| 4.2.2.3 | Mobilizace intracelulárního kalcia | 50 |
| 4.3 | Testování analogů ghrelinu <i>in vivo</i> | 51 |
| 4.3.1 | Experimentální zvířata | 51 |
| 4.3.2 | Testování akutního účinku analogů ghrelinu na příjem potravy | 51 |
| 4.3.2.1 | Testování agonistů receptoru GHS-R1a | 51 |
| 4.3.2.2 | Testování antagonistů receptoru GHS-R1a | 51 |
| 4.3.2.2.1 | Koadministrace JMV3002 a ghrelinu | 52 |
| 4.3.2.3 | Statistické zpracování dat získaných v krátkodobých experimentech <i>in vivo</i> | 52 |
| 4.3.3 | Testování účinků analogů ghrelinu po dlouhodobém podávání | 53 |
| 4.3.3.1 | Účinky 10-denního podávání JMV1843 štíhlým myším | 53 |
| 4.3.3.1.1 | Vliv JMV1843 na příjem potravy a tělesnou hmotnost | 53 |
| 4.3.3.1.2 | Odběr krve a tkání po 10-denním podávání | 53 |
| 4.3.3.1.3 | Stanovení biochemických parametrů v plazmě | 53 |
| 4.3.3.1.4 | Stanovení exprese mRNA v tukové a svalové tkáni | 53 |
| 4.3.3.1.5 | Stanovení exprese mRNA v mozku | 54 |
| 4.3.3.2 | Účinky 14-denního podávání JMV3002 a JMV4208 obézním myším | 55 |
| 4.3.3.2.1 | Myší model obezity indukované podáváním vysokotukové diety | 55 |
| 4.3.3.2.2 | Vliv JMV3002 a JMV4208 na příjem potravy a tělesnou hmotnost | 56 |
| 4.3.3.2.3 | Odběr krve a tkání po 14-denním podávání | 56 |
| 4.3.3.2.4 | Stanovení biochemických parametrů v plazmě | 56 |
| 4.3.3.2.5 | Stanovení exprese mRNA v tukové tkáni a játrech | 56 |
| 4.3.3.2.6 | Stanovení exprese mRNA v mozku | 57 |
| 4.3.3.3 | Statistické vyhodnocení dat získaných v dlouhodobých experimentech | 57 |
| 4.4 | Farmakokinetika | 57 |
| 4.4.1 | Farmakokinetika vybraných peptidových analogů ghrelinu | 57 |
| 4.4.2 | Stabilita a farmakokinetika JMV1843 | 57 |
| 4.4.3 | Farmakokinetika JMV3002 a JMV4208 | 58 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5 | VÝSLEDKY | 59 |
| 5.1 | Dlouhodobě působící peptidoví agonisté receptoru GHS-R1a | 59 |
| 5.1.1 | První série stabilních peptidových agonistů GHS-R1a s prodlouženým orexigenním účinkem | 59 |
| 5.1.2 | Syntéza peptidových agonistů GHS-R1a | 61 |
| 5.1.3 | Testování peptidových agonistů GHS-R1a <i>in vitro</i> | 61 |
| 5.1.4 | Testování peptidových agonistů GHS-R1a <i>in vivo</i> | 67 |
| 5.1.5 | Farmakokinetika vybraných peptidových analogů GHS-R1a | 72 |
| 5.2 | Pseudopeptidový agonista GHS-R1a JMV1843 | 73 |
| 5.2.1 | Akutní účinek JMV1843 na příjem potravy | 73 |
| 5.2.2 | Stabilita a farmakokinetika JMV1843 | 74 |
| 5.2.3 | Účinky JMV1843 po dlouhodobém podávání štíhlým myším | 75 |
| 5.3 | Nepeptidoví antagonisté GHS-R1a JMV3002 a JMV4208 | 80 |
| 5.3.1 | Akutní účinek JMV3002 a JMV4208 na příjem potravy | 80 |
| 5.3.2 | Farmakokinetika JMV3002 a JMV4208 <i>in vivo</i> | 80 |
| 5.3.3 | Účinky JMV3002 a JMV4208 po dlouhodobém podávání obézním myším | 83 |
| 6 | DISKUZE | 90 |
| 6.1 | Dlouhodobě působící peptidoví agonisté receptoru GHS-R1a | 90 |
| 6.2 | Pseudopeptidový agonista GHS-R1a JMV1843 | 92 |
| 6.3 | Nepeptidoví antagonisté GHS-R1a JMV3002 a JMV4208 | 94 |
| 6.4 | Perspektiva analogů ghrelinu pro terapeutické využití | 97 |
| 6.4.1 | Agonisté GHS-R1a pro léčbu kachexie a anorexie | 97 |
| 6.4.2 | Antagonisté GHS-R1a pro léčbu obezity | 98 |
| 7 | ZÁVĚRY | 100 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 101 |
| | SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ | 117 |
| | PŘÍLOHY | 118 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|---------------|---|
| ACACA | acetyl-CoA karboxyláza 1 (acetyl-CoA carboxylase 1) |
| ACTH | adrenokortikotropní hormon (adrenocorticotropic hormone) |
| ada | adamantanacetyl |
| AgRP | protein příbuzný signálnímu proteinu agouti (agouti-related protein) |
| Aib | kyselina α -aminoisomáselná (α -aminoisobutyric acid) |
| AMP | adenosinmonofosfát (adenosine monophosphate) |
| AMPK | proteinkináza aktivovaná AMP (AMP activated proteinkinase) |
| α -MSH | hormon stimulující melanocyty (α -melanocyte-stimulating hormone) |
| ANOVA | analýza rozptylu (analysis of variance) |
| AP | <i>area postrema</i> |
| ARC | <i>nucleus arcuatus</i> |
| AT | tuková tkáň (adipose tissue) |
| ATP | adenosintrifosfát (adenosine triphosphate) |
| AUC | plocha pod křivkou (area under curve) |
| B2M | β_2 -mikroglobulin (β_2 -microglobulin) |
| BAT | hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue) |
| BMI | index tělesné hmotnosti (body mass index) |
| BPTI | hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (bovine pancreatic trypsin inhibitor) |
| bromoact | bromooktanoyl |
| BSA | hovězí sérový albumin (bovine serum albumin) |
| CaMKK | Ca^{2+} /kalmodulin dependentní proteinkináza II (Ca^{2+} /calmodulin dependent kinase kinase) |
| cAMP | cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate) |
| CART | transkript regulovaný kokainem a amfetaminem (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) |
| Cha | cyklohexylalanin |
| CHO-K | buněčná linie z ovarií čínského křečka (Chinese hamster ovary) |
| C_{max} | maximální koncentrace (maximum concentration) |
| CNS | centrální nervová soustava (central nervous system) |
| CPT-1 | karnitinpalmitoyl transferáza 1 (carnitine palmitoyltransferase 1) |
| CRH | hormon uvolňující kortikotropin (corticotropin-releasing hormone) |
| Ct | minimální počet cyklů, při němž fluorescence vzorku překročí prahovou hodnotu (threshold cycle) |
| DAG | 1,2-diacylglycerol (diacylglycerol) |

| | |
|----------|--|
| dec | dekanoyl |
| decen | decenoyl |
| DIO | obezita indukovaná podáváním vysokotukové diety (diet-induced obesity) |
| DMEM | kultivační médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) |
| DMH | dorzomediální jádro hypothalamu (dorsomedial hypothalamic nucleus) |
| DMX | dorzální motorické jádro <i>nervu vagu</i> |
| Dpr | diaminopropionová kyselina (diaminopropionic acid) |
| ELISA | enzymoimunochemické stanovení (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| FABP-4 | protein vázající mastné kyseliny 4 (fatty acid binding protein 4) |
| FASN | syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase) |
| FBS | fetální hovězí sérum (fetal bovine serum) |
| FFA | volné mastné kyseliny (free fatty acids) |
| Fmoc | fluorenylmethyloxykarbonyl (fluorenylmethyloxycarbonyl) |
| GABA | kyselina γ -aminomáselná (gamma-aminobutyric acid) |
| GAPDH | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) |
| GH | růstový hormon (growth hormone) |
| GHRP | peptid uvolňující růstový hormon (growth hormone-releasing peptide) |
| GHS | syntetické peptidy stimulující sekreci růstového hormonu (growth hormone secretagogues) |
| GHRH | somatoliberin (growth hormone-releasing hormone) |
| GHS-R1a | receptor pro ghrelin (growth hormone secretagogue receptor 1a) |
| Glc | glukóza (glucose) |
| Gly | glycin |
| GLP | peptid podobný glukagonu (glucagon-like peptide) |
| GOAT | ghrelin-O-acyl transferáza (ghrelin O-acyl transferase) |
| HBSS | Hanksův vyvážený solný roztok (Hanks' Balanced Salt Solution) |
| HEK-293T | buněčná linie odvozená z lidských embryonálních ledvinných buněk (human embryonal kidney) |
| HEPES | kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) |
| HF | vysokotuková dieta (high fat) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography) |
| HTRF | homogenní časově rozlišená fluorescence (homogeneous time resolved fluorescence) |

| | |
|-----------------|--|
| ICV | intracerebroventrikulární, do mozkové komory (<i>intra cerebri ventriculi</i>) |
| ID | intradermální, do kůže (<i>intra derma</i>) |
| IGF-1 | inzulínu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1) |
| IML | intermediolaterální sloupec |
| IL | interleukin (interleukin) |
| IP | intraperitoneální, do břišní dutiny (<i>intra peritoneum</i>) |
| IP ₁ | inositolfosfát (inositol monophosphate) |
| IP ₃ | inositoltrifosfát (inositol trisphosphate) |
| IV | nitrožilní (<i>intra venam</i>) |
| K _d | rovnovážná disociační konstanta radioligandu |
| K _i | rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu |
| KO | vyřazený gen (knock-out) |
| LC-MS | kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography – mass spectrometry) |
| LH | laterální hypothalamus (lateral hypothalamus) |
| LLC | karcinom plic Lewisové (Lewis lung carcinoma) |
| LPL | lipoproteinová lipáza (lipoprotein lipase) |
| LPS | lipopolysacharid (lipopolysaccharide) |
| IPAT | intraperitoneální tuková tkáň (intraperitoneal adipose tissue) |
| MBH | mediobazální hypothalamus (mediobasal hypothalamus) |
| MHC-4 | těžký řetězec myosinu 4 (myosin heavy chain 4) |
| mRNA | mediátorová RNA (messenger ribonucleic acid) |
| MS | hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry) |
| mTOR | cílová molekula pro účinek rapamycinu u savců (mammalian target of rapamycin) |
| myr | myristoyl |
| Nal | naftylalanin |
| NPY | neuropeptid Y (neuropeptide Y) |
| NTS | <i>nucleus tractus solitarius</i> |
| oct | oktanoyl |
| palm | palmitoyl |
| PCR | polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction) |
| PEG | polyethylenglykol 300 (polyethylene glycol 300) |
| PEI | polyethylenimin (polyethylenimine) |
| PEPCK | fosfoenolpyruvát karboxykináza (phosphoenolpyruvate carboxykinase) |
| PF | párově krmené myši (pair-fed) |
| Phe | fenylalanin |

| | |
|--------------------|--|
| PheCl ₂ | dichlorfenylalanin |
| PheNO ₂ | nitrofenylalanin |
| PKC | proteinkináza C (proteinkinase C) |
| PLC | fosfolipáza C (phospholipase C) |
| PO | perorální (<i>per os</i>) |
| POMC | proopiomelanokortin (proopiomelanocortin) |
| PRL | prolaktin (prolactin) |
| PVN | paraventrikulární jádro hypothalamu (paraventricular nucleus) |
| PYY | peptid tyrosin-tyrosin (peptide tyrosine tyrosine) |
| RIA | radioimunochemické stanovení (radioimmunoassay) |
| RNA | ribonukleová kyselina (ribonucleic acid) |
| rRNA | ribozomální RNA |
| RP-HPLC | HPLC s obrácenými fázemi (reverse-phase HPLC) |
| Sar | sarkosin |
| SC | podkožní (<i>sub cutem</i>) |
| SCAT | podkožní tuková tkáň (subcutaneous adipose tissue) |
| SCD-1 | stearoyl-CoA desaturáza (stearoyl-CoA desaturase) |
| SEM | střední chyba průměru (standard error of mean) |
| Ser | serin |
| SIRT1 | sirtuin1 |
| SREBP | protein vázající sterolový regulační element (sterol regulatory element-binding protein) |
| T _{1/2} | biologický poločas |
| tBu | tercbutylalanin |
| TG | triglyceridy |
| T _{max} | čas, v němž je dosažena maximální koncentrace |
| TNF-α | faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α) |
| TRH | hormon uvolňující thyrotropin (thyrotropin-releasing hormone) |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| UCP | rozpojovací protein (uncoupling protein) |
| undecyn | undecynoyl |
| VMH | ventromediální hypothalamus (ventromedial hypothalamus) |

1 ÚVOD

1.1 Ghrelin

1.1.1 Objev ghrelinu

Ghrelin je doposud jediný popsáný periferní orexigenní hormon. Byl objeven v roce 1999 Kojimou a spolupracovníky. Ghrelin byl izolován z potkaního žaludku a identifikován jako přirozený ligand tzv. sirotčího receptoru GHS-R1a (z angl. growth hormone secretagogue receptor 1a) specifického pro skupinu syntetických látek podporujících vylučování růstového hormonu (GH, z angl. growth hormone) z hypofýzy (GHS, z angl. growth hormone secretagogues) (Kojima *et al.* 1999; Kojima *et al.* 2001).

1.1.2 Výskyt ghrelinu

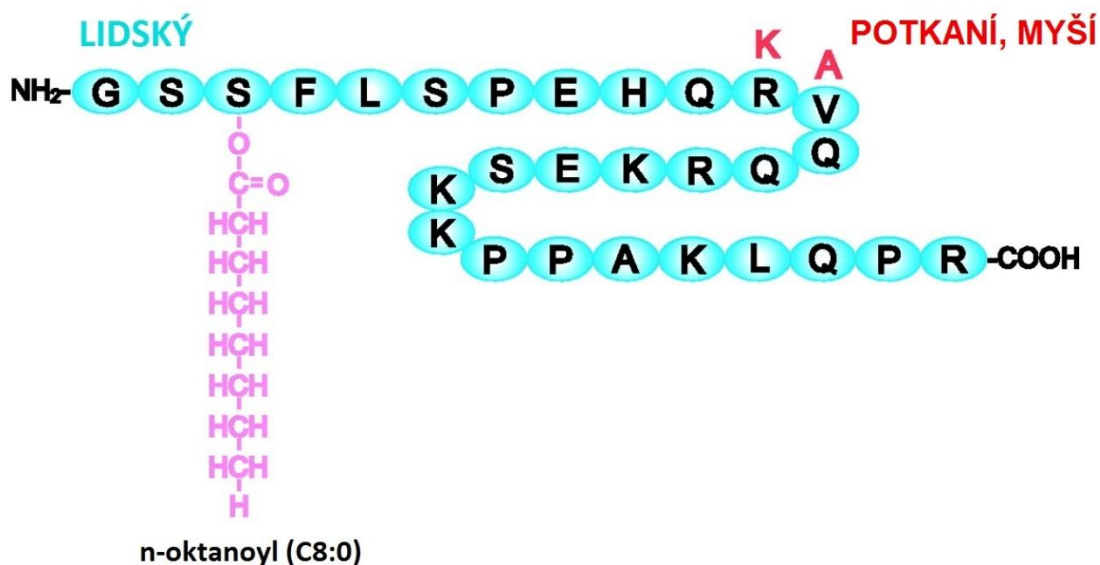
Ghrelin je sekretován zejména buňkami sliznice žaludku, přičemž jeho hladina roste bezprostředně před jídlem a klesá na minimum během hodiny po jídle. V menší míře je ghrelin produkován také dalšími tkáněmi, mimo jiné hypothalamickými neurony. Malá množství ghrelinu byla detekována také v hypofýze, střevech, pankreatu, ledvinách, placentě, varlatech a plicích (van der Lely *et al.* 2004; Depoortere 2009; Wissler *et al.* 2010; Nass *et al.* 2011; Scerif *et al.* 2011).

1.1.3 Struktura ghrelinu

Preproghrelin je tvořen 117 aminokyselinami. Po odštěpení signálního peptidu tvořeného 23 aminokyselinami vzniká segment tvořený 94 aminokyselinami, který je označován jako proghrelin. Jeho dalším štěpením pak vzniká ghrelin a C-terminální peptid C-ghrelin, z něhož se odštěpuje 23-aminokyselinový obestatin (Delporte 2013).

Ghrelin je peptid tvořený 28 aminokyselinami. Hydroxylová skupina serinového zbytku v pozici 3 je posttranslačně esterifikována n-oktanovou kyselinou. Tato modifikace, zprostředkovaná enzymem ghrelin-O-acyl transferázou (GOAT), je mezi hormony unikátní a je zásadní pro biologickou aktivitu ghrelinu (Kojima *et al.* 1999; Yang *et al.* 2008). Na základě strukturně-aktivitních studií na buňkách se zvýšenou expresí receptoru pro ghrelin bylo prokázáno, že minimální aktivní sekvencí zachovávající většinu biologické aktivity kompletního řetězce ghrelinu je N-terminální tetrapeptid s n-oktanoylovou skupinou na serinu v pozici 3 (Bednarek *et al.* 2000; Matsumoto *et al.* 2001).

Struktura lidského, potkaního a myšího ghrelinu je znázorněna na obr. 1. Potkaní ghrelin se od lidského odlišuje pouze ve dvou aminokyselinách (namísto argininu v pozici 11 obsahuje lysin a místo valinu v pozici 12 alanin). Aminokyselinová sekvence potkaního a myšího ghrelinu je shodná (Kojima & Kangawa 2005).



Obr. 1 Struktura lidského, potkaního a myšího ghrelinu. Upraveno podle zdroje (Kojima & Kangawa 2005).

Vzhledem k labilitě esterové vazby je oktanoylováno jen 10-20 % celkového ghrelinu v krvi. Role neoktanoylované formy ghrelinu (tzv. des-acyl ghrelinu) je doposud nejasná (Depoortere 2009). Des-acyl ghrelin byl dlouhou dobu považován za pouhý produkt degradace acylovaného ghrelinu bez vlastní biologické aktivity, protože ve fyziologických koncentracích není schopen vázat a aktivovat ghrelinový receptor. V poslední době však přibývá publikací, podle nichž hraje des-acyl ghrelin roli v řadě fyziologických a patofyziologických situací a v závislosti na podmínkách může být agonistou či antagonistou ghrelinu nebo účinkovat nezávisle na ghrelinu. Z publikovaných účinků des-acyl ghrelinu lze jmenovat např. inhibici účinku ghrelinu u hlodavců a lidí, snižování množství tukové tkáně u hlodavců, zlepšení svalové regenerace u hlodavců nebo zlepšení citlivosti k inzulínu a snížení postprandiální glykémie u hlodavců a lidí (Delhanty *et al.* 2012, 2014).

Mimo n-oktanoylovaného ghrelinu a des-acyl ghrelinu byly popsány ještě další formy ghrelinu, vznikající ze stejného prekurzoru (preproghrelinu): dekanoylovaný (C10:0) a decenoylovaný (C10:1) ghrelin (Hosoda *et al.* 2003).

1.1.4 Receptory pro ghrelin

Receptor pro ghrelin (GHS-R1a) byl původně popsán jako sirotčí receptor specifický pro GHS (Howard *et al.* 1996). Později byl identifikován ghrelin jako přirozený ligand receptoru GHS-R1a a také jako endogenní mediátor uvolňování růstového hormonu (Kojima *et al.* 1999). GHS-R1a je jedinou formou ghrelinového receptoru schopnou vázat ghrelin, případně v suprafyziologické koncentraci des-acyl ghrelin. V největší míře se nachází v *nucleu arcuatu* (ARC) v hypothalamu, kde jeho interakce s ghrelinem vyvolává zvýšení chuti k jídlu, dále pak v somatotropních buňkách hypofýzy, kde interakce ghrelinu s receptorem stimuluje uvolňování růstového hormonu, a konečně v buňkách imunitního systému, kde receptor zprostředkovává regulaci imunitní odpovědi (Howard *et al.* 1996; Smith *et al.* 1997; Dixit *et al.* 2004; Hosomi *et al.* 2008). Receptor GHS-R1a vykazuje vysokou konstitutivní aktivitu, což může být zásadní pro udržování stimulace příjmu potravy i tehdy, pokud je ghrelin na bazální hladině (Chollet *et al.* 2009).

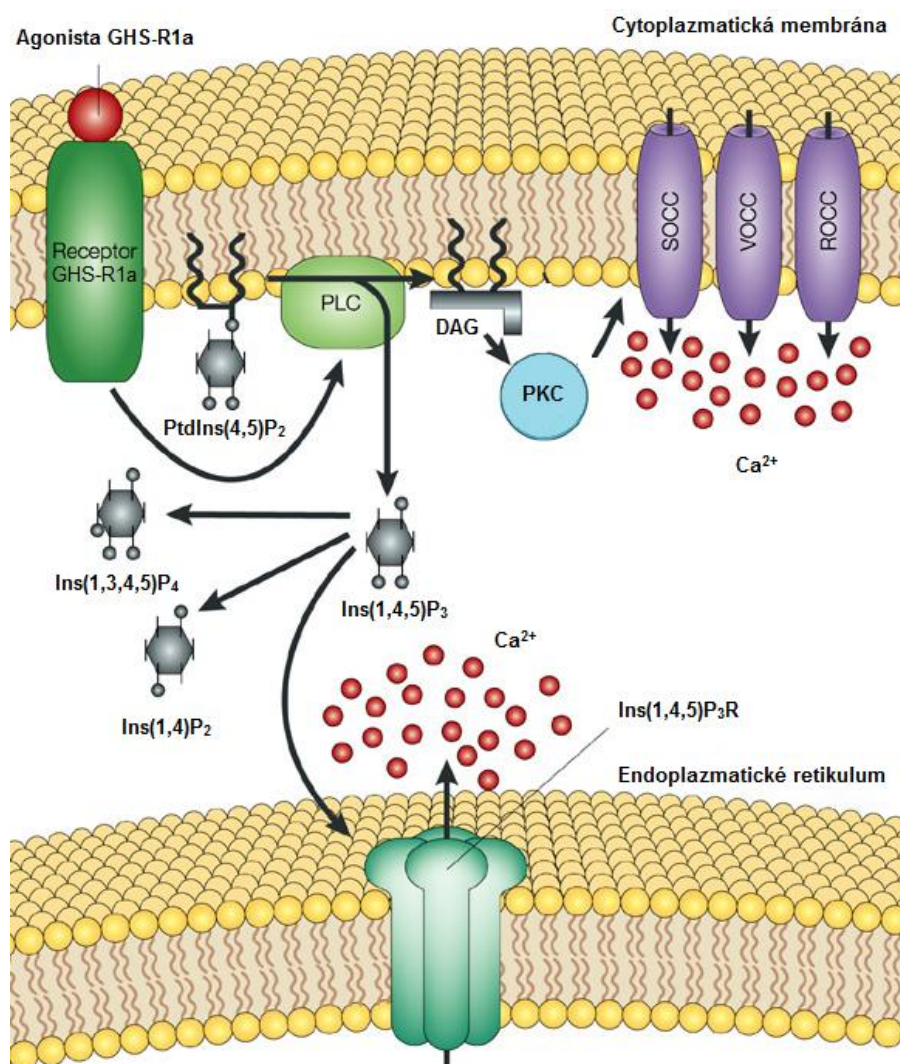
Receptor GHS-R1b, který byl v minulosti pokládán za biologicky neaktivní, je dnes považován za modulátor signalizace receptoru GHS-R1a. Bylo zjištěno, že může s receptorem GHS-R1a tvořit heterodimer a snižovat tím jeho konstitutivní aktivitu (Leung *et al.* 2007; Chow *et al.* 2012; Delporte 2013).

Předpokládá se, že des-acyl ghrelin účinkuje přes vlastní receptor, ten však dosud nebyl identifikován (Delporte 2013).

1.1.5 Signalizace ghrelinu do buňky

GHS-R1a je receptor se sedmi transmembránovými doménami spřažený s G-proteiny. Do vazby ke G-proteinu je zapojena třetí intracelulární smyčka receptoru GHS-R1a; tuto smyčku receptor GHS-R1b postrádá a nemůže tedy s G-proteiny interagovat. Bylo popsáno několik mechanismů, které receptor GHS-R1a využívá k přenosu signálu do buňky. Nejlépe charakterizovaná je dráha vedoucí k nárůstu hladiny intracelulárního kalcia, která využívá systém fosfolipázy C (PLC). Aktivace receptoru vazbou ghrelinu či jiného ligandu vede k aktivaci podjednotek G-proteinu a následné stimulaci produkce PLC. PLC štěpí membránový lipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát za vzniku druhých posílů inositoltrifosfátu (IP₃) a diacylglycerolu (DAG). IP₃ zprostředkovává uvolnění Ca²⁺ iontů z endoplazmatického retikula a zvýšení hladiny intracelulárních Ca²⁺ iontů. DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC), což vede k inhibici draslíkových kanálů, depolarizaci buněčné membrány, otevření napěťově řízených

kalciových kanálů a pronikání extracelulárního kalcia do buňky (Kojima & Kangawa 2005; Delporte 2013; Yin *et al.* 2014). Popsaný mechanismus je znázorněn na obr. 2.



Obr. 2 Signalizace ghrelinu do buňky prostřednictvím dráhy fosfolipázy C vedoucí k nárůstu koncentrace intracelulárního kalcia. DAG: diacylglycerol; Ins(1,4,5)P₃: inositoltrifosfát; PLC: fosfolipáza C; PKC: proteinkináza C; PtdIns(4,5)P₂: fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát; ROCC: receptorem řízený kalciový kanál; SOCC: ligandem řízený kalciový kanál; VOCC: napětově řízený kalciový kanál. Upraveno podle zdroje (Cullen & Lockyer 2002).

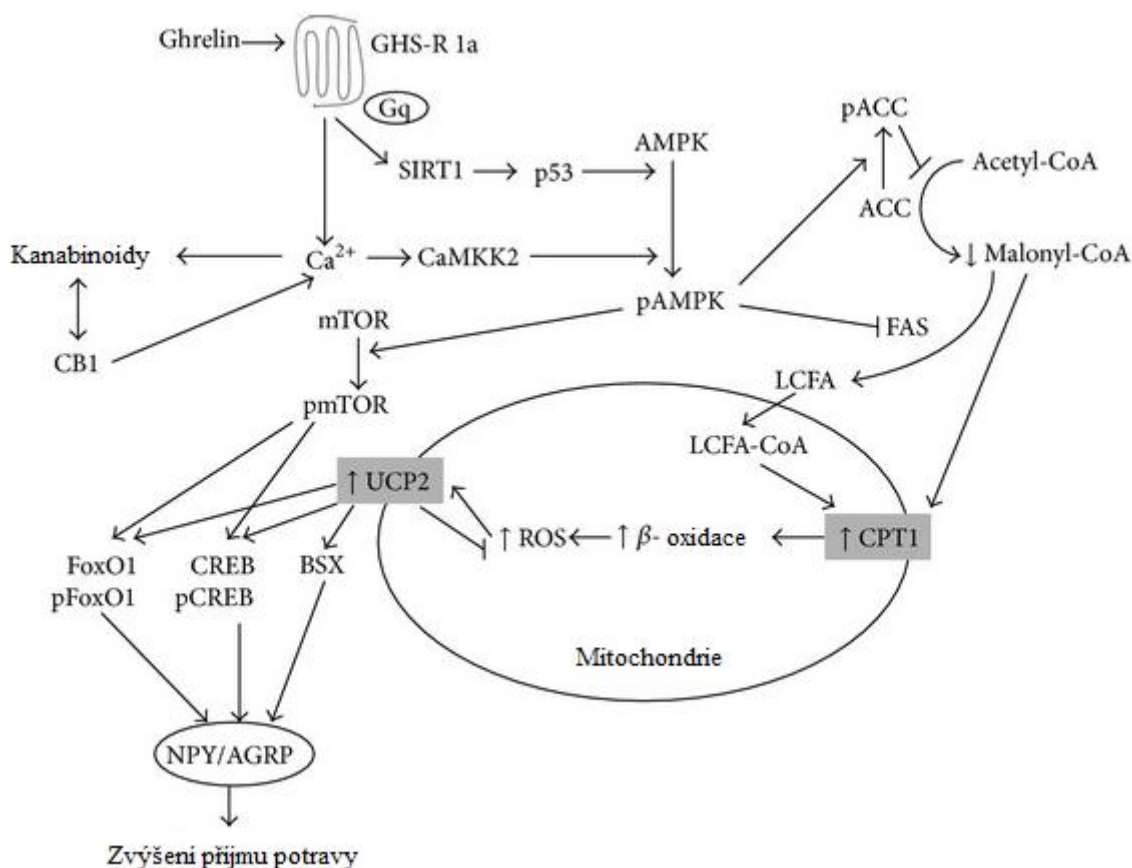
Byla také popsána alternativní dráha vedoucí ke zvýšení hladiny intracelulárního kalcia. Tato dráha využívá aktivace kalciových kanálů proteinkinázou A, což je enzym aktivovaný druhým poslem cAMP (Kohno *et al.* 2003). Některé studie ovšem tento mechanismus zpochybňují a uvádějí, že ghrelin, endogenní ligand GHS-R1a, nemá vliv na zvýšení hladiny cAMP (Yin *et al.* 2014).

Důležitou roli v signalizaci ghrelinu hraje také proteinkináza aktivovaná AMP (AMPK). Jak je zřejmé z názvu, stimulatorem aktivity AMPK je vysoký poměr AMP/ATP. AMPK je považována za hlavní metabolický senzor zajišťující udržení energetické homeostáze, podílí se na centrální regulaci příjmu potravy a výdeje energie a je zapojena do signalizačních drah spojujících periferie s hypothalamem, hlavním centrem regulace příjmu potravy v mozku. Výše popsané zvýšení hladiny intracelulárních Ca^{2+} iontů vede k aktivaci Ca^{2+} /kalmmodulin dependentní proteinkinázy II (CaMKK), která pak fosforyluje AMPK na Thr¹⁷² a tím ji aktivuje. Aktivovaná AMPK fosforyluje acetyl-CoA karboxylázu (ACACA), čímž inhibuje její funkci, snižuje hladinu malonyl-CoA a prostřednictvím karnitinpalmitoyl transferázy 1 (CPT-1) konečně vede ke zvýšení β -oxidace mastných kyselin. Vedlejším produktem zvýšené mitochondriální respirace je tvorba reaktivních forem kyslíku, následně se stimuluje aktivita uncoupling proteinu 2 (UCP-2) odstraňujícího tyto reaktivní formy kyslíku a tím dochází v hypothalamu ke stimulaci transkripce orexigenních peptidů neuropeptidu Y (NPY) a agouti-related proteinu (AgRP), o nichž jsou uvedeny další informace v oddíle 1.1.6.2.1 (Andersson *et al.* 2004; Woods *et al.* 2005; Hardie 2008; Delporte 2013).

Ghrelín také v hypothalamu aktivuje sirtuin 1 (SIRT1), což je deacetyláza, která se aktivuje v odpovědi na kalorickou restrikcii a účinkuje prostřednictvím tumor supresoru p53. Tato dráha je dalším možným mechanismem aktivace AMPK (Velásquez *et al.* 2011).

Aktivace AMPK může kromě výše zmíněné stimulace mitochondriální respirace vést také k aktivaci nebo inhibici mTOR (cílová molekula pro účinek rapamycinu u savců, z angl. mammalian target of rapamycin), což je Ser/Thr kináza sloužící jako buněčný senzor změn energetické rovnováhy a také jako senzor růstových faktorů, živin a kyslíku. Je regulována poměrem AMP/ATP. V *nucleu arcuatu* v hypothalamu je mTOR působením AMPK aktivován, což pak prostřednictvím řady transkripčních faktorů vede k aktivaci orexigenních peptidů NPY a AgRP (Martins *et al.* 2012; Delporte 2013; Stevanovic *et al.* 2013).

Mechanismy zapojené v signalizaci ghrelinu do buňky, které vedou ke zvýšení příjmu potravy, jsou znázorněny na obr. 3.

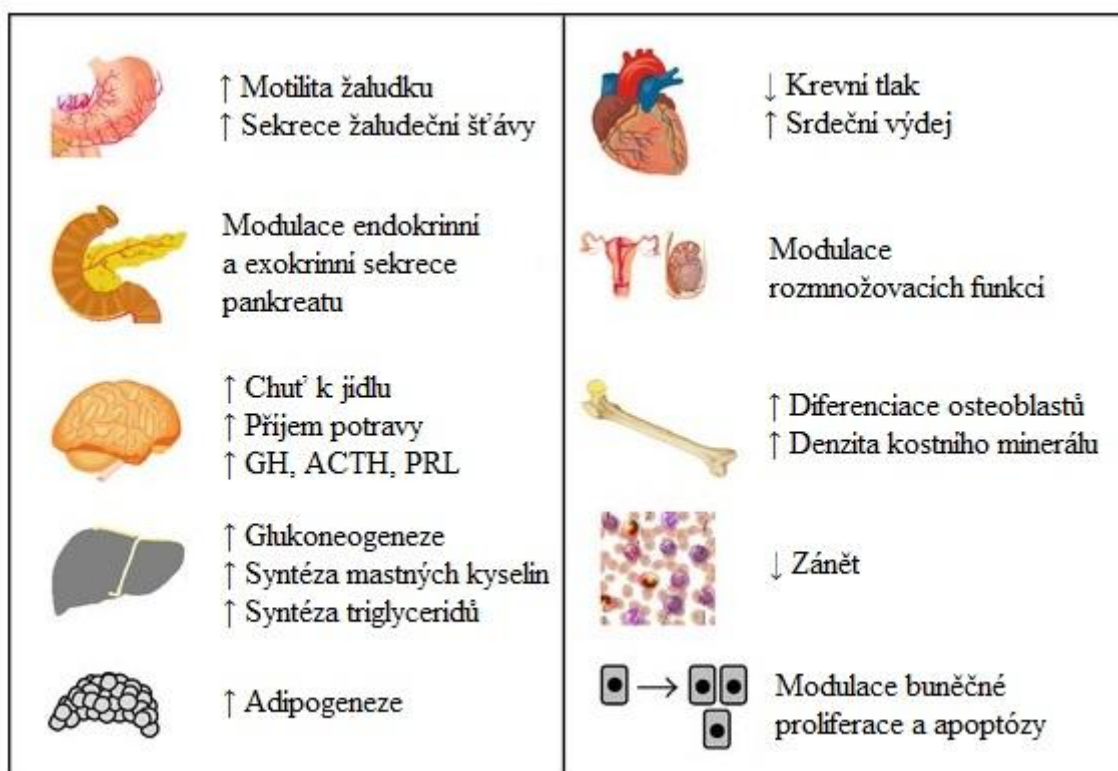


Obr. 3 Molekulární mechanismy zapojené do zvýšení příjmu potravy vlivem ghrelinu.

ACC: acetyl-CoA karboxyláza; AGRP: agouti-related protein; AMPK: proteinkináza aktivovaná AMP; CaMKK2: Ca^{2+} /kalmodulin dependentní proteinkináza 2; CB1: kanabinoidní receptor; CPT1: karnitinpalmitoyl transferáza 1; FAS: syntáza mastných kyselin; GHS-R1a: ghrelinový receptor; LCFA: mastná kyselina s dlouhým řetězcem; mTOR: cílová molekula pro účinek rapamycinu u savců; NPY: neuropeptid Y; ROS: reaktivní formy kyslíku; SIRT1: sirtuin 1; UCP2: uncoupling protein-2; BSX, CREB, FoxO1: transkripční faktory. Upraveno podle zdroje (Delporte 2013).

1.1.6 Funkce ghrelinu v organismu

Ghrelin ovlivňuje řadu významných fyziologických funkcí. K nejdříve známým účinkům ghrelinu patří již zmíněná stimulace sekrece růstového hormonu, sekrece prolaktinu a adrenokortikotropního hormonu, dále pak účast na regulaci příjmu potravy, vliv na motilitu žaludku, žaludeční sekreci, funkci slinivky břišní a na metabolismus glukózy a lipidů. Byly také popsány kardioprotektivní a protizánětlivé účinky ghrelinu a také jeho účinky na paměť, reprodukci, spánek a chování (Kojima & Kangawa 2005; Delporte 2013). Nejdůležitější fyziologické funkce ghrelinu jsou shrnuty na obr. 4.



Obr. 4 Hlavní fyziologické funkce ghrelinu. GH: růstový hormon; ACTH: adrenokortikotropní hormon; PRL: prolaktin. Upraveno podle zdroje (Delporte 2013).

1.1.6.1 Sekrece růstového hormonu a dalších hormonů

Bylo zjištěno, že ghrelin je účinným stimulátorem sekrece růstového hormonu v somatotropních buňkách hypofýzy (Date *et al.* 2000; Takaya *et al.* 2000). Také byl prokázán synergistický vztah mezi ghrelinem a somatoliberinem (GHRH, z angl. growth hormone-releasing hormone); společná aplikace obou peptidů v nízkých dávkách významně zvyšuje sekreci růstového hormonu (Arvat *et al.* 2001; Hataya *et al.* 2001). Mutace ghrelinového receptoru vedoucí ke ztrátě jeho konstitutivní aktivity způsobují sníženou sekreci růstového hormonu a následné poruchy růstu (Pantel *et al.* 2006). Potenciální terapeutické účinky analogů ghrelinu v léčbě deficiencie růstového hormonu jsou předmětem intenzivního zájmu (Delporte 2013).

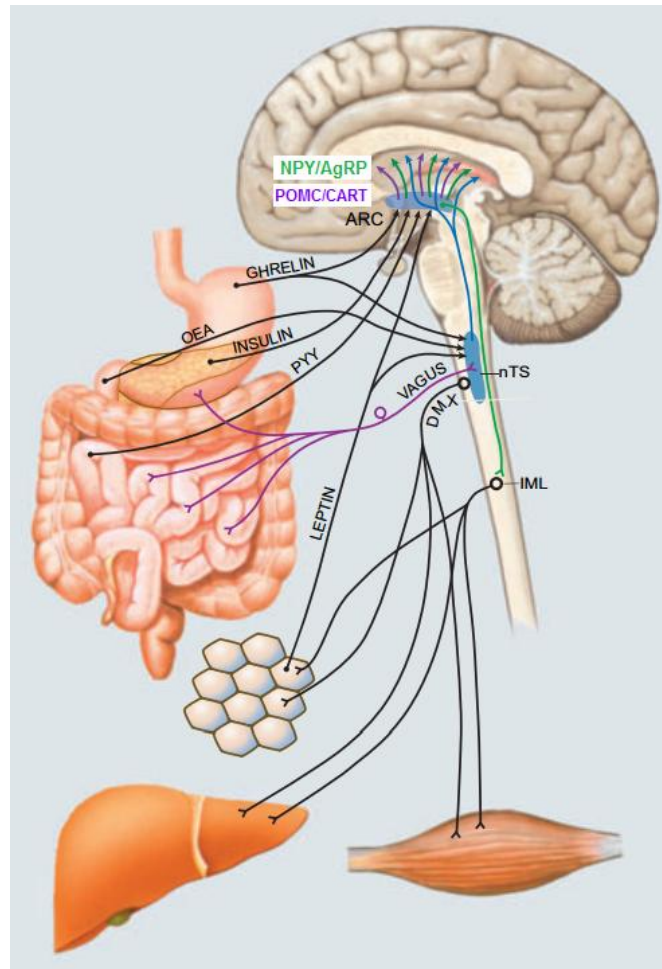
Zdá se, že také des-acyl ghrelin může ovlivňovat sekreci růstového hormonu, pravděpodobně prostřednictvím osy GH-IGF-1 (Ariyasu *et al.* 2005).

Ghrelin, stejně jako některé syntetické GHS, také kromě sekrece růstového hormonu stimuluje v hypothalamu sekreci adrenokortikotropního hormonu, kortizolu a prolaktinu (van der Lely *et al.* 2004).

1.1.6.2 Zapojení ghrelinu v regulaci příjmu potravy

1.1.6.2.1 Centrální regulace příjmu potravy

Za hlavní oblasti centrální nervové soustavy (CNS) zodpovědné za regulaci příjmu potravy a energetické homeostáze jsou považovány hypothalamus a mozkový kmen. Tyto oblasti mozku přijímají a integrují periferní nervové a hormonální signály nesoucí informaci o aktuálním nutričním stavu a adipozitě (obr. 5) (Sam *et al.* 2012).



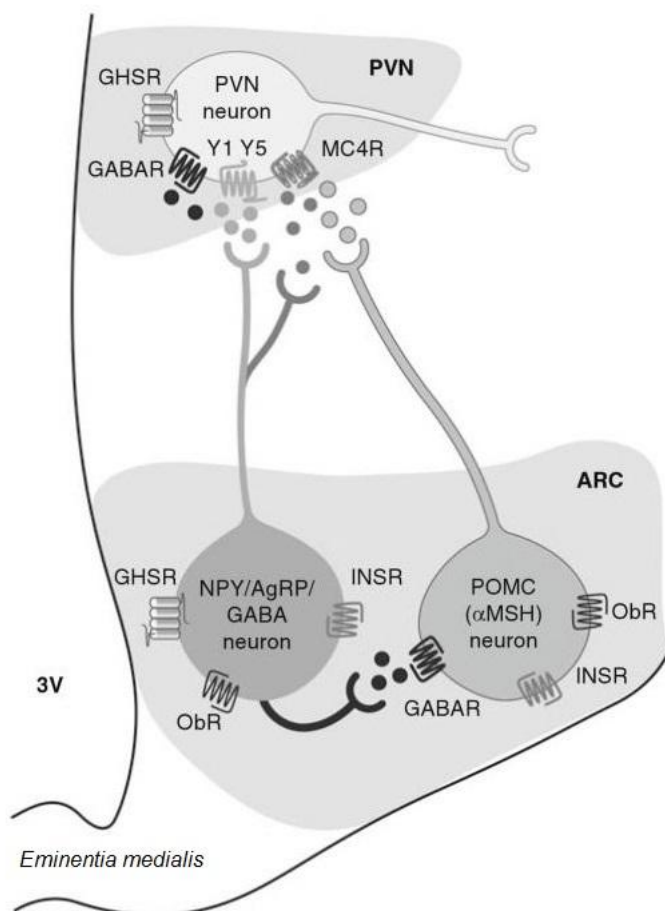
Obr. 5 *Integrace periferních metabolických signálů v hypothalamu a mozkovém kmeni.* Nucleus arcuatus (ARC) v hypothalamu a nucleus tractus solitarius (NTS) v mozkovém kmeni přijímají informace o dostupnosti živin a stavu energetických zásob od periferních hormonů, buďto přímo z krevního oběhu, nebo prostřednictvím nervu vagu. Primární NPY/AgRP a POMC/CART neurony v ARC obsahují receptory pro tyto periferní hormony. Některé z hormonů působí i v NTS, DMX (dorzální motorické jádro nervu vagu) a IML (intermediolaterální sloupec). OEA: oleyethanolamid (anorexigenní lipidový mediátor); PYY: peptid tyrosin tyrosin. Upraveno podle zdroje (Broberger 2005).

Nejdůležitějším hypothalamickým jádrem podílejícím se na regulaci příjmu potravy je *nucleus arcuatus* (ARC), nacházející se na spodině hypothalamu po obou stranách třetí mozkové komory. V ARC se nacházejí dvě populace neuronů s opačným účinkem na příjem potravy. Mediálně lokalizované orexigenní neurony (stimulující příjem potravy) exprimují NPY a AgRP, zatímco anorexigenní neurony (inhibující příjem potravy) lokalizované v laterální části ARC produkují štěpný produkt proopiomelanokortinu (POMC) - hormon stimulující melanocyty (α -MSH) - a transkript regulovaný kokainem a amfetaminem (CART). Na těchto primárních NPY/AgRP a POMC/CART neuronech se nacházejí receptory pro periferní hormony regulující příjem potravy; orexigenní hormony stimulují expresi NPY a AgRP, anorexigenní hormony naopak stimulují expresi POMC a CART. NPY/AgRP neurony mohou potlačovat aktivitu POMC/CART neuronů prostřednictvím inhibičního neurotransmiteru kyseliny γ -aminomáselné (GABA). ARC sousedí s oblastí hypothalamu označovanou *eminentia medialis*, kde je nekompletní a tedy částečně prostupná hematoencefalická bariéra, proto tudy cirkulující periferní hormony mohou procházet a přímo ovlivňovat neurony v ARC. Hormony produkované gastrointestinálním traktem poskytují ARC krátkodobý signál o dostupnosti živin, zatímco hormony jako inzulin, leptin a ghrelin poskytují dlouhodobější informaci o stavu energetických zásob. NPY/AgRP a POMC/CART neurony směřují do paraventriculárního jádra hypothalamu (PVN) (obr. 6) (Cowley *et al.* 2003; Harrold *et al.* 2012; Sam *et al.* 2012; Keen-Rhinehart *et al.* 2013).

K dalším oblastem podílejícím se na regulaci příjmu potravy se kromě ARC řadí paraventriculární jádro hypothalamu (PVN), dorzomediální jádro hypothalamu (DMH), ventromediální hypothalamus (VMH) a laterální hypothalamus (LH). V těchto oblastech se rovněž nacházejí populace neuronů exprimujících NPY, AgRP nebo α -MSH (Keen-Rhinehart *et al.* 2013).

Kromě zmíněných neuropeptidů jsou v hypothalamu produkovány také další peptidy regulující příjem potravy. K orexigenním patří např. hypokretiny, orexiny, galanin nebo cerebellin, k anorexigenním se řadí např. melanokortiny, neurotensin nebo nesfatin (Sobrinho Crespo *et al.* 2014).

Signály z gastrointestinálního traktu mohou být také prostřednictvím *nervu vagu* přenášeny do mozkového kmene, kde se nachází další jádro podílející se na příjmu potravy – *nucleus tractus solitarius* (NTS), z něhož jsou signály přenášeny dále do hypothalamu (Sam *et al.* 2012).



Obr. 6 Zapojení primárních neuronů v nucleu arcuatu do regulace příjmu potravy. Neurony exprimující NPY, AgRP a GABA směřují do PVN, kde jejich produkty, orexigenní neuropeptidy, prostřednictvím svých receptorů stimulují příjem potravy. α -MSH produkovaný POMC/CART neurony působí v PVN na receptor MC4R a příjem potravy naopak potlačuje. NPY se váže na receptory Y1 a Y5 a přímo stimuluje příjem potravy, AgRP antagonizuje receptor MC4R a brání tak anorexigennímu účinku α -MSH. Inhibiční signál GABA z NPY/AgRP neuronů může prostřednictvím receptorů GABAR blokovat aktivitu POMC/CART neuronů. Na primárních neuronech se nacházejí receptory pro řadu hormonů, např. receptor pro ghrelin (GHSR), leptin (ObR) a inzulin (INSR). Podle zdroje (Briggs & Andrews 2011).

1.1.6.2.2 Periferní hormony podílející se na regulaci příjmu potravy

1.1.6.2.2.1 Anorexigenní hormony

Leptin je produkt genu *ob*, který potlačuje příjem potravy a reguluje výdej energie. Je sekretován zejména buňkami tukové tkáně. Produkce leptinu je stimulována inzulinem a krevní glukózou a inhibována aktivitou sympatiku, lipolytickými katecholaminy a volnými mastnými kyselinami (FFA). Hladiny cirkulujícího leptinu

pozitivně korelují s množstvím tukové tkáně v organismu (leptin signalizuje z tukové tkáně do mozku nadměrné hromadění energetických zásob), ale odráží také aktuální energetickou rovnováhu. Anorexigenní účinek leptinu je zprostředkován leptinovými receptory (Ob-R) na primárních neuronech v ARC; leptin inhibuje NPY/AgRP neurony a aktivuje POMC/CART neurony. Leptin také ovlivňuje sekreci neuropeptidů podílejících se na udržení energetické homeostáze (např. CHR, TRH) a stimuluje adrenergní systém, čímž zvyšuje výdej energie. Absence leptinu vede k hyperfagii, obezitě a neuroendokrinním poruchám. Jen malá část obézních však trpí deficiencí leptinu; většina obézních zvířat i lidí má zvýšené hladiny cirkulujícího leptinu, což svědčí o existenci rezistence k leptinu (Stanley *et al.* 2005; Sobrino Crespo *et al.* 2014).

Inzulín, glukagon a pankreatický polypeptid jsou anorexigenní hormony produkované v pankreatu. Hladiny plazmatického inzulínu, nejdůležitějšího regulátoru glukózové homeostáze, závisí na periferní inzulínové senzitivitě, která koreluje s množstvím a distribucí tuku v organismu (zejména se jedná o množství viscerálního tuku). Na rozdíl od leptinu však sekrece inzulínu prudce roste po jídle, v souvislosti s nárůstem hladiny krevní glukózy. Receptory pro inzulín jsou ve velké míře exprimovány na primárních neuronech v ARC; inzulín podobně jako leptin stimuluje POMC/CART neurony (Wynne *et al.* 2005b; Wissler *et al.* 2010).

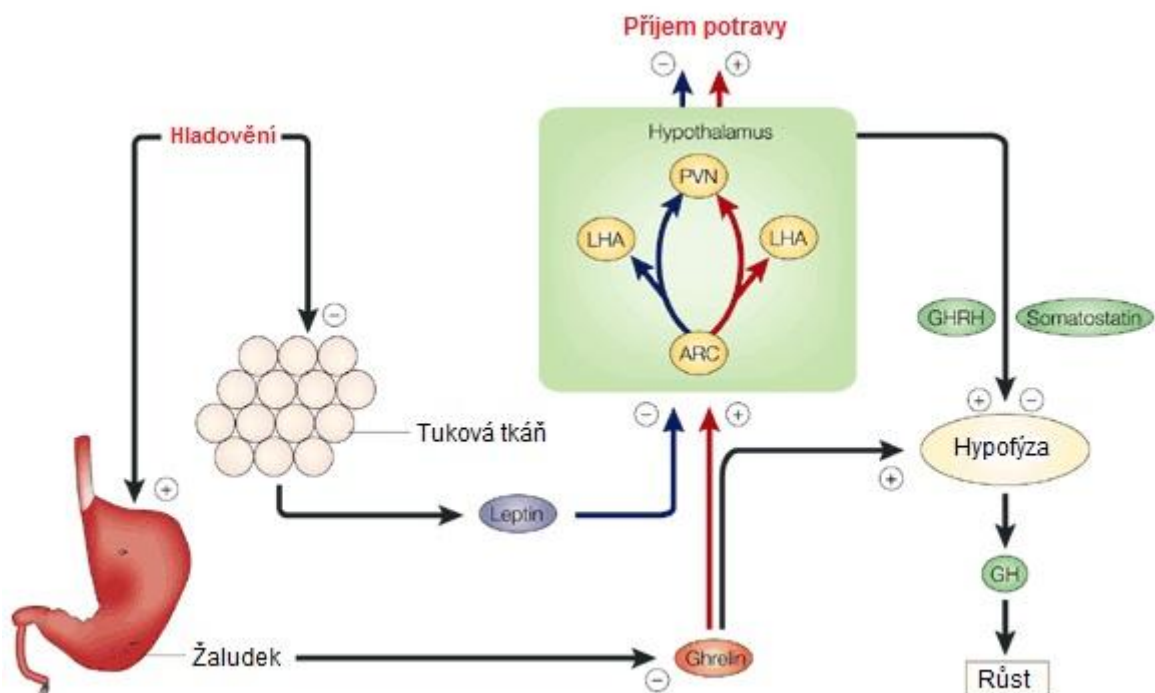
Anorexigenní hormony produkované v gastrointestinálním traktu slouží většinou jako krátkodobé signály regulující příjem potravy. Řadí se mezi ně např. PYY, GLP-1, cholecystokinin, oxytomodulin, bombesin nebo obestatin (Sobrino Crespo *et al.* 2014).

1.1.6.2.2.2 Ghrelin – jediný periferní orexigenní hormon

Ghrelin je, jak již bylo zmíněno, dosud jediným známým periferním orexigenním hormonem. Centrální i periferní podání ghrelinu hlodavcům stimuluje příjem potravy a redukuje energetický výdej; výsledná pozitivní energetická bilance vede k akumulaci tukové tkáně a k nárůstu tělesné hmotnosti. Stejně tak u lidí vede intravenózní (IV) podání ghrelinu ke stimulaci příjmu potravy (Tschöp *et al.* 2000; Kamegai *et al.* 2001; Nakazato *et al.* 2001; Shintani *et al.* 2001; Wren *et al.* 2001a; Wren *et al.* 2001b). Sekrece ghrelinu je pulzatilní; plazmatická hladina ghrelinu roste během hladovění a před jídlem, zatímco po jídle prudce klesá. Lze tedy předpokládat, že ghrelin slouží jako signál pro zahájení příjmu potravy (Cummings *et al.* 2001; Tschöp *et al.* 2001a). Hladiny ghrelinu jsou nepřímě úměrné indexu tělesné hmotnosti (BMI); jsou chronicky zvýšeny v souvislosti se snížením hmotnosti (např. při anorexii

nebo dietním omezení) a chronicky sníženy u obézních osob, případně po bariatrických zákrocích, což naznačuje, že ghrelin působí také jako signál informující o dlouhodobé energetické bilanci (Cummings *et al.* 2002b; Shiiya *et al.* 2002). U obézních osob není pozorován postprandiální pokles hladiny ghreluinu, což pravděpodobně vede k dalšímu zvyšování energetického příjmu (English *et al.* 2002). Účinkem chronického centrálního podávání ghreluinu dochází u myši ke zvýšení utilizace glukózy v bílé i hnědé tukové tkáni a ke zvýšení hladiny metabolických parametrů podněcujících ukládání tuku v bílých adipocytech; naopak se snižuje exprese mitochondriálních uncoupling proteinů spjatých s termogenezí v hnědých adipocytech (Tsubone *et al.* 2005).

Ghrelin aktivuje NPY/AgRP neurony a inhibuje POMC/CART neurony v ARC, je tedy funkčním antagonistou leptinu (obr. 7). Ghrelin je v malé míře produkován centrálně, a to skupinou neuronů sousedící s třetí mozkovou komorou, mezi DMH, VMH, PVN a ARC (Cowley *et al.* 2003). Periferně produkováný ghrelin může do mozku procházet buďto přes hematoencefalickou bariéru, nebo prostřednictvím aferentních drah *nervu vagu* (Banks *et al.* 2002; Date *et al.* 2002).



Obr. 7 Ghrelin a leptin působí v regulaci příjmu potravy jako funkční antagonisté. Množství leptinu produkované tukovou tkání koreluje s množstvím tuku; aktivace anorexigenní dráhy leptinem působí jako zpětnovazební smyčka k udržení konstantních tukových zásob. Ghrelin naopak aktivuje orexigenní dráhu a směřuje metabolismus k anaboličkému stavu a růstu. Upraveno podle zdroje (Inui 2001).

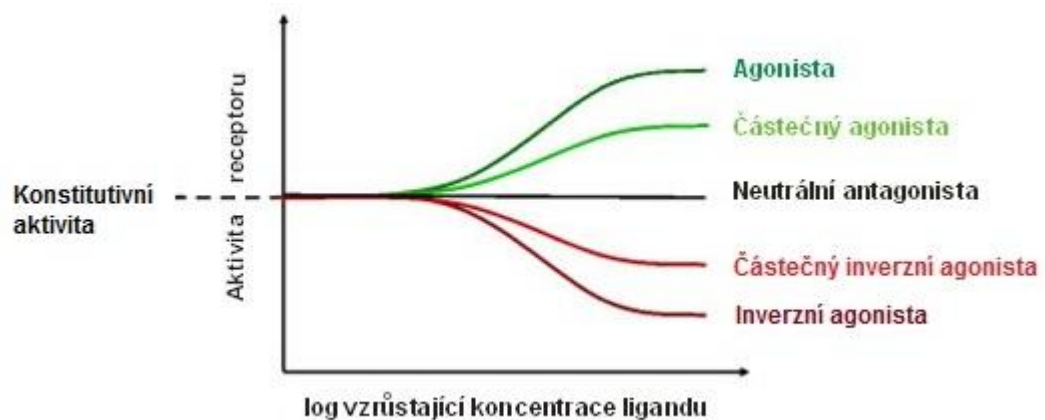
1.1.7 Analogy ghrelinu a jejich potenciální využití

Ligandy receptorů lze podle jejich účinku na receptor rozdělit na agonisty, neutrální antagonisty a inverzní agonisty. Agonista je ligand, který po vazbě na receptor zvýší jeho aktivitu. Plný agonista aktivuje všechny receptory a vyvolá tedy maximální biologickou odpověď, částečný agonista vyvolá pouze částečnou odpověď.

Inverzní agonista zcela potlačuje konstitutivní aktivitu receptoru (tedy schopnost receptoru signalizovat do buňky bez ohledu na přítomnost ligandu), redukuje aktivní formy receptoru a potlačuje biologickou odpověď, ať už jde o odpověď vyvolanou působením agonisty, nebo signalizací receptoru nezávislou na ligandu.

Antagonista potlačuje účinek agonisty. Kompetitivní antagonista se váže na stejné vazebné místo jako agonista, případně na vazebné místo překrývající se s vazebným místem agonisty, čímž brání jeho vazbě na receptor. Nekompetitivní antagonista se váže na jiné vazebné místo než agonista a potlačuje odpověď současně navázaného agonisty. Neutrální antagonista neovlivňuje konstitutivní aktivitu receptoru (Chollet *et al.* 2009).

Klasifikace ligandů je znázorněna na obr. 8.



Obr. 8 Klasifikace ligandů v konstitutivně aktivním systému podle vlivu na aktivitu receptoru. Upraveno podle zdroje (Chollet *et al.* 2009).

Terapeutické aplikace ghrelinu a jeho analogů jakožto regulátorů energetické homeostáze jsou v současnosti předmětem intenzivního výzkumu. Tyto aplikace zahrnují jak využití agonistů ghrelinu k léčbě kachexie, anorexie a poruch sekrece růstového hormonu, tak i potenciální využití antagonistů ghrelinu k léčbě obezity a s ní souvisejících zdravotních komplikací.

1.2 Ghrelin a další agonisté GHS-R1a pro léčbu kachexie

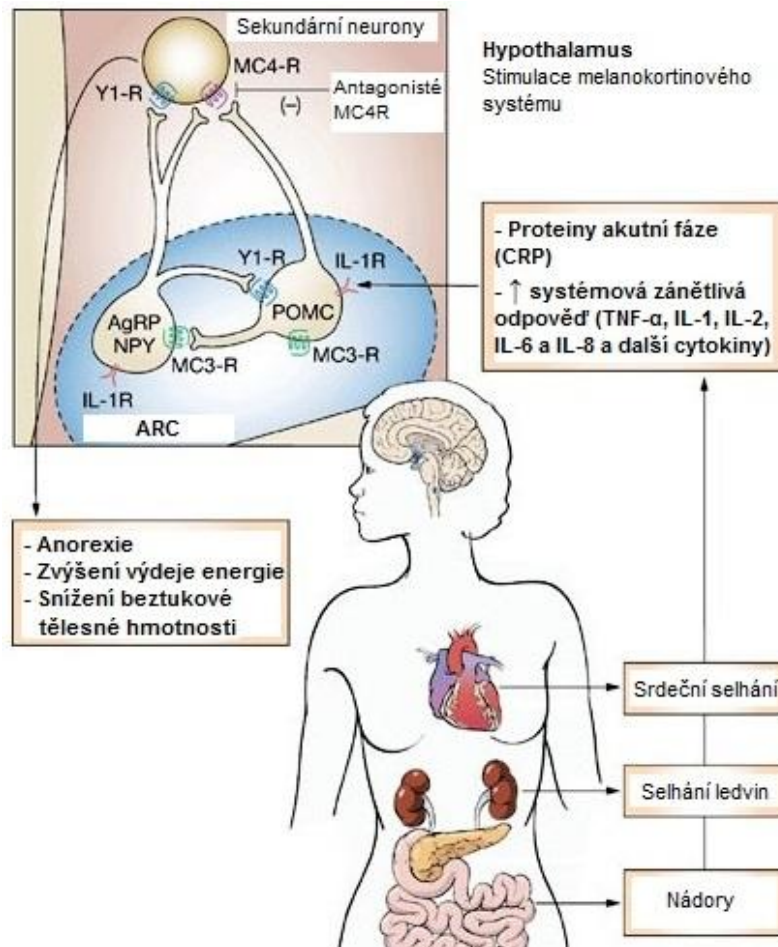
1.2.1 Kachexie

Kachexie je stav charakterizovaný fyzickým chřadnutím, ztrátou hmotnosti a svalové, případně i tukové hmoty, který je následkem nerovnováhy mezi katabolickými a anabolickými procesy a vyskytuje se u pacientů s pokročilým nádorovým, případně chronickým progresivním onemocněním. Při těchto onemocněních je častá koexistence kachexie a anorexie, což vede k malnutrici u 20 % pacientů s městnavým srdečním selháním, 20 % pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí, 40 % pacientů s chronickým selháním ledvin a 30 % onkologických pacientů; v případě nádorů gastrointestinálního traktu se jedná až o 85 % pacientů (Tisdale 2002; Evans *et al.* 2008; Ashitani *et al.* 2009).

Z evolučního hlediska je důvod vzniku kachexie zřejmý. Krátkodobé nemoci byly v minulosti závažnějším evolučním tlakem, než jsou dnes moderní chronické choroby objevující se zejména v pozdějším věku. Během krátkodobého onemocnění (infekce, zranění) bylo výhodnější, aby byla chuť k jídlu utlumena a riskantní hledání potravy odloženo na dobu po uzdravení. Kachexie je tedy reliktem evolučního mechanismu, který v současné době již nemá význam (Grossberg *et al.* 2010).

Mezi diagnostická kritéria kachexie patří nepřiměřená imunitní aktivace vedoucí k chronickému zánětu. Nárůst hladin cirkulujících prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 a IL-8 stimuluje centrální melanokortinový systém v hypothalamu, což vede k anorexii, zvýšení výdeje energie a svalové atrofii (obr. 9); zánět je pravděpodobně nejběžnější příčinou kachexie (Morley *et al.* 2006; Ashitani *et al.* 2009). IL-6 a TNF- α mají také lipolytický efekt, inhibují diferenciaci adipocytů a zvyšují jejich apoptózu (Langhans 2002).

U kachektických pacientů je často pozorován nárůst aktivity sympatického nervového systému, což spolu s nárůstem hladiny plazmatických katecholaminů přispívá k systémovému hypermetabolismu následovanému malnutricí a zvýšením energetického výdeje (Nagaya *et al.* 2001a; Nagaya *et al.* 2004; Nagaya *et al.* 2005). Katecholaminy snižují hladiny enzymů podporujících ukládání tuků v adipocytech a zvyšují expresi mitochondriálních proteinů UCP-1 a UCP-3 spojených s termogenezí, což vede ke zvýšení lipolýzy (Theander-Carrillo *et al.* 2006). Nárůst aktivity sympatiku dále podporuje zánětlivé procesy (Ashitani *et al.* 2009).



Obr. 9 Model vzniku kachexie. Produkce zánětlivých cytokinů stimuluje centrální melanokortinový systém v hypothalamu, např. prostřednictvím receptoru pro IL-1 na POMC neuronech. To vede k anorexii a zvýšení výdeje energie. Upraveno podle zdroje (DeBoer & Marks 2006).

Kachexie je obvykle spojena se zhoršením prognózy původní choroby a přispívá významným způsobem ke značnému podílu úmrtí na zmíněná onemocnění. Odstranění kachexie by snížilo náklady na léčbu a zlepšilo kvalitu života onkologických a chronicky nemocných pacientů (Ashitani *et al.* 2009; DeBoer 2011). Možnosti efektivní léčby kachexie jsou však zatím omezené; zahrnují například použití anabolických steroidů, látek stimulujičích chuť k jídlu nebo modulátorů cytokinů (Glass & Roubenoff 2010; Akamizu & Kangawa 2011; Guillory *et al.* 2013).

1.2.1.1 Zvířecí modely kachexie a anorexie

Mezi běžně používané zvířecí modely kachexie patří kachexie vyvolaná zánětem, nádorovým onemocněním, chronickým onemocněním ledvin nebo chronickým srdečním selháním (Deboer 2009).

Vyvolání akutního zánětu slouží jako krátkodobý model anorexie či kachexie. Jednorázová injekce bakteriálního endotoxinu lipopolysacharidu (LPS) nebo specifických zánětlivých cytokinů (např. TNF- α nebo IL-1 β) způsobí významné snížení příjmu potravy a zvýšení klidového výdeje energie. Opakované podávání nicméně vede ke vzniku tolerance vůči zánětlivému stimulu, což snižuje relevanci modelu (O'Reilly *et al.* 1988; Plata-Salamán *et al.* 1988; Huang *et al.* 1999).

K vytvoření modelu nádorové kachexie se využívají stabilní nádorové buněčné linie, nejčastěji karcinom plic Lewisové (LLC), kolorektální karcinom, tumory prostaty či syngenní sarkomy. Nádorové buňky jsou podkožně implantovány experimentálním zvířatům a rostoucí nádor často exprimuje prozánětlivé cytokiny či prostaglandiny nebo indukuje jejich sekreci, což vede ke vzniku symptomů kachexie (Fearon & Moses 2002; Deboer 2009; Bennani-Baiti & Walsh 2011).

Jako model kachexie doprovázející kardiovaskulární onemocnění se užívá vyvolání infarktu myokardu u hlodavců chirurgickou ligací levé přední sestupné tepny (Nagaya *et al.* 2001b; Gould *et al.* 2002), případně vyvolání městnavého srdečního selhání pomocí bandáže aorty (Héliès-Toussaint *et al.* 2005).

Nejpoužívanějším modelem kachexie spojené s chronickým selháním ledvin je 5/6 nefrektomie, kdy je experimentálním zvířatům odstraněna jedna ledvina a z druhé je ponechána pouze střední třetina, což vede k rychlému vzniku uremie (Cheung *et al.* 2005; Deboer *et al.* 2008).

Méně běžný je krátkodobý model kachexie vyvolané radiačním poškozením (Joppa *et al.* 2007) nebo model kachexie indukované chemoterapií, k jehož vytvoření se pokusným zvířatům injekčně podává cis-platina (Garcia *et al.* 2008).

1.2.2 Možné využití ghrelinu k léčbě kachexie

Ghrelín podporuje pozitivní energetickou bilanci organismu, zvyšuje příjem potravy a tělesnou hmotnost a podporuje akumulaci tukové tkáně (Tschöp *et al.* 2000; Nakazato *et al.* 2001). Plazmatické hladiny endogenního ghrelinu jsou vyšší u osob s nízkým BMI (Tschöp *et al.* 2001b; Shiiya *et al.* 2002; Soriano-Guillén *et al.* 2004); přírůstek hmotnosti u anorektických pacientů je provázen snížením hladiny ghrelinu (Otto *et al.* 2001). Kachektičtí pacienti mají hladiny ghrelinu zvýšeny průměrně o 25 % oproti normálu. Podávání ghrelinu či jiných agonistů GHS-R1a se nicméně jeví jako potenciální terapeutický postup pro léčbu kachexie, neboť krátkodobé podávání suprafyziologických dávek ghrelinu stále zvyšuje příjem potravy (DeBoer 2011).

Kromě centrálního působení ghrelinu na zvýšení příjmu potravy mohou být pro zlepšení kachektického stavu přínosné také jeho další účinky. Bylo zjištěno, že ghrelin vykazuje protizánětlivé efekty; podávání ghrelinu snížilo expresi prozánětlivých cytokinů v monocytech a T-buňkách (Dixit *et al.* 2004) a také systémový zánět v potkaních modelech kachexie (Chang *et al.* 2003; Granada *et al.* 2005). Ghrelin má také kardiovaskulární účinek, např. zvýšení srdečního výdeje a snížení krevního tlaku (Nagaya *et al.* 2001b). Vliv ghrelinu na akumulaci tukové tkáně může být zásadní pro zachování energetických rezerv v pokračujícím procesu kachexie (DeBoer 2011).

Klinické zkoušky podávání syntetického lidského ghrelinu kachektickým pacientům trpícím některým z výše zmíněných chronických onemocnění potvrdily bezpečnost IV aplikace (Strasser *et al.* 2008) a ukázaly, že ghrelin u kachektických pacientů účinně zvyšuje chuť k jídlu (Neary *et al.* 2004; Wynne *et al.* 2005a). Bylo pozorováno zvýšení hladiny sérových proteinů a posílení svalové hmoty, což naznačuje anabolický efekt ghrelinu. IV podávání ghrelinu také vedlo ke snížení hladiny katecholaminů a potlačení aktivity sympatického nervového systému (Nagaya *et al.* 2005) a snížení hladin prozánětlivých cytokinů (Kodama *et al.* 2008). Podávání ghrelinu také indukuje sekreci protizánětlivého cytokinu IL-10 (Waseem *et al.* 2008).

Ghrelin tedy hraje důležitou antikachektickou úlohu v kontrole chuti k jídlu, adipozity a zánětu. Pravděpodobně může sloužit jako obranný mechanismus proti hladovění, napomáhat kompenzovat energetické ztráty a být tak efektivním nástrojem pro zmírnění kachexie s minimem vedlejších účinků. Podávání ghrelinu má však také řadu nevýhod, z nichž lze jmenovat vysoké náklady, nutnost invazivního intravenózního podávání či možnost vzniku ghrelinové rezistence (Ashitani *et al.* 2009). V neposlední řadě je také potřeba vyloučit možnost zapojení ghrelinu a ghrelinem indukovaných růstových faktorů v procesu karcinogeneze (Müller *et al.* 2010).

1.2.3 Agonisté GHS-R1a

1.2.3.1 Peptidy a pseudopeptidy

1.2.3.1.1 GHRP-6 a od něj odvození agonisté GHS-R1a

V 70. letech 20. stol. byly popsány účinky různých peptidových molekul na sekreci růstového hormonu *in vitro* v primárních kulturách potkaních hypofyzárních buněk (Bowers *et al.* 1977). O sedm let později byl syntetizován hexapeptid GHRP-6,

vyvolávající dávkově závislou sekreci růstového hormonu *in vitro* i *in vivo* a nárůst tělesné hmotnosti (Bowers *et al.* 1984).

Později byly syntetizovány dva analogy GHRP-6, GHRP-1 a GHRP-2, v jejichž struktuře byly zachovány čtyři C-terminální aminokyseliny ze struktury GHRP-6 a zbylé aminokyseliny byly nahrazeny fragmentem obsahujícím D- β -naftylalanin. Oproti GHRP-6 vykazují mírně vyšší aktivitu *in vitro* a dvakrát až třikrát vyšší účinek na sekreci růstového hormonu po subkutánním (SC) podání potkanům a po IV, SC nebo perorálním (PO) podání zdravým dobrovolníkům (Akman *et al.* 1993; Bowers 1993).

Ze struktury GHRP-6 (záměnou D-tryptofanu za 2-methyl-D-tryptofan) vychází také další agonista GHS-R1a, označovaný examorelin či hexarelin (Mediolanum Farmaceutici). Tato látka se oproti GHRP-6 vyznačuje vyšší stabilitou, nižší toxicitou a zvýšeným efektem na uvolňování GH (Deghenghi *et al.* 1994; Imbimbo *et al.* 1994).

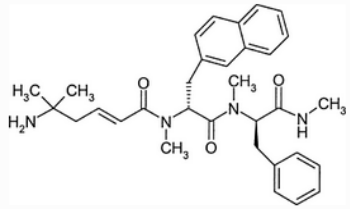
Zkrácením struktury hexarelinu byl vytvořen tripeptid EP51389 (firma Europeptides) (Deghenghi 1997), který byl dále modifikován na C-konci inkorporací formylovaného gem-diaminotryptofanového zbytku. Výsledná sloučenina, nesoucí název JMV1843 či EP01572, vykazuje vysokou vazebnou afinitu jak k lidským hypofyzárním buňkám, tak k LLC PK-1 buňkám transientně transfekovaným lidským receptorem GHS-R1a. Stimuluje sekreci růstového hormonu po SC podání potkanům (účinněji než hexarelin) a PO podání psům (Guerlavais *et al.* 2003). Po PO či intradermálním (ID) podání zdravým dobrovolníkům rychle vstupuje do krevního oběhu a následně zvyšuje sekreci růstového hormonu (Broglio *et al.* 2002; Piccoli *et al.* 2007). V současné době je JMV1843 pod označením macimorelin ve druhé fázi klinických studií jako látka pro léčbu kachexie provázející nádorová onemocnění; mimoto byla dokončena třetí fáze klinické studie macimorelinu jako orálně dostupného produktu pro diagnostiku deficiencie růstového hormonu u dospělých a pod názvem MacrilenTM byla podána žádost o schválení nového léčiva (firma Aeterna Zentaris).

Podobnou strategii jako Europeptides zvolila firma Novo Nordisk; cílem zkrácení molekuly GHRP-1 bylo získat sloučeninu s nižší molekulovou hmotností a dobrou orální biodostupností při zachování aktivity a specifity původního peptidu. Z molekuly GHRP-1 byla odstraněna centrální sekvence Ala-Trp a nahrazením N-terminálního alaninu α -aminoisomáselnou kyselinou vznikla sloučenina označovaná jako ipamorelin; tato látka po IV podání prasatům zvyšovala sekreci růstového hormonu, na rozdíl od GHRP-2 nebo GHRP-6 však nikoliv sekreci dalších hypofyzárních hormonů (Raun *et al.* 1998). Od ipamorelinu pak byla záměnou

fragmentu Aib-His za méně hydrofilní 3-aminomethyl benzoyl odvozena sloučenina NNC260235, která při podání potkanům i prasatům vykazovala *in vivo* účinek na sekreci růstového hormonu srovnatelný s GHRP-6 či ipamorelinem. Orální biodostupnost se však proti očekávání zlepšila jen minimálně (Ankersen *et al.* 1998). V další sérii agonistů GHS-R1a odvozených od ipamorelinu byla nicméně identifikována sloučenina NN703 (tabimorelin) s 30% orální biodostupností u psů, účinný sekretagog růstového hormonu (Ankersen *et al.* 1998; Hansen *et al.* 1999).

Struktury agonistů GHS-R1a zmíněných v tomto oddíle jsou uvedeny v tab.1.

Tab. 1 Sekvence vybraných peptidových a pseudopeptidových agonistů GHS-R1a

| Agonista GHS-R1a | Sekvence |
|---------------------|---|
| GHRP-6 | His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂ |
| GHRP-1 | Ala-His-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂ |
| GHRP-2 | D-Ala-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂ |
| hexarelin | His-D-2-methyl-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂ |
| EP51389 | Aib-D-2-methyl-Trp-D-2-methyl-Trp-NH ₂ |
| JMV1843 (EP01572) | H-Aib-D-Trp-D-gTrp-formyl |
| ipamorelin | Aib-His-D-β-Nal-D-Phe-Lys-NH ₂ |
| NNC260235 | 3-(aminomethyl)-benzoyl-D-β-Nal-N-Me-D-Phe-Lys-NH ₂ |
| NN703 (tabimorelin) |  |

1.2.3.1.2 Agonisté GHS-R1a vytvoření zkrácením či modifikací molekuly ghrelinu

Poté, co byla v roce 1999 objevena struktura ghrelinu, zahájila firma Merck syntézu jeho analogů s cílem identifikovat strukturní prvky nezbytné pro zachování biologické aktivity ghrelinu. Ze strukturně-aktivitních studií vyplynulo několik klíčových poznatků. Prvním z nich byl fakt, že pro zachování dobré afinity ke GHS-R1a (a pravděpodobně také pro přechod přes hematoencefalickou bariéru) je nezbytná acylace ghrelinu na Ser³, přičemž n-oktanoyl může být nahrazen jinou flexibilní lipofilní skupinou, např. dekanoylem nebo palmitoylem, nebo rigidnější skupinou jako je např. benzoyl či adamantyl. Dále bylo zjištěno, že nestabilní esterová vazba na Ser³ může být nahrazena amidovou bez ztráty biologické aktivity. Jako minimální aktivní

sekvence pro vazbu a aktivaci GHS-R1a, tzv. farmakofor, byl identifikován N-terminální tetrapeptid (Bednarek *et al.* 2000). Uvedené poznatky se shodují s výsledky podobné strukturně aktivní studie realizované Matsumotem a spolupracovníky (Matsumoto *et al.* 2001). Kromě oktanoylace v pozici 3 je pro zachování biologické aktivity ghrelinu zásadní také pozitivní N-terminální náboj a fenylalanin v pozici 4 (Van Craenenbroeck *et al.* 2004). *In vivo* testy mimoto prokázaly, že C-terminální část ghrelinu je důležitá pro jeho stabilitu (Morozumi *et al.* 2011).

Na základě uvedených poznatků byly za účelem zvýšení stability navrženy další analogy ghrelinu. Molekula ghrelinu byla modifikována záměnou serinu v pozici 3 za diaminopropionovou kyselinu (Dpr), která může tvořit stabilní amidovou vazbu s kyselinou oktanovou a tím chrání molekulu před hydrolyzou esterázami (Bednarek *et al.* 2000). Mimoto byl N-terminální glycin nahrazen sarkosinem (Sar) a fenylalanin v pozici 4 nahrazen nekódovými aminokyselinami β -cyklohexylalaninem (Cha) či L-1-naftylalaninem (Nal) kvůli ochraně před působením aminopeptidáz nebo chymotrypsinových proteáz. Výsledné analogy vykazovaly afinitu k GHS-R1a a orexigenní efekt srovnatelné s ghrelinem, nicméně s významně delším trváním účinku (Maletínská *et al.* 2012).

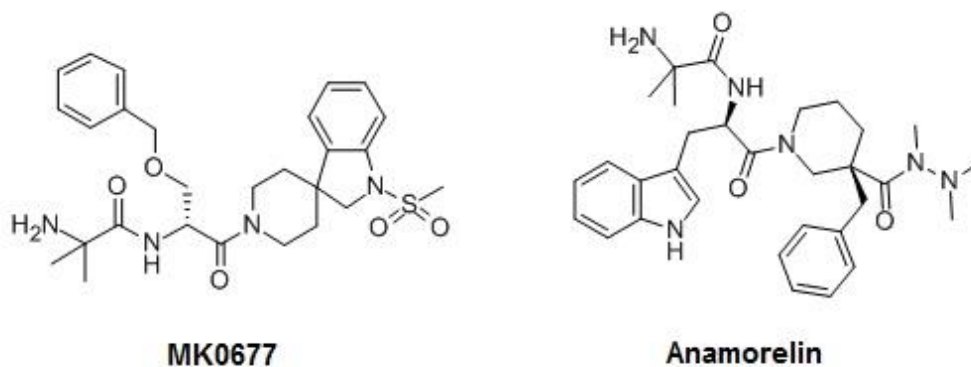
Ze struktury těchto analogů vychází nyní nově navržená série agonistů GHS-R1a, jimiž se dále zabývám v této práci. U těchto analogů byla oktanová kyselina na Dpr v pozici 3 nahrazena mastnou kyselinou s delším řetězcem (dekanová, myristová, palmitová), nenasycenou mastnou kyselinou (undecynová, decenová) nebo dalšími kyselinami (bromoktanová, adamantanoctová), případně byla do struktury začleněna druhá mastná kyselina (palmitoyl připojen na sekundární aminoskupinu lysinu v C-koncové části molekuly), bylo obměněno aminokyselinové složení nebo byl zkrácen peptidový řetězec. Cílem těchto modifikací bylo zvýšit stabilitu molekul, zlepšit průchod hematoencefalickou bariérou a vazbu na receptor GHS-R1a. Zjistili jsme, že po periferním podání myším většina těchto agonistů statisticky významně zvyšuje příjem potravy, a to více než ghrelin či [Dpr³]ghrelin (více oddíl 5.1).

Firma Ipsen vyvinula agonisty GHS-R1a odvozené od plného řetězce ghrelinu. BIM-28125, BIM-28143 a BIM-28152 se vážaly na buněčné membrány z buněk CHO-K1 exprimujících lidský rekombinantní receptor GHS-R1a s afinitou srovnatelnou s ghrelinem a stimulovaly sekreci růstového hormonu v kultuře lidských fetálních hypofyzárních buněk a v kultuře buněk z adenomu sekretujícího růstový hormon (Rubinfeld *et al.* 2004). Dlouhodobé SC podávání BIM-28125 a BIM-28131 štíhlým

potkanům vedlo k signifikantnímu zvýšení příjmu potravy a nárůstu tělesné hmotnosti danému zejména zvýšením obsahu tukové tkáně (Strassburg *et al.* 2008). Jednorázové IP podání BIM-131 štíhlým myším zvýšilo příjem potravy, stimulovalo sekreci růstového hormonu a vedlo k aktivaci cFos v hypothalamických jádrech souvisejících s regulací příjmu potravy (ARC, NTS, AP) (Hassouna *et al.* 2013).

1.2.3.2 Peptidomimetika

Vzhledem ke skutečnosti, že peptidy mají velmi nízkou orální biodostupnost a nízkou stabilitu, bylo navrženo velké množství nepeptidových analogů ghrelinu. Mezi prvními z nich byly deriváty benzolaktamu vyvinuté firmou Merck. Nejstudovanější agonista z této skupiny látek, L692585, byl prvním analogem ghrelinu, který stimuloval sekreci růstového hormonu lépe než GHRP-6; jeho orální biodostupnost byla nicméně nízká (Jacks *et al.* 1994). Při dalším screeningu knihovny sloučenin firmy Merck byly jako agonisté GHS-R1a identifikovány deriváty quinazolinonu (Ye *et al.* 2000) a také sloučeniny ze skupiny spiropiperidinů. Ibutamoren (MK0677) je velmi účinný *in vitro* a odolný vůči působení peptidáz, jeho biologický poločas je 5 hodin. Dobrá rozpustnost ve vodě, lipofilicita a mírná zásaditost přispívá k jeho vynikající orální biologické dostupnosti (u psů více než 60 %). Jedná se o první popsanou nízkomolekulární nepeptidovou látku, která stimuluje sekreci růstového hormonu (Patchett *et al.* 1995; Jacks *et al.* 1996). Ze struktury MK0677 (obr. 10) vychází také série GHS vyvinutých firmou Pfizer. Z této skupiny sloučenin, jejichž společným strukturním rysem je přítomnost pyrazolinon-piperidinové funkční skupiny, lze jmenovat capomorelin, krátkodobě působící GHS vyznačující se vysokou orální biodostupností (65 % u potkanů) (Pan *et al.* 2001; Carpino *et al.* 2003). Dalším testovaným peptidomimetikem ghrelinu je např. anamorelin (obr. 10) (Garcia & Polvino 2009).



Obr. 10 Struktury peptidomimetik ghrelinu MK0677(Merck) a anamorelinu (Ono Pharmaceutical). (researchsarms.co.uk, www.chemicalbook.com)

1.2.3.3 Agonisté GHS-R1a testování jako potenciální léčiva pro terapii kachexie

U některých výše zmíněných agonistů GHSR-1a byla podobně jako u ghrelinu testována možnost jejich využití v terapii kachexie. BIM-28131 byl testován na potkaním modelu nádorové kachexie, kde způsobil zvýšení příjmu potravy a tělesné hmotnosti a zabránil úbytku svalové i tukové hmoty (DeBoer *et al.* 2007). Agonisté BIM-28125 a BIM-28131 byli testováni na potkaním modelu kachexie vyvolané chronickým selháním ledvin. Jejich podávání zvýšilo příjem potravy, snížilo hladiny cirkulujících prozánětlivých cytokinů, snížilo degradaci svalových proteinů a úbytek svalové hmoty (Deboer *et al.* 2008). Jejich podávání též zvýšilo množství svalové i tukové tkáně u potkanů s kachexií vyvolanou infarktem myokardu (Palus *et al.* 2011).

Peptidy GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6 a hexarelin byly testovány na potkanech s kachexií vyvolanou srdečním selháním. Jejich dlouhodobé SC podávání vedlo ke zlepšení funkce srdce, zvýšení tělesné hmotnosti a také snížení hladin cirkulujících stresových hormonů, např. norepinefrinu, reninu, angiotensinu, aldosteronu či atriálního natriuretického peptidu (Xu *et al.* 2005).

Anamorelin testovaný v pilotní studii na kachektických onkologických pacientech způsobil nesignifikantní zvýšení příjmu potravy a signifikantní přírůstek hmotnosti ve srovnání s placebem, mimoto zvýšil hladiny růstového hormonu a IGF-1 (růstový faktor podobný inzulínu) (Garcia *et al.* 2013).

MK0677 byl testován na zdravých dobrovolnících ve věku 61-80 let; jeho podávání zvýšilo hladiny růstového hormonu a IGF-1 a beztukovou tělesnou hmotnost, v množství celkové a viscerální tukové tkáně nebyly pozorovány signifikantní změny. Dále došlo ke zvýšení hladin glukózy a snížení citlivosti k inzulínu (Nass *et al.* 2008).

JMV1843 je v současné době pod označením macimorelin ve druhé fázi klinických studií jako látka pro léčbu kachexie provázející nádorová onemocnění (Aeterna Zentaris, viz www.aezsinc.com).

1.2.3.4 Další možné využití agonistů GHS-R1a

Agonisté GHS-R1a mohou být orálně dostupnou alternativou k podávání rekombinantního lidského růstového hormonu při stimulaci růstu u GH-deficientních dětí či v terapii metabolických dysfunkcí u GH-deficientních dospělých. GH jako velká proteinová molekula musí být podáván injekčně nebo inhalačně, zatímco malé molekuly analogů ghrelinu mohou umožnit pohodlnější PO podávání a stimulovat sekreci endogenního GH (Muccioli *et al.* 2002; Allas & Abribat 2013).

1.3 Potenciální klinické aplikace ovlivnění funkce ghrelinu v léčbě obezity

1.3.1 Obezita

Obezita je definována jako přebytečné hromadění tukové tkáně v organismu, k němuž dochází v důsledku dlouhodobé nerovnováhy mezi příjmem a výdejem energie. K orientačnímu posouzení obsahu tukové tkáně v organismu byl zaveden tzv. index tělesné hmotnosti (BMI, z angl. body mass index), který je definován jako podíl tělesné hmotnosti v kg a druhé mocniny výšky v m. Hodnota BMI 18 – 25 kg/m² značí normální hmotnost, hodnota nad 25 kg/m² nadváhu, hodnota nad 30 kg/m² obezitu. K odhadu rizik spojených s obezitou se stále častěji používá také prosté měření obvodu pasu, které dobře odráží distribuci tělesného tuku. Zvýšená zdravotní rizika jsou přitom spojena s obvodem pasu větším než 88 cm u žen a větším než 102 cm u mužů (Scerif *et al.* 2011; Davenport & Wright 2013; De Schutter *et al.* 2013).

Obezita je v současné době nejzávažnějším a nejrozšířenějším metabolickým onemocněním obyvatel západního světa. Alarmující je fakt, že obezita vykazuje trvale vzestupný trend výskytu, a to v čím dál větší míře i v rozvojových zemích. Tato skutečnost je zejména důsledkem současného sedavého způsobu života a snadné dostupnosti energeticky bohaté a chutné potravy. Obezita již dlouho není považována pouze za estetický problém. Především je spojena s řadou zdravotních rizik, z nichž lze jmenovat zejména vznik diabetu II. typu (spojeného se sníženou citlivostí k inzulínu), zvýšený výskyt kardiovaskulárních onemocnění (hypertenze, aterosklerózy, mozkových cévních příhod) a některých typů nádorů (zejména tlustého střeva, prsu, prostaty a ledvin) (Scerif *et al.* 2011; Heal *et al.* 2012).

V současné léčbě obezity se setkáváme v zásadě se třemi přístupy. Prvním z nich je komplexní změna životního stylu, zejména změna stravovacích návyků a zvýšení fyzické aktivity, které mohou být podpořeny psychoterapií. Tento přístup často ztroskotává na špatné spolupráci pacientů. Další možností je bariatrická chirurgie, tedy např. chirurgické zmenšení objemu žaludku, které umožní dosáhnout snížení pocitu hladu. K nejčastěji prováděným bariatrickým zákrokům se řadí laparoskopická bandáž žaludku či žaludeční bypass. Vzhledem ke zřejmým rizikům a k častému relapsu obezity v krátkém čase po operaci jsou nicméně bariatrické zákroky indikovány pouze v případě morbidní obezity (BMI > 40). Posledním přístupem v terapii obezity zůstává farmakoterapie. Většina léčiv určených ke snižování tělesné hmotnosti se nicméně

vyznačuje nízkou účinností (redukce hmotnosti přibližně o 5 %) a řadou vedlejších efektů (Kushner 2014). V současnosti jsou na českém trhu pouze dvě antiobezitika: inhibitor střevní lipázy orlistat (Xenical, Alli) a fentermin (Adipex Retard), který stimuluje sekreci noradrenalinu a potlačuje chuť k jídlu, vzhledem k riziku vzniku závislosti je však určen pouze pro krátkodobé použití (www.sukl.cz). V USA byl s požadavkem monitorování dlouhodobých kardiovaskulárních efektů schválen kombinovaný přípravek Qnexa[®] (Qsymia[®]), kombinace fenterminu s antikonvulzantem topiramátem. Dalším takto schváleným přípravkem je Contrave[®], kombinace bupropionu a naltrexonu; bupropion působí jako inhibitor zpětného vychytávání dopaminu a noradrenalinu, zatímco naltrexon je antagonist opioidního receptoru. Třetím antiobezitikem schváleným v USA je lorcaserin (Belviq[®]), selektivní agonista serotoninergního receptoru 5-HT_{2C} (Heal *et al.* 2012; Davenport & Wright 2013; Kushner 2014). Vzhledem k celosvětově narůstajícímu výskytu obezity se nicméně stává potřeba nových účinných antiobezitik stále akutnější.

1.3.1.1 Zvířecí modely obezity

V současnosti je popsána řada obézních zvířecích modelů s různým rozsahem a typem obezity. Obezita může být zapříčiněna spontánními mutacemi, umělými genetickými modifikacemi (tzv. KO zvířata s vyřazenými geny, z angl. knock-out), faktory prostředí (např. obezita indukovaná dietou) nebo mechanickým či chemickým zásahem (např. vznik chemických lézí v hypothalamu) (Tschöp & Heiman 2002).

Myši s defektem v signální dráze leptinu, ať už se jedná o poruchu produkce leptinu nebo necitlivost k leptinu v důsledku mutace leptinového receptoru či extrémní leptinové rezistence, vyvíjejí hyperfagii a morbidně obézní fenotyp. *Ob/ob* myši jsou nositeli spontánní mutace *ob* genu kódujícího leptin; tato mutace zapříčiňuje předčasné ukončení transkripce genu a tedy úplnou deficienci proteinu. *Db/db* myši jsou *ob/ob* myším fenotypově velmi podobné; odlišují se od nich leptinovou rezistencí, neboť jsou nositeli spontánní mutace leptinového receptoru, která vede ke ztrátě jeho funkce. Obdobou toho modelu jsou leptin-rezistentní *fa/fa* (Zucker, Koletsky) potkani. Další modely obezity byly vytvořeny zásahy do signální dráhy leptinu (např. POMC KO, zvířata s vyřazeným genem pro anorexigenní neuropeptid proopiomelanokortin) (Lutz & Woods 2012).

Podávání diety s vysokým podílem tuku vede k rozvoji obezity, která je velmi podobná lidské obezitě. Některé kmeny hlodavců jsou k rozvoji obezity indukované

dietou (DIO) obzvláště náchylné. Jedná se např. o potkaní kmeny Wistar a Sprague-Dawley nebo myši kmene C57BL/6. Obdobou vysokotukové (HF, z angl. high fat) diety je tzv. cafeteria dieta, která svým složením napodobuje složení potravy obyvatel západního světa a mimo zvýšeného obsahu tuku obsahuje také zvýšené množství sacharidů (Rogers & Blundell 1984; Hariri & Thibault 2010).

Ke vzniku obezity vede také vytvoření lézí v jádrech hypothalamu podílejících se na regulaci příjmu potravy (např. ve ventromediálním či paraventrikulárním jádru nebo *nucleu arcuatu*), ať už chirurgicky nebo chemicky, např. opakovaným injekčním podáváním monoglutamátu sodného novorozeným hlodavcům. K dalším metodám vedoucím k vytvoření obézního fenotypu patří např. ovariektomie, která vede ke snížení produkce anorexigenního estradiolu, nebo ablace hnědé tukové tkáně, která způsobuje snížení termogeneze a tedy energetického výdeje (Lutz & Woods 2012).

1.3.2 Možné využití ovlivnění funkce ghrelinu v léčbě obezity

1.3.2.1 Neutralizace ghrelinu

Alternativním imunologickým přístupem pro blokování signalizace ghrelinu je vakcinace protilátkou proti endogennímu ghrelinu, která umožňuje specificky modulovat jeho biologickou dostupnost. Bylo popsáno, že aktivní vakcinace dospělých potkanů imunokonjugátem ghrelinu vede ke snížení využití energetické hodnoty potravy (angl. feed efficiency), adipozity a hmotnostního přírůstku; tento účinek je výsledkem imunitní odpovědi proti acylované formě ghrelinu (Zorrilla *et al.* 2006). Obdobných výsledků bylo dosaženo vakcinací prasat (Vizcarra *et al.* 2007) a štíhlých a obézních myší (Zakhari *et al.* 2012; Andrade *et al.* 2013). Vývoj vakcíny pro klinické použití, jímž se zabývala švýcarská firma Cytos, byl nicméně zastaven z důvodu negativních výsledků v druhé fázi klinických studií; vakcína sice vyvolávala imunitní odpověď a snižovala pocit hladu, nebyl však pozorován signifikantní hmotnostní úbytek (Depoortere 2009).

Relativně novým typem sloučenin, jichž lze využít k blokování funkce ghrelinu, jsou tzv. RNA-Spiegelmetry. Jedná se o syntetické oligonukleotidy obsahující nepřirozený L-enantiomer ribózy, což vede k tomu, že jsou tyto sloučeniny stabilní *in vivo*. Tyto RNA-Spiegelmetry jsou navrhovány tak, aby se specificky vázaly na acylovaný ghrelin a znemožňovaly mu aktivaci receptoru. RNA-Spiegelmer NOX-B11 váže ghrelin s nanomolární afinitou, inhibuje aktivaci GHS-R1a *in vitro* a

po IV podání potkanům efektivně potlačuje sekreci růstového hormonu (Helmling *et al.* 2004) a blokuje zvýšení příjmu potravy a stimulaci c-Fos v ARC vyvolané podáním ghrelinu (Kobelt *et al.* 2006). Dlouhodobé podávání NOX-B11-2 obézním DIO myším vede k redukci jejich hmotnosti (Shearman *et al.* 2006).

1.3.2.2 Inhibice ghrelin-O-acyl transferázy

Inhibice ghrelin-O-acyl transferázy, enzymu zprostředkovávajícího oktanoylaci ghrelinu, je strategie, která brání produkci aktivní formy ghrelinu a zároveň pravděpodobně vede ke zvýšení hladin des-acyl ghrelinu. Vzhledem k tomu, že GOAT je doposud jediná známá membránově vázaná O-acyl transferáza, jsou vedlejší účinky dané interferencí s dalšími acylujícími enzymy nepravděpodobné (Depoortere 2009). GO-CoA-Tat, syntetický konjugát peptidové struktury a koenzymu A, po IP podání myším zlepšuje glukózovou toleranci a snižuje hmotnostní přírstek při expozici vysokotukové dietě (Barnett *et al.* 2010; Taylor *et al.* 2012).

1.3.2.3 Antagonisté GHS-R1a jako potenciální antiobezitika

[DLys³]-GHRP-6 (His-D-Trp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) vytěsňoval ghrelin při vazebných experimentech na buněčných membránách buněk CHO-K1 s transfekovaným receptorem GHS-R1a (Traebert *et al.* 2002) a na potkaní hypofyzární tumorové buněčné linii RC-4B/C, kde také potlačoval uvolňování intracelulárního kalcia vyvolané ghrelinem (Falls *et al.* 2006). *In vivo* [DLys³]-GHRP-6 snižoval příjem potravy po ICV a IP podání štíhlým hladovým myším a rovněž potlačoval zvýšení příjmu potravy vyvolané IP podáním ghrelinu štíhlým sytým myším. Mimoto rovněž snižoval příjem potravy, tělesnou hmotnost a hladinu krevní glukózy po opakovaném IP podávání obézním *ob/ob* myším a myším s obezitou indukovanou podáváním vysokotukové diety (Asakawa *et al.* 2003). IP podání [DLys³]-GHRP-6 vedlo také ke snížení příjmu potravy u obézních *fa/fa* potkanů a odpovídajících štíhlých kontrol (Beck *et al.* 2004). Chronické podkožní podávání [DLys³]-GHRP-6 způsobilo redukci příjmu potravy a tělesné hmotnosti a zlepšení metabolických abnormalit spojených s obezitou u ovariektomovaných myších samic krmených vysokotukovou dietou, které jsou modelem lidské postmenopauzální obezity (Maletínská *et al.* 2011).

Deriváty isoxazol karboxamidu a tetralin karboxamidu (firma Abbott) efektivně vytěsňovaly ghrelin ve vazebných studiích na membránách CHO-K buněk s transfekovaným lidským receptorem GHS-R1a. Ve funkčních studiích bylo ukázáno,

že antagonizují uvolňování intracelulárního kalcia vyvolané ghrelinem. Při testování na zvířecích modelech však bylo zjištěno, že tyto sloučeniny mají velmi špatnou biologickou dostupnost a z tohoto důvodu nemají signifikantní účinek na příjem potravy (Liu *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2004; Xin *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2005).

Při screeningu knihovny sloučenin firmy Abbott byly následně jako antagonisté GHS-R1a identifikovány deriváty 2,4-diaminopyridinu. Tyto látky snižovaly příjem potravy po IP podání jak u sytých, tak hladových potkanů, a řada z nich vykazovala dobrý farmakokinetický profil a poměrně vysokou biologickou dostupnost po IP a PO podání (Liu *et al.* 2006; Serby *et al.* 2006). Na základě molekulového modelování byla navržena nová série derivátů 2,4-diaminopyridinu, z nichž některé způsobovaly signifikantní snížení příjmu potravy a tělesné hmotnosti po 14-denním PO podávání myším s obezitou indukovanou vysokotukovou dietou (Xin *et al.* 2006).

Deriváty quinazolinonu substituované piperidinem (firma Bayer) zlepšovaly sekreci inzulínu stimulovanou glukózou *in vitro* a dále zlepšovaly glukózovou toleranci, potlačovaly příjem potravy a způsobovaly snížení hmotnosti po PO podání potkanům a myším s DIO (Esler *et al.* 2007; Rudolph *et al.* 2007).

Antagonisté GHS-R1a založení na struktuře trisubstituovaného 1,2,4-triazolu (Demange *et al.* 2007; Moulin *et al.* 2007a; Moulin *et al.* 2013) JMV2959 a JMV3002 (viz obr. 12 v oddíle 4.1.3) potlačovali po jednorázovém centrálním podání potkanům příjem potravy indukovaný hladověním či podáním ghreluinu (Salomé *et al.* 2009a). Mimoto chronické centrální podávání JMV2959 potkanům blokovalo účinky dlouhodobě podávaného ghreluinu na akumulaci tuku a následný nárůst hmotnosti (Salomé *et al.* 2009b). V jiné studii, při níž měli potkani volný výběr mezi standardní peletovanou dietou a čokoládovým nápojem indukujícím vznik obezity, vedlo IP podávání JMV2959 ke snížení konzumace čokoládového nápoje o 50 % oproti kontrolní skupině při zachování konzumace standardní diety a k signifikantnímu snížení přírůstku hmotnosti (Egecioglu *et al.* 2010).

K dalším sloučeninám, které byly na základě vazebných a funkčních studií označeny jako antagonisté GHS-R1a, se řadí deriváty benzensulfonamidu vyvinuté firmou Merck (Pasternak *et al.* 2009), deriváty piperazin-bisamidu vyvinuté firmou Amgen (Yu *et al.* 2010) nebo deriváty karbohydrazidu vyvinuté firmou GlaxoSmithKline (Sabbatini *et al.* 2010; Sabbatini *et al.* 2011). GSK1614343, antagonist z poslední jmenované skupiny, se jevil jako účinný antagonist GHS-R1a exprimovaného potkaní hypofyzární buněčnou linií RC-4B/C (Perdonà *et al.* 2011).

Po podání potkanům a psům nicméně překvapivě stimuloval příjem potravy a nárůst tělesné hmotnosti (Costantini *et al.* 2011).

Podobný účinek byl pozorován také při testování sloučeniny BIM-28163 (firma Ipsen), jejíž struktura nebyla publikována. Ta sice blokovala sekreci růstového hormonu indukovanou ghrelinem, ale po dlouhodobém podávání indukovala nárůst tělesné hmotnosti (Halem *et al.* 2004; Halem *et al.* 2005; Hassouna *et al.* 2013).

IP podání derivátů indolinonu (firma Sanofi) vedlo k signifikantnímu zlepšení glukózové tolerance u myši a k redukci příjmu potravy stimulovaného hladověním či centrálně podávaným ghrelinem u potkanů (Puleo *et al.* 2012).

Deriváty benzodiazepinu blokovaly uvolňování intracelulárního kalcia vyvolané ghrelinem, jejich účinky *in vivo* však dosud nebyly stanoveny (Mihalic *et al.* 2012).

Další antagonisté GHS-R1a, jako např. TZP-301 (firma Tranzyme Pharma) nebo EX-1350 (firma Elixir Pharmaceuticals), byly testovány v preklinických studiích; EX-1350 způsoboval po dlouhodobém podávání myším s obezitou indukovanou vysokotukovou dietou až 10% úbytek hmotnosti bez signifikantního snížení příjmu potravy (Depoortere 2009; Delporte 2012).

1.3.2.4 Inverzní agonisté GHS-R1a jako potenciální antiobezitika

Vzhledem k vysoké konstitutivní aktivitě ghrelinového receptoru pozorované *in vitro* (Holst *et al.* 2003; Holst *et al.* 2004) byla vyslovena hypotéza, že inverzní agonisté ghrelinového receptoru blokující jeho konstitutivní aktivitu mohou bránit nadbytečnému příjmu potravy mezi hlavními jídly, aniž by byl znemožněn dostačující energetický příjem v rámci hlavních jídel (Depoortere 2009).

Nejdéle známým a také nejlépe popsáným inverzním agonistou ghrelinu je [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-substance P. Jedná se o analog substance P, peptidu vyvolávajícího bolest, stres a úzkost. Analog [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-substance P byl původně popsán jako poměrně málo účinný antagonista řady receptorů, včetně např. receptoru pro neurokinin, bombesin či ghrelin. Později však bylo zjištěno, že tato sloučenina je 100-krát účinnější jako inverzní agonista GHS-R1a než jako jeho antagonist (Holst *et al.* 2006). Jednorázové podání [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-substance P štíhlým myším způsobilo snížení příjmu potravy (Asakawa *et al.* 2003), dlouhodobé ICV podávání štíhlým potkanům vedlo ke snížení příjmu potravy, tělesné hmotnosti a exprese orexigenního peptidu NPY v hypothalamu (Petersen *et al.* 2009).

CJ 012,255, další analog substance P, po periferním podávání myším bránil akumulaci tuku a nárůstu tělesné hmotnosti při současném krmení vysokotukovou dietou, zatímco po podávání obézním DIO myším způsobil úbytek hmotnosti a adipozity a zlepšil citlivost k inzulinu (Karagiannides *et al.* 2008).

Hexapeptid KwFwLL-NH₂ (w značí variabilní aminokyselinu), odvozený od minimální aktivní sekvence substance P, dává po začlenění β -(3-benzothienyl)-D-alaninu, 3,3-difenyl-D-alaninu nebo 1-naftyl-D-alaninu na pozici 2 vznik účinným inverzním agonistům GHS-R1a. Tyto sloučeniny mají vysokou afinitu ke ghrelinovému receptoru a po akutním jednorázovém podání štíhlým potkanům snižují příjem potravy (Els *et al.* 2012).

K dalším popsáným inverzním agonistům GHS-R1a patří např. deriváty spirocyklického piperidin-azetidinu (Pfizer), které po podání potkanům vykazovaly dobrou orální biologickou dostupnost (Kung *et al.* 2012), nebyly však zcela selektivní a vázaly se také na muskarinový acetylcholinový receptor M2. Tato neselektivita byla v další sérii derivátů odstraněna začleněním heterocyklů do struktury inverzních agonistů, deriváty však nebyly dostatečně účinné a jejich další výzkum byl ukončen (McClure *et al.* 2013).

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

- **Charakterizace nových stabilních dlouhodobě působících peptidových agonistů receptoru GHS-R1a**

Ghrelin je vzhledem ke své oktanoylaci na Ser³ poměrně nestabilní hormon, jako peptid je navíc snadno štěpen proteázami. Za účelem zvýšení stability molekuly ghreluinu byly v naší laboratoři navrženy jeho analogy s obměněnou aminokyselinovou sekvencí, do níž byly začleněny nekódové aminokyseliny (Sar¹ jako ochrana proti štěpení aminopeptidázami, Dpr³ vytvářející stabilní amidovou vazbu s mastnou kyselinou, záměny Phe⁴ na ochranu proti štěpení chymotrypsinovými proteázami). Tyto analogy byly dále modifikovány zkrácením peptidového řetězce, začleněním druhé mastné kyseliny, či záměnou oktanové kyseliny za delší či nenasycenou mastnou kyselinu. Prvním z cílů této práce bylo charakterizovat nové analogy ghreluinu po stránce jejich vazby k receptoru GHS-R1a, signalizace, stability a účinku na příjem potravy u myši.

- **Studium účinku pseudopeptidového agonisty receptoru GHS-R1a JMV1843 na příjem potravy a tělesnou hmotnost u štíhlých myších samců**

JMV1843 je pseudopeptidový analog ghreluinu, o němž se uvažuje jako o potenciálním léčivu pro terapii kachexie. Druhým cílem této práce bylo otestovat akutní účinek JMV1843 na příjem potravy po periferním podání myším, analyzovat jeho stabilitu v myší krvi jak *in vitro*, tak *in vivo*, a testovat účinky JMV1843 na příjem potravy, tělesnou hmotnost, metabolické parametry a expresi orexigenních neuropeptidů po dlouhodobém periferním podávání myším.

- **Studium účinku nepeptidových antagonistů receptoru GHS-R1a JMV3002 a JMV4208 na příjem potravy a tělesnou hmotnost u obézních myších samců**

Blokování účinku ghreluinu pomocí antagonistů GHS-R1a se jeví jako vhodný přístup v terapii obezity. Třetím cílem této práce bylo studovat účinky JMV3002 a JMV4208, nepeptidových antagonistů GHS-R1a založených na struktuře trisubstituovaného 1,2,4-triazolu. Předmětem zájmu byl akutní účinek obou antagonistů na příjem potravy po jednorázovém periferním podání štíhlým myším, farmakokinetika *in vivo* a dlouhodobý vliv na příjem potravy, tělesnou hmotnost, metabolické parametry a expresi neuropeptidů ovlivňujících příjem potravy po chronickém podávání myším s obezitou indukovanou vysokotukovou dietou.

3 MATERIÁL

Testované látky

| | |
|----------------------------|---|
| Ghrelín | Syntetizován v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Praha, ČR |
| [Dpr ³]ghrelín | Syntetizován v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Praha, ČR |
| JMV1843, JMV3002, JMV4208 | Dar od prof. Martineze, Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier, Francie |
| Peptidoví agonisté GHSR-1a | Syntetizováni v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Praha, ČR |

Buněčné linie a membrány

| | |
|---|---|
| Linie HEK293T | ATCC, Manassas, VA, USA |
| Membrány z buněčné linie HEK293T s transfekovaným receptorem GHS-R1a | Multispan, Hayward, CA, USA |
| Membrány z buněčné linie LLC PK-1 s transfekovaným receptorem GHS-R1a | Dar od prof. Martineze, Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier, Francie |

Laboratorní zvířata

| | |
|----------------------------|------------------------|
| Inbrední myši kmen C57BL/6 | Charles River, Německo |
| Potkani kmene Wistar | Harlan, Itálie |

Dieta pro laboratorní zvířata

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Standardní dieta St-1 | Mlýn Kocanda, Jesenice, ČR |
|-----------------------|----------------------------|

Kity

| | |
|--|--|
| ELISA kit pro stanovení ghrelínu | Linco Research, St. Charles, MI, USA |
| ELISA kit pro stanovení IGF-1 | Linco Research, St. Charles, MI, USA |
| ELISA kit pro stanovení leptinu | BioVendor, Brno, ČR |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| IP-One HTRF kit | Cisbio Bioassays, Codolet, Francie |

| | |
|---|---|
| Kit pro stanovení triglyceridů | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) Kit | Roche Diagnostics, Mannheim, Německo |
| RIA kit pro stanovení adiponektinu | Linco Research, St. Charles, MI, USA |
| RIA kit pro stanovení inzulínu | Linco Research, St. Charles, MI, USA |
| RNAqueous Micro Kit | Ambion, Austin, TX, USA |
| Chemikálie | |
| Acetonitril | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| BSA | Serva GmbH, Heidleberg, Německo |
| BPTI | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| DMEM Glutamax | Invitrogen, Grand Island, NY, USA |
| EDTA | Lachema, brno, ČR |
| FBS | Biochrom AG, Berlín, Německo |
| Fluo-4AM | Invitrogen, Grand Island, NY, USA |
| Fyziologický roztok | Infusia, Hořátev, ČR |
| HBSS | Invitrogen, Grand Island, NY, USA |
| HEPES | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Chlorid hořečnatý | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Chlorid vápenatý | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Iodo-Gen TM | Pierce Chemicals, Rockford, IL, USA |
| Kyselina mravenčí | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Kyselina pluronová | Invitrogen, Grand Island, NY, USA |
| Lipofectamine 2000 | Invitrogen, Grand Island, NY, USA |
| Náhodné primery pd(N) ₆ | Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA |
| Neesenciální aminokyseliny | Invitrogen, Grand Island, NY, USA |
| NO AmpErase® UNG | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| optiMEM | Invitrogen |
| PEG300 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Penicilin/Streptomycin | Invitrogen, Grand Island, NY, USA |
| Plazmid pCDNA3-GHSR1a | Missouri S&T cDNA Resource Center, St. Rolla, MO, USA |
| Poly-L-ornithin | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Síran hořečnatý | Penta, Chrudim, ČR |

| | |
|----------------------------------|--|
| TaqMan® Gene Expression Assay | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| TaqMan® Universal PCR Master Mix | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Tris | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Triton X-100 | Koch-Light Laboratories, Colnbrook, Bucks, Velká Británie |
| Voda prostá nukleas | Fermentas Life Science, Vilnius, Litva |

Materiál

| | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| GF/C filtry | Whatman, Clifton, NJ, USA |
| Kolona Discovery HS C18 | Supelco, Bellefonte, PA, USA |
| Kolona Eclipse Plus C18 | Agilent, Santa Clara, CA, USA |
| MagNA Lyser Green Beads | Roche Diagnostics, Mannheim, Německo |

Přístroje a programy

| | |
|--------------------------------------|--|
| Analyzátor ABI PRISM 7000/7500 | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Automatický izolátor MagNA Pure | Roche Diagnostics, Mannheim, Německo |
| Brandelův přístroj | Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA |
| CO ₂ inkubátor MCO 18AIC | Sanyo, Osaka, Japonsko |
| FlexStation II | Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA |
| γ-čítač Wizard 1470 | PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA |
| Glukometr Glucocard | Arkray, Kyoto, Japonsko |
| GraphPad Prism 5 | San Diego, CA, USA |
| Hmotnostní spektrometr API 3200 | Sciex, Concord, ON, Kanada |
| Hmotnostní spektrometr Q-TOF-Micro | Waters, Milford, MA, USA |
| Homogenizátor MagNA Lyser | Roche Diagnostics, Mannheim, Německo |
| Kapalinový chromatograf Alliance | Waters, Milford, MA, USA |
| Kapalinový chromatograf Agilent 1200 | Agilent, Santa Clara, CA, USA |
| Kryostat Microm HM 520 | Microm International, Walldorf, Německo |
| Syntetizátor ABI 433A | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| UV/Vis fotometr BioPhotometer | Eppendorf AG, Hamburg, Německo |

4 METODY

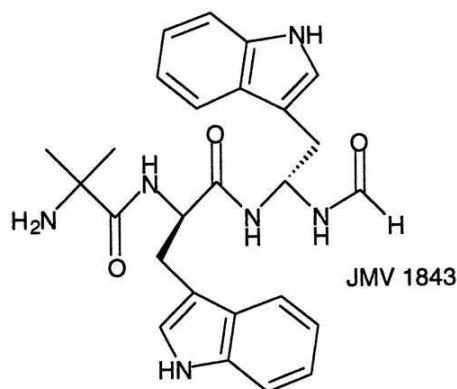
4.1 Syntéza analogů ghrelinu

4.1.1 Syntéza peptidových agonistů receptoru GHS-R1a

Peptidové analogy ghrelinu byly syntetizovány na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. (Praha, ČR) metodou syntézy na pevné fázi dle postupu Maixnerové a spolupracovníků (Maixnerová *et al.* 2007) s využitím Fmoc strategie na syntetizátoru ABI 433A. Lipidizace příslušnou mastnou kyselinou byla provedena před odštěpením peptidu z pryskyřice dříve popsáním postupem (Maletínská *et al.* 2012). Syntézu peptidů prováděla Ing. Miroslava Blechová. Struktury jednotlivých peptidových agonistů GHS-R1a jsou uvedeny v tab. 3 v oddíle 5.1.2.

4.1.2 Syntéza pseudopeptidového agonisty receptoru GHS-R1a JMV1843

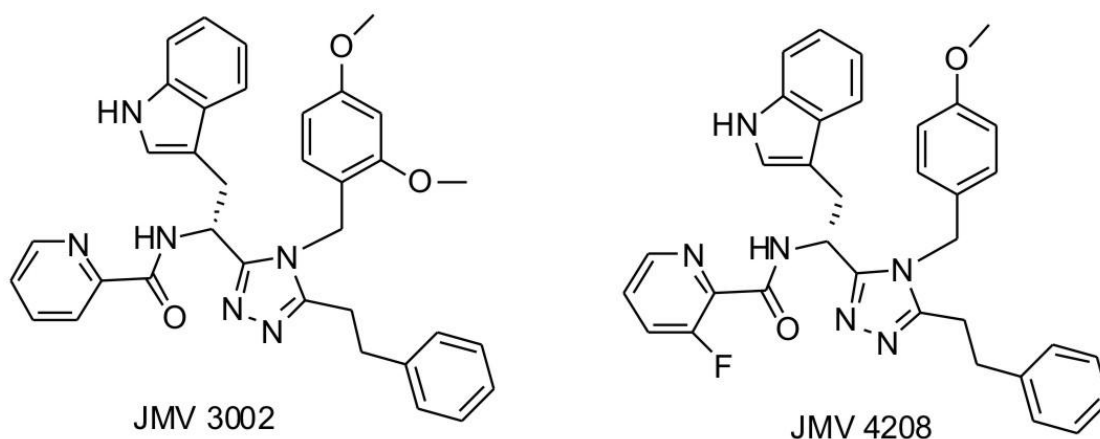
JMV1843 byl syntetizován na Institut des Biomolécules Max Mousseron (Montpellier, Francie) dle dříve popsáního postupu (Guerlavais *et al.* 2003). Jeho struktura je znázorněna na obr. 11.



Obr. 11 Struktura agonisty receptoru GHS-R1a JMV1843. Podle zdroje (Guerlavais *et al.* 2003).

4.1.3 Syntéza triazolových antagonistů receptoru GHS-R1a JMV3002 a JMV4208

JMV3002 a JMV4208 byly syntetizovány na Institut des Biomolécules Max Mousseron (Montpellier, Francie) dle dříve popsáního postupu (Moulin *et al.* 2008). Struktura obou sloučenin je znázorněna na obr. 12.



Obr. 12 *Struktury antagonistů receptoru GHS-R1a JMV3002 a JMV4208. Struktury byly poskytnuty prof. Fehrentzem (IBMM, Montpellier, Francie).*

4.2 Testování analogů ghrelinu *in vitro*

4.2.1 Vazebné experimenty

4.2.1.1 Jodace ghrelinu

Ghrelin byl jodován v laboratoři Radioizotopy, ÚOCHB AV ČR, v.v.i. (doc. RNDr. Tomáš Elbert, CSc.), a to na His⁹ pomocí Na¹²⁵I s použitím IodoGenuTM dle pokynů výrobce dříve popsaným postupem (Elbert & Veselá 2010). Jodace probíhala v 0.1 M sodnofosfátovém pufru o pH 7.2 při pokojové teplotě po dobu 15 min, mono-jodovaný ghrelin byl separován pomocí RP-HPLC (jako mobilní fáze byl použit 20-40% gradient acetonitrilu ve vodě s 1% kyselinou trifluoroctovou). Specifická aktivita [¹²⁵I]ghrelinu byla přibližně 2000 Ci/mmol. Alikvoty purifikovaného jodovaného peptidu byly uchovávány při -20 °C a spotřebovány pro vazebné experimenty v průběhu jednoho měsíce.

4.2.1.2 Kompetitivní a saturační vazebné experimenty

Vazebné experimenty byly prováděny podle principů Motulského a Neubiga (Motulsky & Neubig 2002) s využitím membrán připravených z buněčné linie HEK293T s transfekovaným receptorem GHS-R1a (Multispan), případně membrán připravených z buněčné linie LLC-PK1 s transfekovaným receptorem GHS-R1a (dar od prof. Martineze, IBMM, Montpellier).

Pro kompetitivní vazebné experimenty byl použit vazebný pufr (50 mM Tris o pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml BPTI), neznačené

analogy ghrelinu s finální koncentrací v rozmezí koncentrací 10^{-12} až 10^{-5} M a ^{125}I -ghrelin s finální koncentrací 0.05 nM. Inkubace byla prováděna v celkovém objemu 500 μl po dobu 45 minut za stálého míchání při laboratorní teplotě. Vazebná reakce byla ukončena přidáním vychlazeného vymývacího pufru (20 mM Tris o pH 7.4, 10 mM MgCl_2 , 2.5 mM EDTA, 0.015 % Triton X-100) následovaným rychlou filtrací na Brandelově přístroji přes GF/C filtry předem namočené ve vazebném pufru s 0.5 % PEI. Radioaktivita navázaná na buněčných membránách zachycených na filtrech byla změřena na γ -čítači (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter). Experimenty byly vždy prováděny v duplikátech a opakovány nejméně třikrát.

Saturační vazebné experimenty byly prováděny v prostředí stejného vazebného pufru jako kompetitivní experimenty, s použitím ^{125}I -ghrelinu v rozmezí koncentrací 0.05 – 1 nM a neznačeného ghrelinu pro určení nescifické vazby v koncentraci 10^{-5} M. Inkubace byla prováděna v celkovém objemu 500 μl po dobu 45 minut za stálého míchání při laboratorní teplotě. Vazebná reakce byla ukončena přidáním vychlazeného vymývacího pufru následovaným rychlou filtrací na Brandelově přístroji přes GF/C filtry předem namočené ve vazebném pufru s 0.5 % PEI. Radioaktivita navázaná na buněčných membránách zachycených na filtrech byla změřena na γ -čítači. Experimenty byly vždy prováděny v duplikátech.

Pro vyhodnocení kompetitivních vazebných experimentů byl použit program GraphPad Prism 5. Byla využita metoda nelineární regrese za předpokladu jednoho vazebného místa. Hodnota rovnovážné disociační konstanty neznačeného ligandu (K_i) byla vypočítána pomocí rovnice Chenga a Prussofa (obr. 13) (Cheng & Prusoff 1973) s použitím rovnovážné disociační konstanty radioligandu (K_d) 0.1938 nM získané v saturačních vazebných experimentech.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[radioligand]}{K_d}}$$

Obr. 13 Rovnice Chenga a Prussofa pro výpočet rovnovážné disociační konstanty neznačeného ligandu (K_i). Hodnoty IC_{50} se stanoví kompetitivními vazebnými experimenty, hodnoty K_d saturačními vazebnými experimenty.

4.2.2 Buněčná signalizace – funkční studie

Funkční studie byly provedeny během stáže v laboratoři prof. Martineze na Institut des Biomolécules Max Mousseron v Montpellier ve Francii ve spolupráci s Celine M'Kadmi.

4.2.2.1 Pěstování buněčné linie a transienční transfekce

Buněčná linie HEK-293T byla pěstována v růstovém médiu DMEM Glutamax, do nějž byla přidána antibiotika (penicilin 50 U/ml, streptomycin 50 µg/ml), 2 mM HEPES, 1 % neesenciálních aminokyselin a 10 % FBS. Buňky byly inkubovány při 37 °C v atmosféře obohacené 5 % oxidu uhličitého.

Pro použití k funkčním studiím byly buňky transfekovány na 96-jamkových destičkách předem potažených poly-L-ornithinem. Reakční směs pro transfekci byla v souladu s protokolem poskytnutým výrobcem transfekčního činidla připravena ze 100 ng plazmidu GHS-R1a, 0.25 µl Lipofectaminu 2000 a 50 µl kultivačního média optiMEM a před přidáním k buňkám byla po dobu 20 min preinkubována při laboratorní teplotě.

4.2.2.2 Akumulace inositolfosfátu

Akumulace inositolfosfátu (IP1) byla stanovena s použitím IP-One HTRF kitu podle protokolu doporučeného výrobcem. Buňky HEK-293T transienčně transfekované receptorem GHS-R1a (48 hod po transfekci, pěstované na 96-jamkové destičce, 50 000 buněk na jamku) byly v prostředí stimulačního pufru dodaného jako součást kitu (10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 4.2 mM KCl, 146 mM NaCl, 5.5 mM glukosa, 50 mM LiCl, pH 7.4) stimulovány testovaným ligandem v koncentracích od 10⁻¹¹ do 10⁻⁵ M v duplikátech po dobu 45 min při 37 °C.

Hodnoty EC₅₀ byly vypočítány s použitím programu GraphPad Prism 5.

4.2.2.3 Mobilizace intracelulárního kalcia

Sledování mobilizace intracelulárního kalcia bylo prováděno dle dříve popsaného postupu (Demange *et al.* 2007). Buňky HEK-293T transienčně transfekované receptorem GHS-R1a byla pěstovány na 96-jamkových destičkách (80 000 buněk na jamku). Po 24 hod a dosažení 80-95 % konfluence byly promyty 150 µl reakčního pufru (HBSS, 0.5 % BSA, 20 mM HEPES, 1 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, pH 7.4), poté byl k buňkám přidán 1 µM fluorescenční indikátor kalcia Fluo-4AM připravený v reakčním pufru s přídavkem 0.06 % kyseliny pluronové. Po hodinové inkubaci při

37 °C ve tmě byl přebytek Fluo-4AM odstraněn dvojitým promytím 100 µl reakčního pufru a k buňkám bylo přidáno 50 µl téhož pufru. Test byl prováděn pomocí FlexStation II, studované analogy byly k buňkám automaticky přidávány v koncentracích od 10^{-11} do 10^{-5} M v triplicátech.

Hodnoty EC_{50} byly vypočítány s použitím programu GraphPad Prism 5.

4.3 Testování analogů ghrelinu *in vivo*

4.3.1 Experimentální zvířata

Myši samci inbredního kmene C57BL/6 (Charles River, Německo) byli chováni v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha v areálu ústavů Akademie věd v Krči při teplotě 22 ± 2 °C a rytmu světlo/tma 12/12 hodin (začátek světla 6:00), měli volný přístup k potravě i pitné vodě. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.). Myši byly krmeny standardní dietou St-1 (Mlýn Kocanda, Jesenice, ČR), která obsahovala 66 % sacharidů, 25 % proteinů a 9 % tuků a jejíž energetická hodnota byla 3.4 kcal/g.

4.3.2 Testování akutního účinku analogů ghrelinu na příjem potravy

4.3.2.1 Testování agonistů receptoru GHS-R1a

Pro testování byli použiti myši samci kmene C57BL/6 ve stáří 12-15 týdnů. Před testem příjmu potravy byly myši syté a měly volný přístup k potravě, minimálně týden před experimentem byly umístěny v samostatných klecích. Bezprostředně před testem byla myšim odebrána potrava. Injikování fyziologického roztoku, ghrelinu i agonistů GHS-R1a rozpuštěných ve fyziologickém roztoku bylo prováděno SC, v dávkách 0.1 – 10 mg/kg tělesné hmotnosti myši (objem 0.2 ml/myš). 15 minut po injikování testované látky byla myšim podána předem zvážená potrava, která pak byla vážena každých 30 minut po dobu 8-10 hodin. Během pokusu měly myši volný přístup k pitné vodě. Podání každé dávky testovaného peptidu či pseudopeptidu bylo prováděno alespoň dvakrát, každá experimentální skupina čítala alespoň 5 myši.

4.3.2.2 Testování antagonistů receptoru GHS-R1a

Pro testování byli použiti hladoví myši samci kmene C57BL/6 ve stáří 12-15 týdnů. Minimálně týden před experimentem byly myši umístěny v samostatných klecích, 17 hodin před testem jim byla odebrána potrava a ponechán volný přístup k pitné vodě. Testování triazolové antagonisté receptoru GHS-R1a jsou nerozpustní ve vodě, byli

proto rozpouštění v 50% roztoku polyethylenglykolu 300 ve fyziologickém roztoku (dále jen 50% PEG). Jednotlivým skupinám myší byl SC injikován 50% PEG nebo jeden z testovaných antagonistů v dávce 1, 5, 10 či 20 mg/kg tělesné hmotnosti myši (objem 0.2 ml/myš). 15 minut po injikování testované látky byla myším podána předem zvážená potrava, která pak byla vážena každých 30 minut po dobu 5 hodin. Během pokusu měly myši volný přístup k pitné vodě. Podání každé dávky testovaného antagonisty receptoru GHS-R1a bylo prováděno alespoň dvakrát, každá experimentální skupina čítala alespoň 6 myší.

4.3.2.2.1 Koadministrace JMV3002 a ghrelinu

Sytým 15-týdenním samcům myšího kmene C57BL/6 byl SC injikován fyziologický roztok, ghrelin, JMV3002 nebo JMV3002 společně s ghrelinem (obě látky vždy v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti myši, objem 0.2 ml/myš, $n = 5$ myší na skupinu). 15 minut po injikování testovaných látek byla myším podána předem zvážená potrava, která pak byla vážena každých 30 minut po dobu 9 hodin. Během pokusu měly myši volný přístup k pitné vodě.

4.3.2.3 Statistické zpracování dat získaných v krátkodobých experimentech *in vivo*

Získané hodnoty jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru. Pro jejich statistické vyhodnocení byla použita metoda one-way ANOVA (jednocestná analýza rozptylu) s následným Dunnettovým *post-hoc* testem nebo metoda two-way ANOVA (dvojcestná analýza rozptylu) s následným Bonferroniho *post-hoc* testem (program GraphPad Prism 5). Rozdíly byly považovány za statisticky významné v případě, že $P < 0.05$.

Hodnoty ED_{50} byly stanoveny pomocí programu GraphPad Prism 5 jako dávky příslušných analogů potřebné k vyvolání poloviny maximálního efektu v čase 250 min od injekce daného analogu v případě agonistů GHS-R1a, v čase 45 min od injekce v případě antagonistů GHS-R1a.

4.3.3 Testování účinků analogů ghrelinu po dlouhodobém podávání

4.3.3.1 Účinky 10-denního podávání JMV1843 štíhlým myším

4.3.3.1.1 Vliv JMV1843 na příjem potravy a tělesnou hmotnost

Myši samci kmene C57BL/6 ve věku 16 týdnů byli náhodně rozděleni do skupin čítajících deset zvířat a týden před začátkem experimentu byli umístěni v samostatných klecích s volným přístupem k vodě a potravě. V průběhu pokusu byl jednotlivým skupinám myši dvakrát denně (v 8:00 a 18:00 hod) po dobu 10 dnů SC injikován buďto fyziologický roztok, nebo JMV1843 rozpuštěný ve fyziologickém roztoku, a to v dávce 5 nebo 10 mg/kg tělesné hmotnosti myši (objem 0.2 ml/myš). Celková denní dávka testovaného agonisty tedy činila 10 nebo 20 mg/kg tělesné hmotnosti myši. Souběžně s probíhajícím experimentem byl jednou denně monitorován příjem potravy a tělesná hmotnost myši.

4.3.3.1.2 Odběr krve a tkání po 10-denním podávání

Na konci experimentu byly syté myši usmrceny cervikální dislokací a byla jim odebrána krev. Z plné krve byla připravena plazma (EDTA 1.3 mg/ml krve, centrifugace 3000 x g, 15 minut při 10 °C), která byla v alikvotech uchována při -20 °C. Myším byla odebrána tuková tkáň – podkožní (SCAT), intraperitoneální (IPAT; nitrobřišní a gonadální), perirenální a hnědý (BAT) tuk. Dále byla odebrána játra a vzorek svalové tkáně (*musculus gastrocnemius*). Tkáně byly zváženy, zmrazeny v tekutém dusíku a do dalšího použití uchovány při -70 °C. Mozky byly po vyjmutí na 1 minutu vloženy do isopentanu vychlazeného na -20 °C, zmrazeny na suchém ledu a do dalšího použití uchovány při -70 °C.

4.3.3.1.3 Stanovení biochemických parametrů v plazmě

Plazmatické hladiny inzulínu a adiponektinu byly stanoveny pomocí RIA kitů, plazmatické hladiny leptinu a IGF-1 pomocí ELISA kitů. Hladiny glukózy byly měřeny glukometrem. Všechna stanovení byla prováděna v souladu s protokoly doporučenými výrobcem.

4.3.3.1.4 Stanovení exprese mRNA v tukové a svalové tkáni

Vzorky tukové tkáně (BAT a IPAT) a svalové tkáně byly homogenizovány v MagNA Lyser homogenizátoru s použitím MagNA Lyser Green Beads. Celková RNA byla extrahována z homogenizovaných vzorků pomocí MagNA Pure Compact RNA

Isolation (Tissue) Kitu na automatickém izolátoru MagNA Pure Compact Instrument dle pokynů výrobce. Koncentrace extrahované RNA byla stanovena z absorbance při 260 nm a její integrita byla ověřena elektroforézou v 1% agarózovém gelu. 0.25 µg celkové RNA bylo s použitím náhodných primerů přepsáno do cDNA pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu dle návodu výrobce. Expres mRNA byla stanovena pomocí PCR systému ABI PRISM 7500 Real-Time PCR Instrument. Součástí reakční směsi byl 1 µg cDNA, TaqMan® Universal PCR Master Mix, 12.5 µl NO AmpErase® UNG a 1.25 µl specifické hydrolyzační sondy TaqMan® Gene Expression Assays. PCR amplifikace probíhala v celkovém objemu reakční směsi 25 µl v prostředí vody prosté nukleas, za standardních podmínek (50 °C 2 min, iniciační denaturace 95 °C 10 min, následovaná 40 cykly, v nichž annealing probíhal při 60 °C 1 min a hydrolýza při 95 °C 15 s). Jako vnitřní standard pro kompenzaci množství RNA použitého v reakci a pro korekci účinnosti reverzní transkripce a PCR byl použit β₂-mikroglobulin (B2M), případně 18S rRNA. Míra exprese byla vyjádřena jako relativní genová exprese a byla vypočítána pomocí vzorce $2^{-\Delta Ct}$, kde Ct (threshold cycle) je minimální počet cyklů, při němž fluorescence vzorku překročí prahovou hodnotu.

V BAT byla sledována exprese UCP-1 (uncoupling protein 1), v IPAT byla sledována exprese ACACA (acetyl-CoA karboxyláza 1), FASN (syntáza mastných kyselin), LPL (lipoproteinová lipáza), SCD (stearoyl-CoA desaturáza 1) a UCP-2. Ve svalové tkáni byla sledována exprese myostatínu, myogeninu, MHC4 (těžký řetězec myosinu 4) a IGF-1 (růstový faktor podobný inzulinu).

Expres mRNA byly stanovovány v Laboratoři molekulární diabetologie a obezitologie na 3. interní klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice ve spolupráci s RNDr. Zdenou Lacinovou a Miloslavou Čechovou.

4.3.3.1.5 Stanovení exprese mRNA v mozku

200 µm silné koronální řezy byly krájeny pomocí kryotomu (počátek krájení 1.25 mm od bregmy), nataženy na podložní skla a na 50 s ponořeny do absolutního ethanolu. Bezprostředně poté byl pod mikroskopem žiletkou vyříznut mediobazální hypothalamus, jehož tkáň byla homogenizována v RNA extrakčním lyzačním pufu a do extrakce RNA uchována při -70 °C. Izolaci medibazálního hypothalamu prováděli PharmDr. Zdeno Pirník, PhD. a RNDr. Alexander Kiss, DrSc. z Ústavu experimentální endokrinologie SAV v Bratislavě.

Celková RNA byla z homogenizované tkáně izolována s použitím RNAqueous Micro Kitu. Koncentrace extrahované RNA byla stanovena z absorbance při 260 nm a její integrita byla ověřena elektroforézou v 1% agarózovém gelu. Získaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu s použitím náhodných primerů. Expze mRNA byla stanovena pomocí PCR systému ABI PRISM 7000 Sequence Detector s použitím TaqMan produktů pro stanovování genové expze od firmy Applied Biosystems (viz oddíl 4.3.3.1.4), za standardních podmínek (95 °C 10 min, 40 cyklů 95 °C 15s a 60 °C 1 min). Jako vnitřní standard pro kompenzaci množství RNA použitého v reakci a pro korekci účinnosti reverzní transkripce a PCR byla použita glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH). Míra expze byla vyjádřena jako relativní genová expze.

V mediobazálním hypothalamu byla sledována expze neuropeptidu Y (NPY) a agouti-related proteinu (AgRP).

Expze mRNA byly stanovovány na Ústavu normální, patologické a klinické fyziologie 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (doc. Ing. Jana Jurčovičová, CSc., PharmDr. Andrea Štofková, PhD.).

4.3.3.2 Účinky 14-denního podávání JMV3002 a JMV4208 obézním myším

4.3.3.2.1 Myší model obezity indukované podáváním vysokotukové diety

Model obezity indukované dietou (DIO) byl zaveden u myších samců kmene C57BL/6. Do 8. týdne věku konzumovaly myši standardní dietu (St-1), od 8. týdne věku pak dietu vysokotukovou (HF, z angl. high fat). HF dieta byla složena ze 40 % standardní diety St-1, 34 % Sunaru, 25 % vepřového sádla a 1 % kukuřičného škrobu (Kopecký *et al.* 1996). Dieta obsahovala 13 % proteinů, 27 % sacharidů a 60 % tuků a její energetická hodnota činila 5.3 kcal/g (energetická hodnota St-1 diety je 3.4 kcal/g).

Do 20. týdne věku myši byl pravidelně jednou týdně sledován příjem potravy a přírůstek hmotnosti myší. Myši rezistentní vůči vzniku obezity indukované dietou (přibližně 15 % myší krměných HF dietou) byly z experimentu vyřazeny. Průměrná tělesná hmotnost DIO myší použitých pro následující experimenty byla 47 g, přičemž průměrná tělesná hmotnost štíhlých myších samců kmene C57BL/6 stejného věku se pohybuje mezi 25-30 g.

4.3.3.2.2 Vliv JMV3002 a JMV4208 na příjem potravy a tělesnou hmotnost

Týden před začátkem dlouhodobého experimentu byly myši náhodně rozděleny do skupin čítajících deset zvířat a byly umístěny do samostatných klecí s volným přístupem k HF dietě a pitné vodě. V průběhu pokusu byl jednotlivým skupinám myši dvakrát denně (v 8:00 a 18:00 hod) po dobu 14 dnů SC injikován buďto 50% PEG, nebo jeden z antagonistů GHS-R1a JMV3002 či JMV4208 rozpuštěný v 50% PEG, a to v dávce 10 nebo 20 mg/kg tělesné hmotnosti myši (objem 0.2 ml/myš). Souběžně s probíhajícím experimentem byl jednou denně monitorován příjem potravy a tělesná hmotnost myši. Mimoto byly zavedeny dvě skupiny tzv. párově krmených myši (angl. pair-fed) ke skupinám, jimž byla injikována vyšší dávka JMV3002 či JMV4208. Párově krmené myši dostávaly přesně stejné množství potravy, jaké konzumovala skupina myši po injekci JMV3002 či JMV4208 v příslušný den dlouhodobého pokusu na příjem potravy. Všechny myši měly během celého pokusu volný přístup k vodě.

4.3.3.2.3 Odběr krve a tkání po 14-denním podávání

Na konci experimentu byly hladové myši (hladovění po dobu 17 hod přes noc) usmrceny cervikální dislokací a byla jim odebrána krev, z níž byla standardním postupem připravena plazma. Myším byla odebrána tuková tkáň, svalová tkáň a játra; vzorky tkání byly zpracovány, jak je popsáno v oddíle 4.3.3.1.2.

4.3.3.2.4 Stanovení biochemických parametrů v plazmě

Plazmatické hladiny inzulínu a adiponektinu byly stanoveny pomocí RIA kitů, plazmatické hladiny leptinu pomocí ELISA kitu. Hladiny glukózy byly měřeny glukometrem. Plazmatické hladiny triglyceridů byly stanoveny kvantitativní enzymatickou reakcí. Všechna stanovení byla prováděna v souladu s protokoly doporučenými výrobcem.

4.3.3.2.5 Stanovení exprese mRNA v tukové tkáni a játrech

Metodika stanovení expresí mRNA v tukové tkáni (BAT, SCAT, IPAT) a játrech byla shodná s metodikou popsanou v oddíle 4.3.3.1.4.

V BAT byla sledována exprese UCP-1, ve SCAT a IPAT byla sledována exprese ACACA, FASN, LPL, adiponektinu, leptinu a FABP-4 (protein vázající mastné kyseliny). V játrech byla stanovena exprese ACACA, FASN, PEPCCK (fosfoenolpyruvát karboxykináza), SREBP (protein vázající sterolový regulační element) a CPT-1 (karnitinpalmitoyl transferáza 1).

4.3.3.2.6 Stanovení exprese mRNA v mozku

Metodika stanovení exprese mRNA v tukové tkáni (BAT, SCAT, IPAT) a játrech byla shodná s metodikou popsanou v oddíle 4.3.3.1.5.

V mediobazálním hypothalamu byla sledována exprese NPY, AgRP a POMC.

4.3.3.3 Statistické vyhodnocení dat získaných v dlouhodobých experimentech

Získané hodnoty jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru. Pro jejich statistické vyhodnocení byl použit program GraphPad Prism 5. Použitá statistická metoda – one-way ANOVA (jednocestná analýza rozptylu) následovaná Dunnettovým *post-hoc* testem, two-way ANOVA (dvojcestná analýza rozptylu) následovaná Bonferroniho *post-hoc* testem, nebo t-test – je vždy uvedena u příslušných výsledků. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud $P < 0.05$.

4.4 Farmakokinetika

4.4.1 Farmakokinetika vybraných peptidových analogů ghrelinu

Farmakokinetika byla testována po periferním podání potkanům. Potkaní samci kmene Wistar (Harlan, Itálie) byli chováni v akreditovaném zvěřinci Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i., Praha při teplotě 22 ± 2 °C a rytmu světlo/tma 12/12 hodin (začátek světla 6:00), měli volný přístup k potravě i pitné vodě. Potkani byli krmeni standardní dietou St-1.

Pro určení množství vybraných analogů ghrelinu v krvi byl potkanům SC injikován peptid v dávce 5 mg/kg ($n = 3$ potkani na skupinu). Před injekcí a poté v čase 30 min, 1, 2, 4 a 8 hodin po injekci byla potkanům odebrána krev z ocasní žíly, která byla dále zpracována na plazmu. Hladiny analogů ghrelinu v krvi byly změřeny pomocí ELISA kitu podle protokolu poskytnutého výrobcem.

4.4.2 Stabilita a farmakokinetika JMV1843

Pro zjištění stability JMV1843 v myším séru *in vitro* byla do krevního séra dospělých myších samců kmene C57BL/6 přidána sloučenina JMV1843 do finální koncentrace 10^{-6} M, sérum bylo inkubováno při 37 °C. Vzorky séra byly odebírány v časech 30 min, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 a 144 hodin od počátku inkubace, bezprostředně po odebrání byly zmrazeny a uchovány při -20 °C.

Pro měření farmakokinetiky *in vivo* bylo myším samcům C57BL/6 SC injikováno 0.2 ml JMV1843 ve fyziologickém roztoku, a to v dávce 5 nebo 10 mg/kg

tělesné hmotnosti myši (3 myši na skupinu). Myši byly usmrceny cervikální dislokací v časech 10 min, 30 min, 1, 2, 4 a 8 hodin po injekci a byla jim odebrána krev. Z plné krve bylo po oddělení krevního koláče připraveno krevní sérum (centrifugace 3000 x g, 15 min při 10 °C), které bylo uchováno při -20 °C.

JMV1843 byl ze vzorků séra z obou popsaných experimentů extrahován s použitím dříve popsané metody precipitace proteinů acetonitrilem (Hatzieremia *et al.* 2007). Koncentrace JMV1843 ve vzorcích byla stanovena pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). LC-MS systém byl tvořen kapalinovým chromatografem Alliance HPLC a hybridním hmotnostním spektrometrem Q-TOF-Micro. Ke chromatografické separaci byla použita kolona Discovery HS C18 (velikost částic sorbentu 5 µm, vnitřní rozměry kolony 50 x 2.1 mm). Mobilní fáze A byla tvořena 0.1 % kyselinou mravenčí ve vodě, mobilní fáze B byla tvořena 0.1 % kyselinou mravenčí v acetonitrilu. Pro separaci analytu byl použit gradient 5 - 100 % mobilní fáze B.

LC-MS analýza byla prováděna ve spolupráci s doc. RNDr. Dr. Davidem Sýkorou z Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha.

4.4.3 Farmakokinetika JMV3002 a JMV4208

Pro měření farmakokinetiky *in vivo* bylo myším samcům C57BL/6 SC injikováno 0.2 ml JMV3002 nebo JMV4208 v 50% PEG, a to v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti myši (3 myši na skupinu). Myši byly usmrceny cervikální dislokací v časech 30 min, 1, 2, 4 a 8 hodin po injekci a byla jim odebrána krev. Z plné krve byla připravena krevní plazma, která byla uchována při -20 °C.

Analyzované sloučeniny byly ze vzorků plazmy extrahovány pomocí precipitace proteinů acetonitrilem a podrobeny LC-MS analýze. LC-MS systém byl tvořen kapalinovým chromatografem Agilent 1200 LC a hmotnostním spektrometrem API 3200. Ke chromatografické separaci byla použita kolona Eclipse Plus C18 (velikost částic sorbentu 5 µm, vnitřní rozměry kolony 50 x 2.1 mm) s předkolonou o rozměrech 12.5 x 2.1 mm naplněnou stejným sorbentem.

LC-MS analýza byla prováděna ve spolupráci s doc. RNDr. Dr. Davidem Sýkorou z Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha.

5 VÝSLEDKY

5.1 Dlouhodobě působící peptidoví agonisté receptoru GHS-R1a

5.1.1 První série stabilních peptidových agonistů GHS-R1a s prodlouženým orexigenním účinkem

Nové analogy ghrelinu, o nichž je pojednáváno v dalších oddílech této kapitoly, vycházejí ze struktury námi dříve publikovaných agonistů GHS-R1a (Maletínská *et al.* 2012). V této první sérii analogů byl ghrelin modifikován záměnou Ser³ za diaminopropionovou kyselinu, což umožnilo navázání oktanoylu stabilní amidovou vazbou a tedy ochranu molekuly před hydrolyzou esterázami. Dalšími modifikacemi, jejichž cílem bylo zvýšení stability výsledné molekuly, byla náhrada Gly¹ sarkosinem a/nebo náhrada Phe⁴ nekódovými aminokyselinami naftylalaninem nebo cyklohexylalaninem.

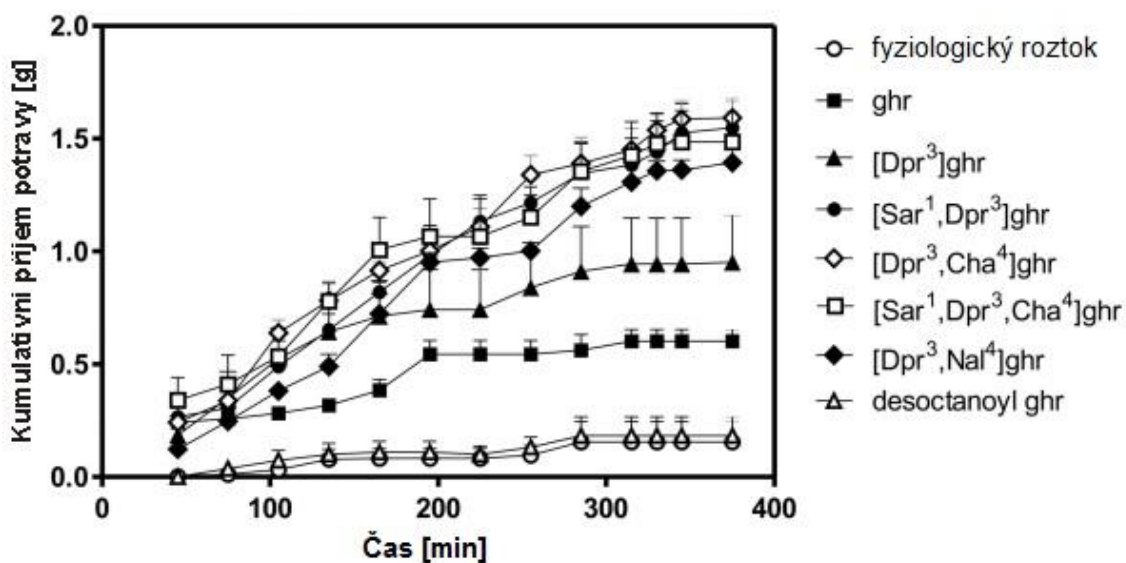
Analogy byly testovány ve vazebných studiích na buněčných membránách z buněk LLC PK-1 s transfekovaným receptorem GHS-R1a; všechny analogy se vázaly na membrány s hodnotou K_i řádově 10^{-9} – 10^{-10} , přičemž nejlepší vazbu vykazovaly analogy s naftylalaninem v pozici 4 (tab. 2).

Při testech příjmu potravy po SC podání myším bylo zjištěno, že analogy mají signifikantní účinek na zvýšení příjmu potravy ve srovnání s kontrolní skupinou; navíc účinek analogů s nekódovými aminokyselinami trval podstatně déle než účinek ghrelinu a byl také výraznější (tab. 2, obr. 13). Analogy také oproti ghrelinu vykazovaly významně vyšší stabilitu při inkubaci v myší krevní plazmě (obr. 14).

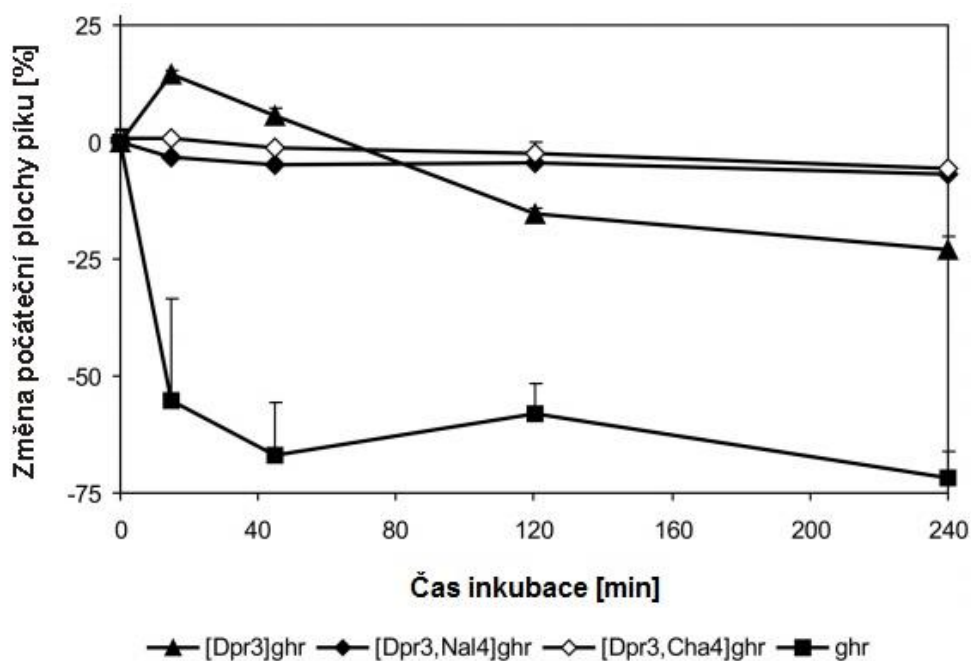
Tab. 2 *Struktura a biologické vlastnosti analogů ghrelinu*

| Analog | K_i [nM] – vytěsnění ¹²⁵ I ghr | ED ₅₀ (mg/kg) – orexigenní efekt |
|--|---|---|
| 1 Ghrelin | 3.67 ± 1.05 | 2.39 ± 1.07 |
| 2 [Dpr ³]ghrelin | 3.28 ± 1.03 | 0.82 ± 0.37 |
| 3 [Sar ¹ , Dpr ³]ghrelin | 2.56 ± 1.64 | 0.65 ± 0.29 |
| 4 [Dpr ³ , Nal ⁴]ghrelin | 0.49 ± 0.09 | 1.13 ± 0.51 |
| 5 [Sar ¹ , Dpr ³ , Nal ⁴]ghrelin | 0.32 ± 0.12 | 1.27 ± 0.57 |
| 6 [Dpr ³ , Chal ⁴]ghrelin | 1.67 ± 0.31 | 0.35 ± 0.16 |
| 7 [Sar ¹ , Dpr ³ , Cha ⁴]ghrelin | 2.70 ± 1.42 | 0.46 ± 2.07 |

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM z alespoň tří nezávislých experimentů. K_i byly vypočítány podle rovnice Chenga a Prusoffa s použitím hodnoty K_d 0.44 nM. ED₅₀ byly stanoveny 250 min po SC podání analogů v dávkách 0.1 - 10 mg/kg myším (n=5-6).



Obr. 13 Účinek analogů ghrelinu na příjem potravy po podání štíhlým sytým myším. Peptidy byly podávány SC v dávce 5 mg/kg, příjem potravy byl monitorován po dobu 6 hodin po podání peptidů a je vyjádřen v g zkonsumované potravy (průměr ± SEM, n = 5-6 myši). $P < 0.05$ (ghrelin vs. fyziologický roztok), $P < 0.001$ (analogy s nekódovými aminokyselinami vs. fyziologický roztok).



Obr. 14 Degradční profil analogů ghrelinu v myší krevní plazmě. Analogy byly inkubovány v plazmě v koncentraci 1 μM , vzorky odebrané ve vyznačených časových intervalech byly podrobeny LC-MS analýze. Data jsou vyjádřena jako změna počáteční plochy píku, která je úměrná koncentraci látek v krvi.

5.1.2 Syntéza peptidových agonistů GHS-R1a

Byla syntetizována série dlouhodobě působících stabilních agonistů GHS-R1a, u nichž byl N-terminální Gly nahrazen sarkosinem a Ser³ diaminopropionovou kyselinou. Dále byla provedena jedna nebo více z následujících modifikací, jejichž cílem bylo zejména zvýšit stabilitu molekul a zlepšit jejich průchod hematoencefalickou bariérou:

- oktanová kyselina na Dpr³ byla nahrazena mastnou kyselinou s delším řetězcem (dekanová, myristová, palmitová), nenasyčenou mastnou kyselinou (undecynová, decenová) nebo dalšími kyselinami (adamantanoctová, bromoktanová)
- do struktury byla začleněna druhá mastná kyselina – palmitoyl připojený na sekundární aminoskupinu lysinu v C-koncové části molekuly (u analogů s plnou délkou řetězce na Lys²⁴, u zkrácených analogů na Lys¹⁶)
- bylo obměněno aminokyselinové složení (záměna Phe⁴ za naftylalanin, cyklohexylalanin, tercbutylalanin, nitrofenylalanin či dichlorofenylalanin)
- byl zkrácen peptidový řetězec (18 aminokyselin od N-konce sekvence ghrelinu)

Čistota a identita peptidů byla ověřena pomocí HPLC a MS, čistota byla vyšší než 95 %. Aminokyselinové sekvence všech peptidů jsou uvedeny v tab. 3.

Význam zkratk v této tabulce:

1-ada: 1-adamantanacetyl; 8-bromoact: 8-bromooktanoyl; Cha: cyklohexylalanin; dec: dekanoyl; 9-decen: 9-decenoyl; Dpr: diaminopropionová kyselina; myr: myristoyl; Nal: naftylalanin; oct: oktanoyl; palm: palmitoyl; PheCl₂: dichlorofenylalanin; PheNO₂: nitrofenylalanin; Sar: sarkosin; tBu: tercbutylalanin; 10-undecyn:10-undecynoyl.

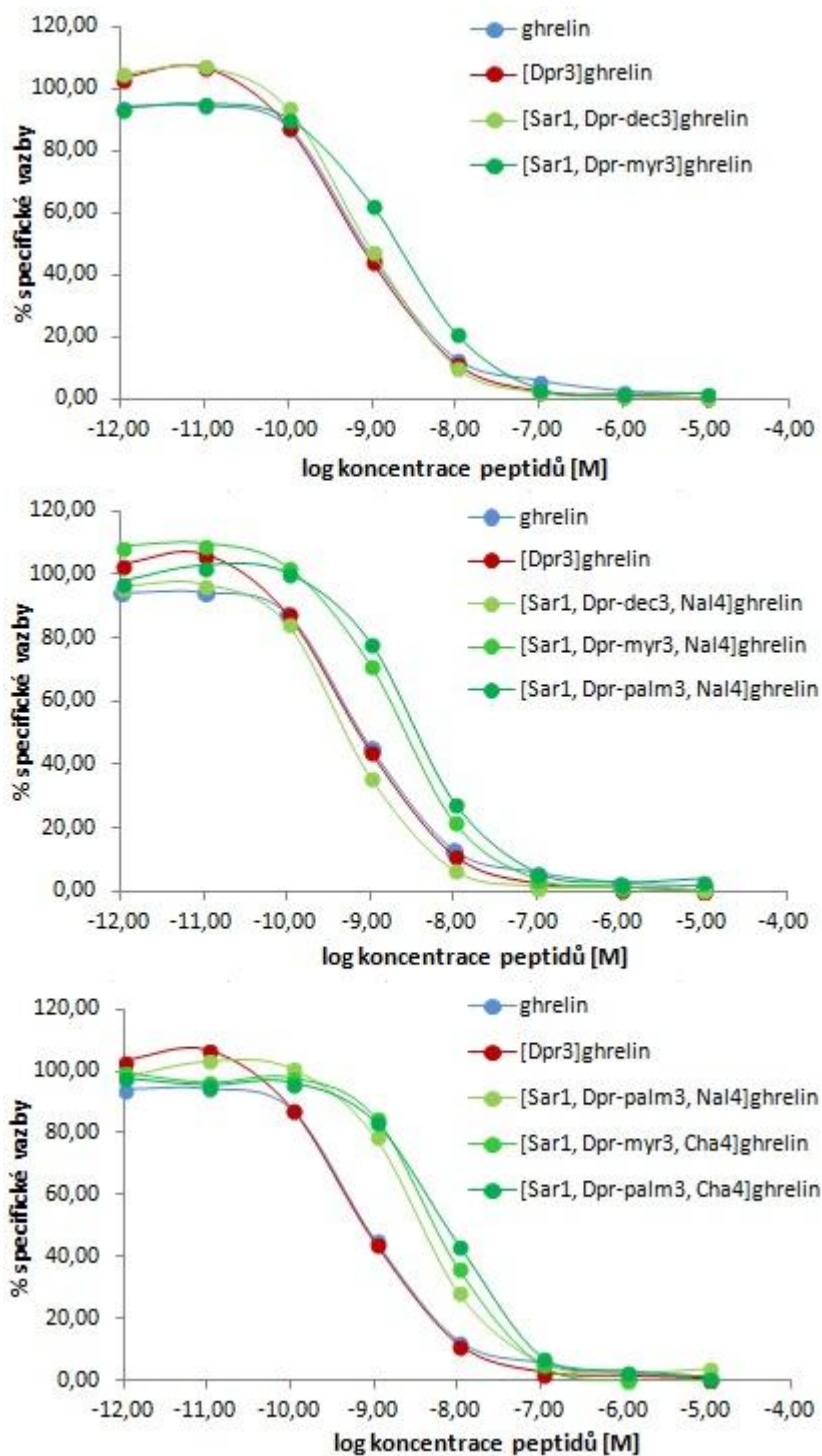
5.1.3 Testování peptidových agonistů GHS-R1a *in vitro*

Kompetitivní vazebné studie s analogy ghrelinu byly prováděny na buněčných membránách připravených z buněk s transfekovaným receptorem GHS-R1a s použitím dříve optimalizovaných experimentálních podmínek (Maletínská *et al.* 2012).

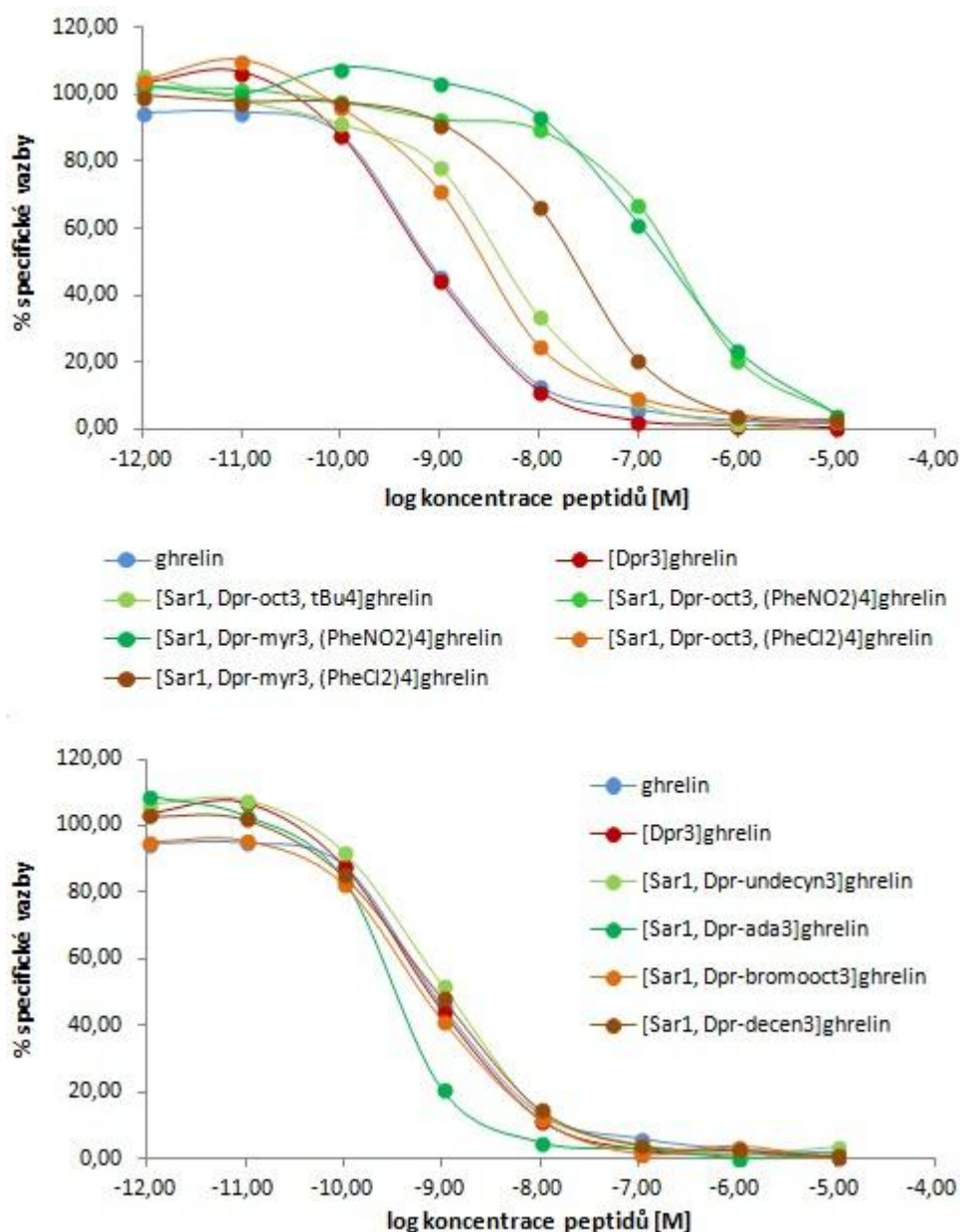
¹²⁵I-ghrelin byl vytěsňován vzrůstající koncentrací neznačených analogů ghrelinu. Reprezentativní vazebné křivky jsou znázorněny na obr. 15-17. Z těchto křivek byly získány hodnoty IC₅₀, které byly použity k výpočtu K_i dle rovnice Chenga a Prusoffa s využitím hodnoty K_d 0.1938 nM získané v saturačních vazebných experimentech na membránách s transfekovaným receptorem GHS-R1a. Výsledné hodnoty K_i jsou shrnuty v tab. 4 spolu s přepočtem na % vazby ghrelinu.

Tab. 3 *Struktura peptidových agonistů receptoru GHS-R1a*

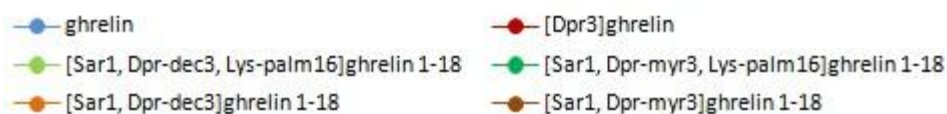
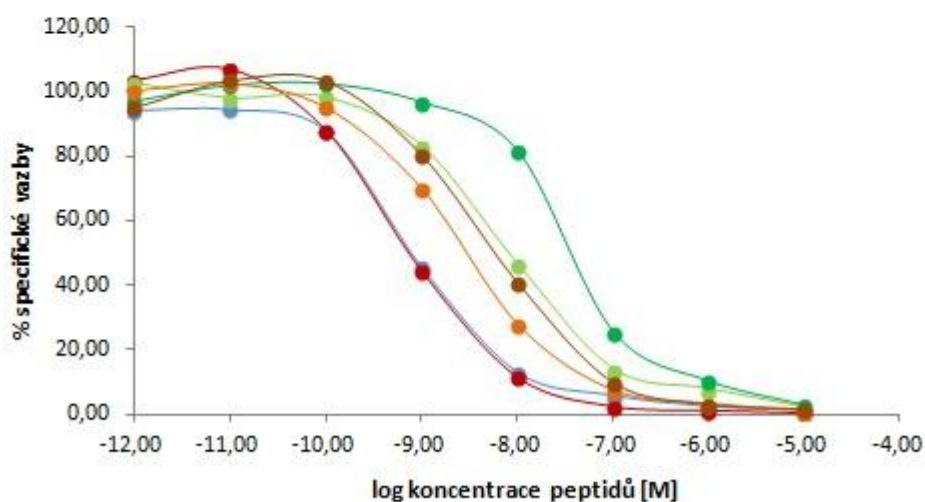
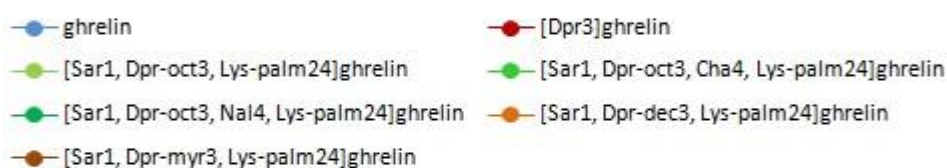
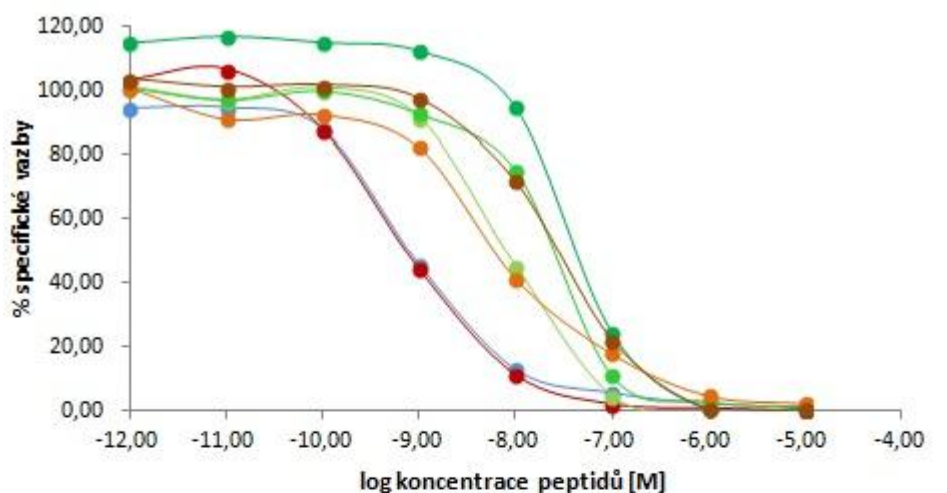
| | | |
|----|---|--|
| | Ghrelin | GS(S-oct)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| | [Dpr ³]ghrelin | GS(Dpr-oct)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 1 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-dec)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 2 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-myr)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 3 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Nal ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-dec)(1-Nal)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 4 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Nal ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-myr)(1-Nal)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 5 | [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Nal ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-palm)(1-Nal)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 6 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Cha ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-dec)(Cha)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 7 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Cha ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-myr)(Cha)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 8 | [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Cha ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-palm)(Cha)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 9 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , tBu ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-oct)(tBu)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 10 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , PheNO ₂ ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-oct)(PheNO ₂)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 11 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , PheNO ₂ ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-myr)(PheNO ₂)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 12 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , PheCl ₂ ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-oct)(PheCl ₂)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 13 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , PheCl ₂ ⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-myr)(PheCl ₂)LSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 14 | [Sar ¹ , Dpr-undecyn ³]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-10-undecyn)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 15 | [Sar ¹ , Dpr-ada ³]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-1-ada)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 16 | [Sar ¹ , Dpr-bromooc ³]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-8-bromooc)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 17 | [Sar ¹ , Dpr-decen ³]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-9-decen)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR |
| 18 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-oct)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAK(N-palm)LQPR |
| 19 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Cha ⁴ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-oct)(Cha)LSPEHQKAQQRKESKKPPAK(N-palm) LQPR |
| 20 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Nal ⁴ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-oct)(Nal)LSPEHQKAQQRKESKKPPAK(N-palm) LQPR |
| 21 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-dec)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAK(N-palm)LQPR |
| 22 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | (Sar)S(Dpr-N-myr)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAK(N-palm)LQPR |
| 23 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Lys-palm ¹⁶]ghrelin 1-18 | (Sar)S(Dpr-N-dec)FLSPEHQKAQQRK(N-palm)ES |
| 24 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Lys-palm ¹⁶]ghrelin 1-18 | (Sar)S(Dpr-N-myr)FLSPEHQKAQQRK(N-palm)ES |
| 25 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelin 1-18 | (Sar)S(Dpr-N-dec)FLSPEHQKAQQRKES |
| 26 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelin 1-18 | (Sar)S(Dpr-N-myr)FLSPEHQKAQQRKES |



Obr. 15 Kompetitivní vazebné křivky ^{125}I -ghrelinu a peptidových analogů ghrelinu na membránách buněk s transfekovaným receptorem *GHS-R1a* – analogy s modifikací v pozici 4 (*Cha*, *Nal*) a různě dlouhými mastnými kyselinami. ^{125}I -ghrelin byl vytěšňován vzrůstající koncentrací neznačených peptidů. Typické vazebné křivky jsou vyneseny jako % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10^{-5} M ghrelinu) v závislosti na logaritmu koncentrace peptidů.



Obr. 16 Kompetitivní vazebné křivky ^{125}I -ghrelinu a peptidových analogů ghrelinu na membránách buněk s transfekovaným receptorem *GHS-R1a* – analogy s modifikací v pozici 4 (tBu, PheNO₂, PheCl₂) a/nebo různými mastnými kyselinami. ^{125}I -ghrelin byl vytěsňován vzrůstající koncentrací neznačených peptidů. Typické vazebné křivky jsou vyneseny jako % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10^{-5} M ghrelinu) v závislosti na logaritmu koncentrace peptidů.



Obr. 17 Kompetitivní vazebné křivky ¹²⁵I-ghrelinu a peptidových analogů ghrelinu na membránách buněk s transfekovaným receptorem GHS-R1a – analogy se dvěma mastnými kyselinami a zkrácené analogy s jednou nebo dvěma mastnými kyselinami. ¹²⁵I-ghrelin byl vytěšňován vzrůstající koncentrací neznačených peptidů. Typické vazebné křivky jsou vyneseny jako % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10⁻⁵ M ghrelinu) v závislosti na logaritmu koncentrace peptidů.

Všechny testované analogy ghrelinu se vázaly s vysokou afinitou na buněčné membrány z buněk s transfekovaných receptorem GHS-R1a. S afinitou srovnatelnou s ghrelinem se vázaly analogy č. 2, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 17, 18, 21, 23, 25, 26, s vyšší afinitou pak analogy 1, 3, 6, 14, 15, 16; všechny tyto analogy měly hodnoty K_i řádově 10^{-9} - 10^{-10} nM. Hodnoty K_i zbývajících analogů byly řádově 10^{-7} - 10^{-8} nM.

Tab. 4 Afinita analogů ghrelinu k receptoru GHS-R1a.

| | Analog | K_i [nM] | % vazby ghrelinu |
|----|---|-----------------|------------------|
| | Ghrelin | 1.15 ± 0.20 | 100 |
| | [Dpr ³]ghrelin | 0.68 ± 0.02 | 169 |
| 1 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelin | 0.63 ± 0.03 | 183 |
| 2 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelin | 2.10 ± 0.16 | 54 |
| 3 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Nal ⁴]ghrelin | 0.65 ± 0.07 | 176 |
| 4 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Nal ⁴]ghrelin | 2.01 ± 0.11 | 57 |
| 5 | [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Nal ⁴]ghrelin | 4.25 ± 0.64 | 27 |
| 6 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Cha ⁴]ghrelin | 1.04 ± 0.06 | 110 |
| 7 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Cha ⁴]ghrelin | 6.41 ± 0.51 | 18 |
| 8 | [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Cha ⁴]ghrelin | 5.89 ± 0.38 | 20 |
| 9 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , tBu ⁴]ghrelin | 4.71 ± 0.45 | 24 |
| 10 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , PheNO ₂ ⁴]ghrelin | 230 ± 25.6 | 0.5 |
| 11 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , PheNO ₂ ⁴]ghrelin | 126 ± 7.18 | 0.9 |
| 12 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , PheCl ₂ ⁴]ghrelin | 2.45 ± 0.37 | 47 |
| 13 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , PheCl ₂ ⁴]ghrelin | 16.8 ± 1.81 | 7 |
| 14 | [Sar ¹ , Dpr-undecyn ³]ghrelin | 0.83 ± 0.02 | 139 |
| 15 | [Sar ¹ , Dpr-ada ³]ghrelin | 0.27 ± 0.01 | 425 |
| 16 | [Sar ¹ , Dpr-bromooct ³]ghrelin | 0.79 ± 0.08 | 145 |
| 17 | [Sar ¹ , Dpr-decen ³]ghrelin | 1.51 ± 0.43 | 76 |
| 18 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | 6.09 ± 0.74 | 19 |
| 19 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Cha ⁴ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | 20.8 | 6 |
| 20 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Nal ⁴ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | 23.3 ± 5.34 | 5 |
| 21 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | 4.27 ± 0.45 | 27 |
| 22 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | 14.9 ± 2.94 | 7 |
| 23 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Lys-palm ¹⁶]ghrelin 1-18 | 5.99 ± 0.79 | 19 |
| 24 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Lys-palm ¹⁶]ghrelin 1-18 | 51 ± 8.65 | 2 |
| 25 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelin 1-18 | 3.71 ± 0.78 | 30 |
| 26 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelin 1-18 | 3.38 ± 0.90 | 34 |

¹²⁵I-ghrelin byl vytěšňován vzrůstající koncentrací neznačených peptidů. Hodnoty K_i jsou uvedeny jako průměr \pm SEM alespoň ze tří experimentů, mimo analogu č. 19, který byl z důvodu nedostatku peptidu testován pouze jednou.

Dále byly vybrané analogy ghrelinu testovány ve funkčních studiích sledujících aktivaci signalizačních drah ghrelinu. Testované analogy působily srovnatelně s ghrelinem (případně [Dpr³]ghrelinem) na mobilizaci intracelulárního kalcia a aktivaci inositolfosfátové kaskády (tab. 5).

Tab. 5 Akumulace inositolfosfátu (IP1) a uvolňování Ca²⁺

| | Analog | IP1 – EC ₅₀ [nM] | Ca ²⁺ - EC ₅₀ [nM] |
|---|---|-----------------------------|--|
| | Ghrelín | NT | 3.32 |
| | [Dpr ³]ghrelín | 16.3 | NT |
| 1 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelín | 12.6 | 9.66 |
| 2 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelín | 7.10 | 36.6 |
| 3 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Nal ⁴]ghrelín | 2.08 | 18.6 |
| 4 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Nal ⁴]ghrelín | 9.75 | 10.9 |
| 5 | [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Nal ⁴]ghrelín | 4.01 | 6.64 |
| 6 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Cha ⁴]ghrelín | 3.28 | 10.6 |
| 7 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Cha ⁴]ghrelín | 3.08 | 11.4 |
| 8 | [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Cha ⁴]ghrelín | 4.25 | NT |

NT: netestováno.

5.1.4 Testování peptidových agonistů GHS-R1a *in vivo*

Akutní orexigenní účinek testovaných peptidů byl sledován po periferním (SC) podání štíhlým sytým myším samcům s použitím dávek 0.1 – 10 mg/kg tělesné hmotnosti myši; kumulativní příjem potravy byl monitorován po dobu 8 – 10 hodin. Všechny testované peptidy zvyšovaly příjem potravy v závislosti na dávce, a to ve většině případů srovnatelně nebo účinněji než ghrelín, případně [Dpr³]ghrelín.

Tab. 6 uvádí hodnoty ED₅₀ (dávky příslušných analogů potřebné k vyvolání poloviny maximálního efektu), které byly stanoveny v čase 250 min od injekce daného analogu, tedy v čase největšího účinku. Dále je v tab. 6 uveden maximální efekt jednotlivých analogů v čase 480 min od podání vztažený na maximální účinek [Dpr³]ghrelinu ve stejném čase od podání.

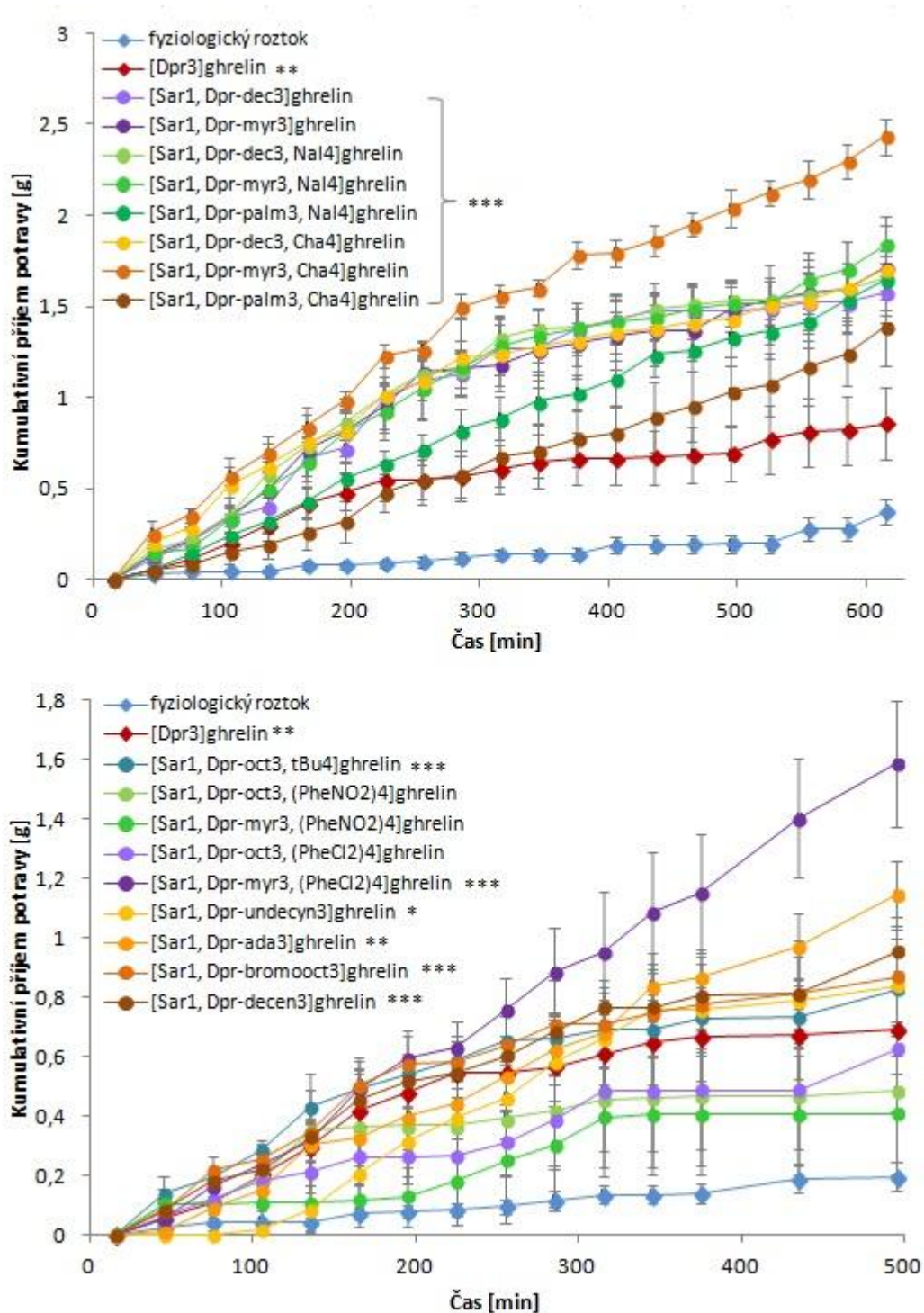
Na obr. 18 – 19 je pak porovnán orexigenní účinek jednotlivých analogů injikovaných v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti myši. Obr. 20 uvádí příklady závislosti příjmu potravy na dávce pro vybrané analogy.

Orexigenní působení všech testovaných analogů bylo dlouhodobé, účinek trval po celou dobu experimentu, tedy minimálně 8 hodin.

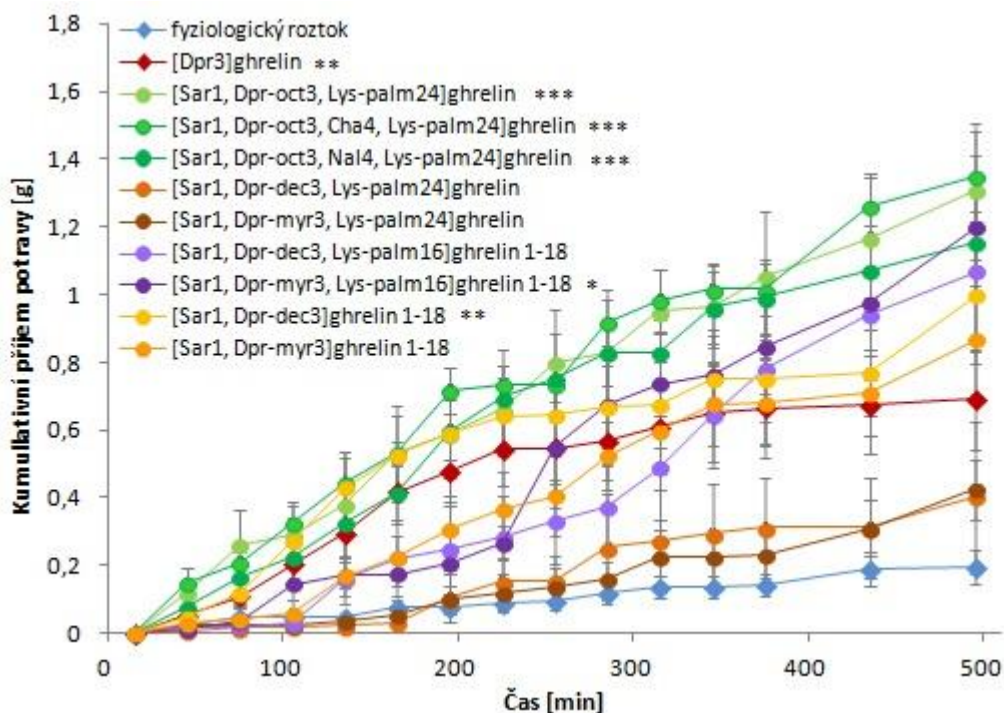
Tab. 6 Biologická aktivita analogů ghrelinu in vivo – účinek na příjem potravy po periferním podání štíhlým sytým myším

| | Analog | ED₅₀ [mg/kg] | max. efekt [% Dpr³ghr] |
|----|---|--------------------------------|--|
| | Ghrelin | 2.39 | 106.5 |
| | [Dpr ³]ghrelin | 0.82 | 100 |
| 1 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelin | 3.90 | 218.8 |
| 2 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelin | 3.80 | 202.7 |
| 3 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Nal ⁴]ghrelin | 0.64 | 220.3 |
| 4 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Nal ⁴]ghrelin | 6.02 | 212.8 |
| 5 | [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Nal ⁴]ghrelin | 5.16 | 183.3 |
| 6 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Cha ⁴]ghrelin | 1.02 | 204.5 |
| 7 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Cha ⁴]ghrelin | 3.05 | 276.2 |
| 8 | [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Cha ⁴]ghrelin | 3.09 | 131.8 |
| 9 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , tBu ⁴]ghrelin | 0.85 | 122.7 |
| 10 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , PheNO ₂ ⁴]ghrelin | NT | 71.9 |
| 11 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , PheNO ₂ ⁴]ghrelin | NT | 60.3 |
| 12 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , PheCl ₂ ⁴]ghrelin | NT | 92.9 |
| 13 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , PheCl ₂ ⁴]ghrelin | 0.65 | 235.5 |
| 14 | [Sar ¹ , Dpr-undecyn ³]ghrelin | 6.62 | 124.8 |
| 15 | [Sar ¹ , Dpr-ada ³]ghrelin | 0.20 | 169.9 |
| 16 | [Sar ¹ , Dpr-bromooc ³]ghrelin | 4.24 | 129.2 |
| 17 | [Sar ¹ , Dpr-decen ³]ghrelin | NT | 141.5 |
| 18 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | 9.98 | 193.9 |
| 19 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Cha ⁴ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | NT | 200.2 |
| 20 | [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Nal ⁴ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | NT | 171.1 |
| 21 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | NT | 59.7 |
| 22 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin | NT | 62.9 |
| 23 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Lys-palm ¹⁶]ghrelin 1-18 | NT | 158.8 |
| 24 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Lys-palm ¹⁶]ghrelin 1-18 | NT | 177.6 |
| 25 | [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelin 1-18 | NT | 147.85 |
| 26 | [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelin 1-18 | NT | 128.54 |

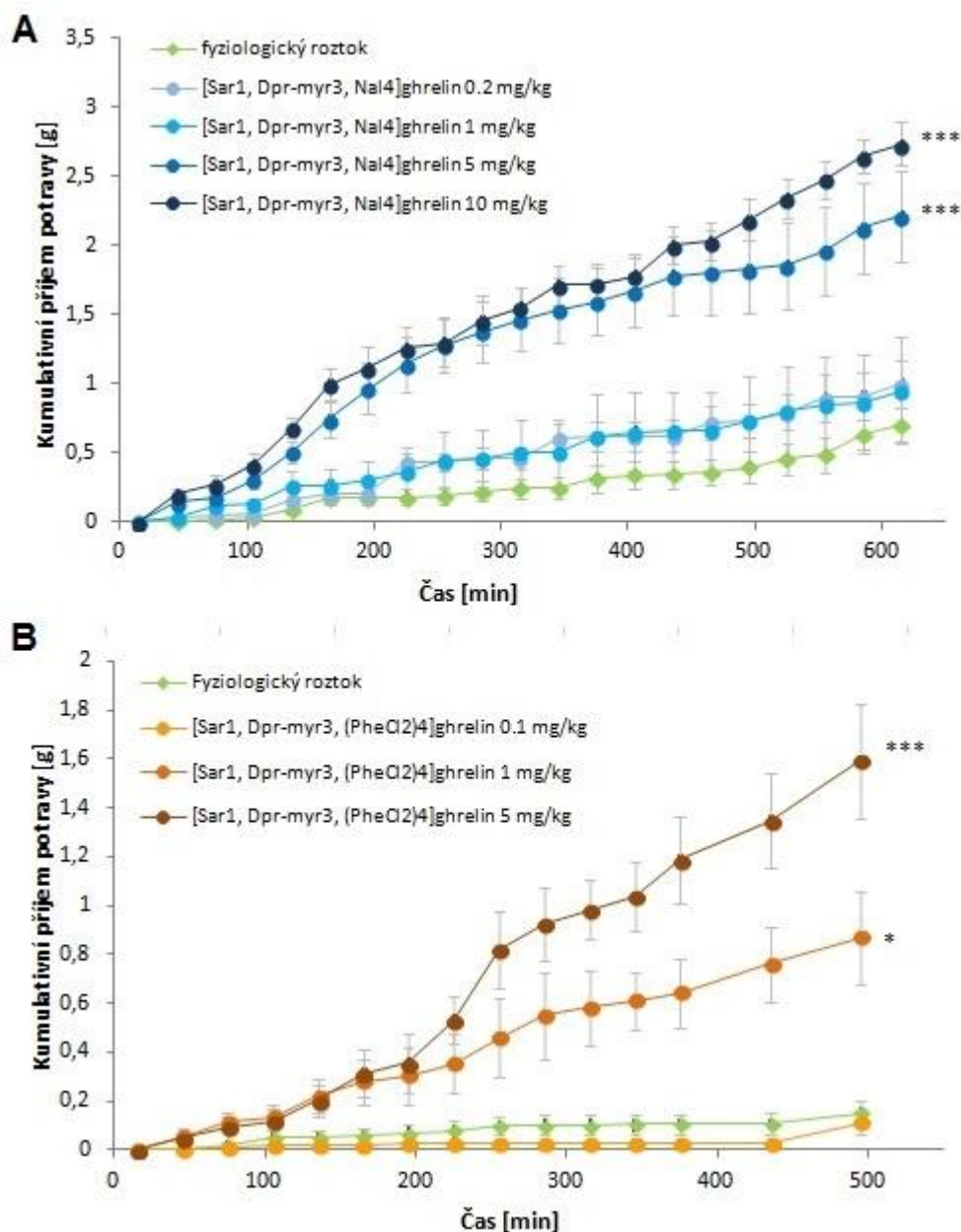
Příjem potravy byl sledován 480-600 min po injekci látky. ED₅₀ jsou hodnoceny 250 min po podání látek v různých dávkách. Maximální efekt na příjem potravy je hodnocen 480 min po podání látek v dávce 5 mg/kg. NT: netestováno.



Obr. 18 Akutní účinek analogů ghrelinu na příjem potravy po periferním podání štíhlým sytým myším kmene C57BL/6. Analogy byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a podávány v dávce 5 mg/kg. Kumulativní příjem potravy byl monitorován po dobu 8-10 hodin a je vyjádřen v g zkonsumované potravy jako průměr \pm SEM ($n = 5-6$ myši na skupinu). Data byla analyzována metodou one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině (fyziologický roztok).



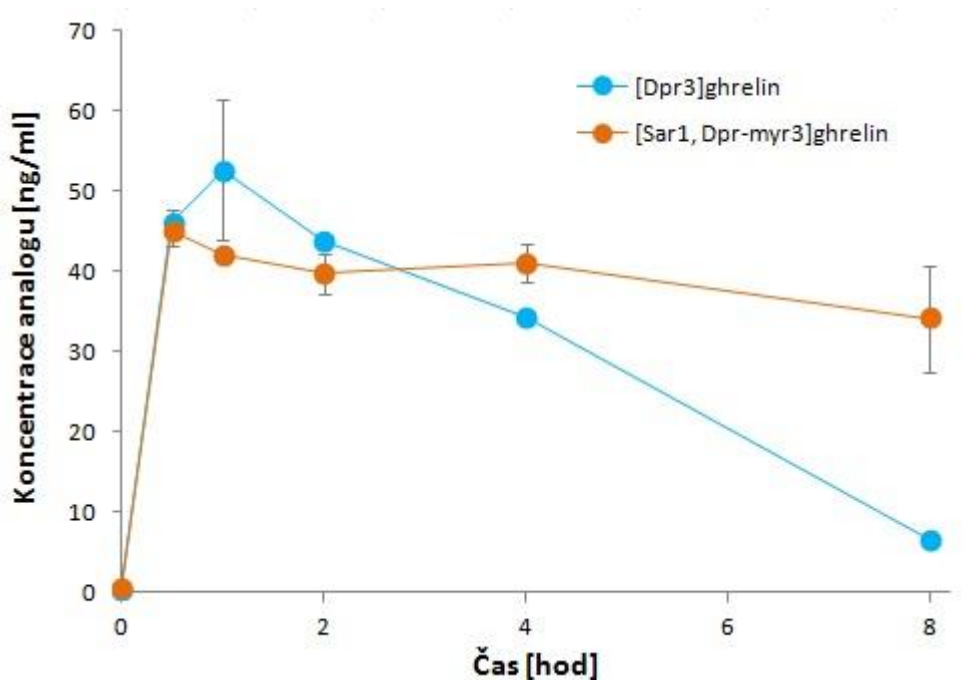
Obr. 19 Akutní účinek analogů ghrelinu na příjem potravy po periferním podání štíhlým sytým myším kmene C57BL/6. Analogy byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a podávány v dávce 5 mg/kg. Kumulativní příjem potravy byl monitorován po dobu 8-10 hodin a je vyjádřen v g zkonsumované potravy jako průměr ± SEM (n = 5-6 myši na skupinu). Data byla analyzována metodou one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině (fyziologický roztok).



Obr. 20 Závislost orexigenního účinku vybraných analogů ghrelinu na dávce. $[\text{Sar}^1, \text{Dpr-my}^3, \text{Nal}^4]\text{ghrelin}$ (A) a $[\text{Sar}^1, \text{Dpr-my}^3, \text{PheCl}_2^4]\text{ghrelin}$ (B) byly SC podávány štíhlým sytým myším C57BL/6 v dávkách 0.1-10 mg/kg tělesné hmotnosti myši. Příjem potravy je vyjádřen v g zkonsumované potravy jako průměr \pm SEM ($n = 5-6$ myši na skupinu). Data byla analyzována metodou one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině (fyziologický roztok).

5.1.5 Farmakokinetika vybraných peptidových analogů GHS-R1a

Farmakokinetika [Dpr³]ghrelinu a [Sar¹, Dpr-my³]ghrelinu byla sledována po SC podání těchto látek potkanům v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti zvířete. Obr. 21 ukazuje, že [Sar¹, Dpr-my³]ghrelin měl významně zvýšenou stabilitu v krvi ve srovnání s [Dpr³]ghrelinem; jeho biologický poločas v krvi činil více než 8 hodin.



Obr. 21 Degradační profil vybraných analogů ghrelinu *in vivo* po podání potkanům. Obě testované látky byly podány SC v dávce 5mg/kg, ve vyznačených časových intervalech byly odebírány vzorky krve. $n = 3$ potkani na skupinu.

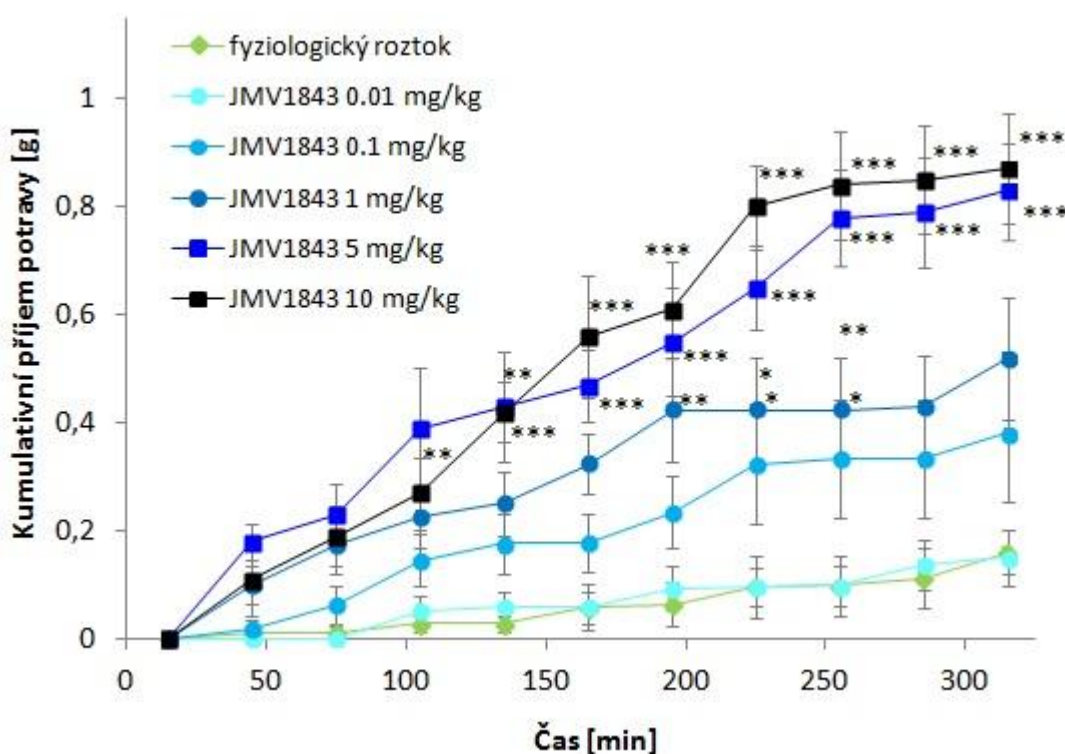
Vybraní stabilní peptidoví agonisté GHS-R1a popsání v tomto oddíle jsou součástí patentu č. PV 2014-429 (Dlouhodobě působící stabilní analogy ghrelinu k léčbě kachexie); patentová přihláška byla podána v červnu 2014.

5.2 Pseudopeptidový agonista GHS-R1a JMV1843

Výsledky uvedené v tomto oddíle byly publikovány v článku „Ghrelin agonist JMV1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice“ (Holubová *et al.* 2013).

5.2.1 Akutní účinek JMV1843 na příjem potravy

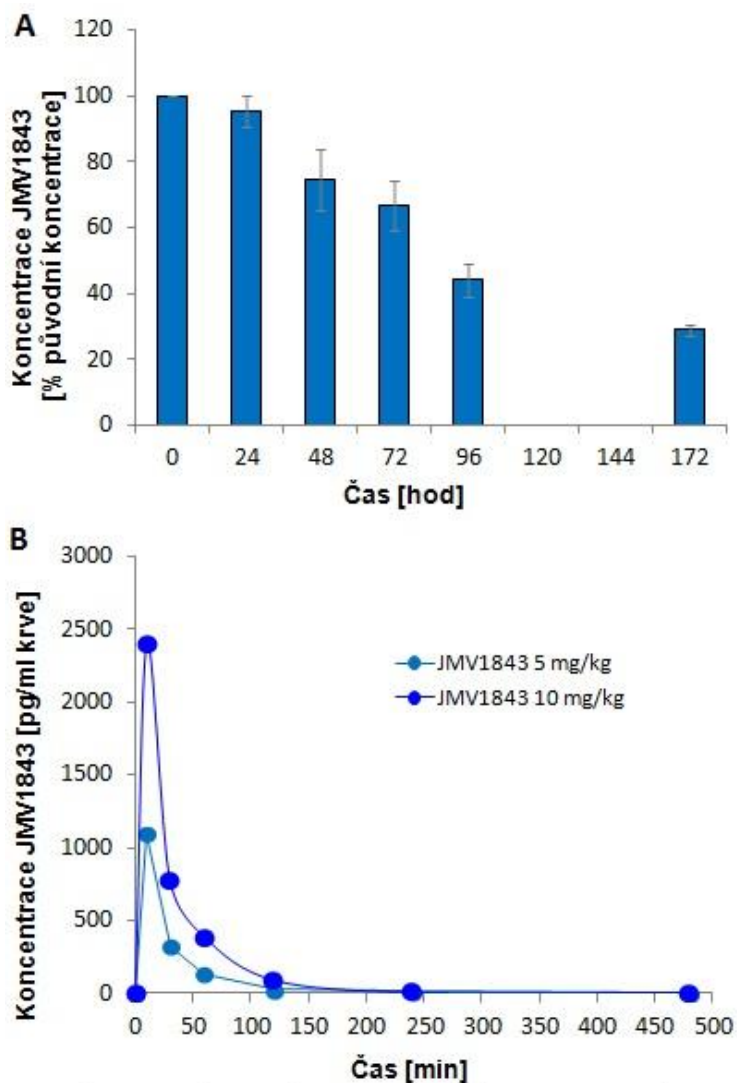
Akutní orexigenní účinek JMV1843 po periferním (SC) podání štíhlým sytým myším byl sledován s použitím dávek 0.01 – 10 mg/kg tělesné hmotnosti myši. Bylo zjištěno, že JMV1843 zvyšuje příjem potravy v závislosti na dávce, hodnota ED₅₀ v čase 250 min po podání JMV1843 byla stanovena na 1.94 mg/kg. Dávky 5 a 10 mg/kg způsobily více než pětinašobný nárůst příjmu potravy oproti kontrolní skupině, jíž byl podáván fyziologický roztok. Výsledky akutního testu na příjem potravy znázorňuje obr. 22.



Obr. 22 Akutní účinek JMV1843 na příjem potravy po jednorázovém periferním podání štíhlým sytým myším kmene C57BL/6. JMV1843 byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku a podáván SC v dávkách 0.01, 0.1, 1, 5 a 10 mg/kg ($n = 6$). Příjem potravy byl monitorován po dobu 5 hodin po injekci a je vyjádřen v gramech zkonsumované potravy jako průměr \pm SEM. Data byla analyzována metodou two-way ANOVA následovanou Bonferroniho post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině (fyziologický roztok).

5.2.2 Stabilita a farmakokinetika JMV1843

JMV1843 vykazoval dobrou stabilitu *in vitro*; při inkubaci v myším krevním séru při teplotě 37 °C zůstávala jeho koncentrace po dobu 24 hodin prakticky nezměněna a na polovinu původní hodnoty poklesla přibližně po 60 hodinách (obr. 23A). Po SC podání myším rychle vstoupil do krevního oběhu, byl nicméně téměř zcela eliminován z krve po 2 hodinách od aplikace, s poločasem 21 min pro dávku 5 mg/kg a 23 min pro dávku 10 mg/kg (obr. 23B).

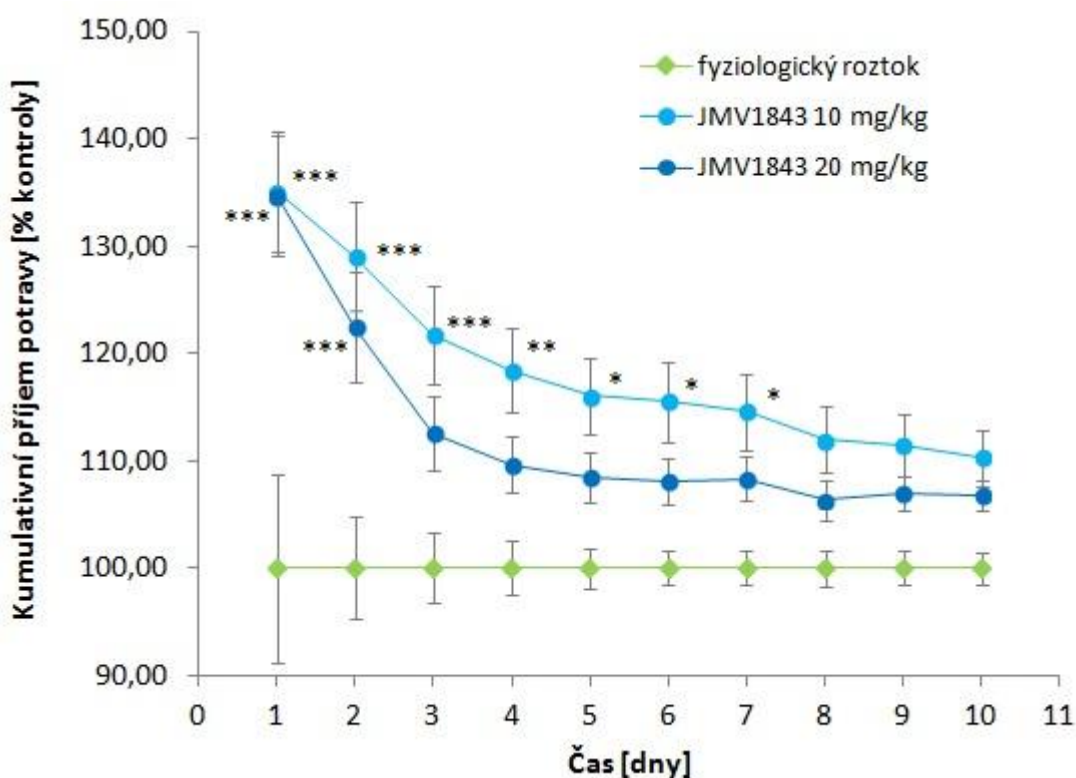


Obr. 23 Degradací profil JMV1843 v myším krevním séru *in vitro* (A) a *in vivo* po podání myším (B). A) Myší sérum, do něž byl přidán JMV1843 do finální koncentrace $10^{-6}M$, bylo inkubováno při 37 °C po dobu vyznačenou na grafu. Získané koncentrace JMV1843 jsou vyjádřeny v procentech počáteční koncentrace. B) JMV1843 byl SC podán myším ($n = 3$) v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Myši byly usmrceny v časových intervalech vyznačených na grafu a byla jim odebrána krev. Vzorky z obou pokusů byly připraveny precipitací proteinů acetonitrilem a podrobeny LC-MS analýze.

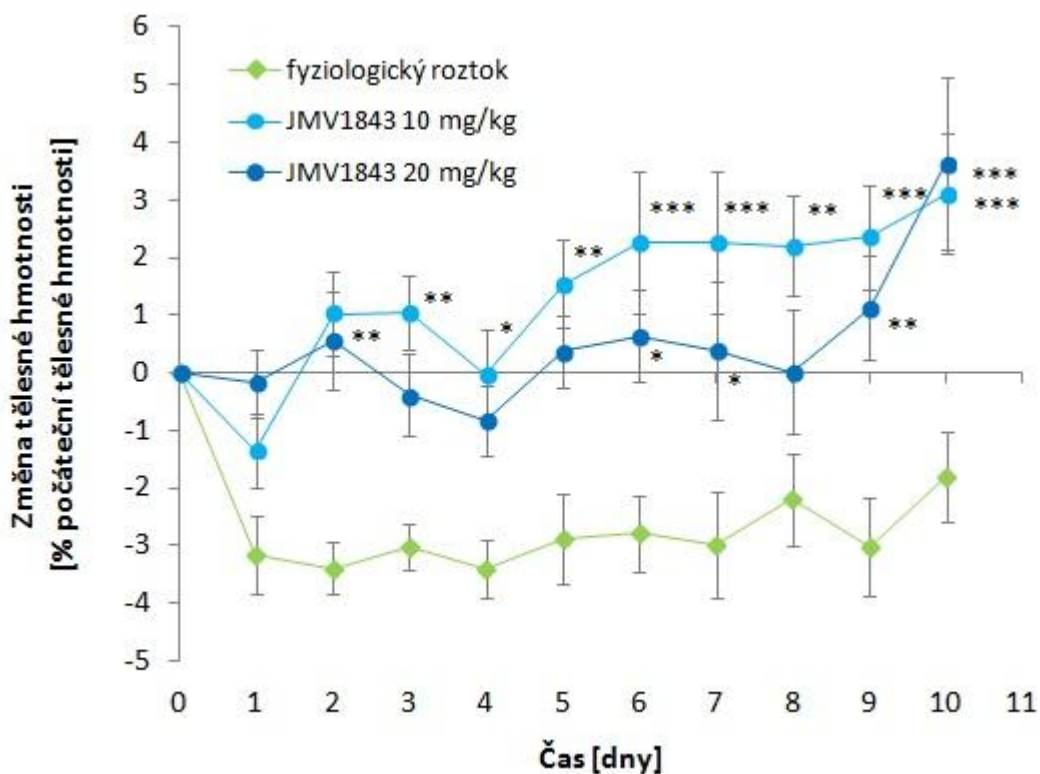
5.2.3 Účinky JMV1843 po dlouhodobém podávání štíhlým myším

Na základě výsledků krátkodobého experimentu sledujícího příjem potravy po jednorázovém podání JMV1843 byla pro dlouhodobé podávání štíhlým myším zvolena dávka 10 mg/kg/den. Vzhledem k relativně rychlé eliminaci JMV1843 z myší krve pozorované ve farmakokinetických experimentech byla navíc do pokusu zařazena dávka 20 mg/kg/den.

Desetidenní podávání JMV1843 způsobilo v obou testovaných dávkách signifikantní zvýšení příjmu potravy (obr. 24) a tělesné hmotnosti (obr. 25).



Obr. 24 Účinek JMV1843 na příjem potravy po 10-denním periferním podávání štíhlým myším C57BL/6. Testovaná látka byla podávána SC v dávkách 10 a 20 mg/kg/den, 2x denně, rozpuštěná ve fyziologickém roztoku (n = 10 myší na skupinu). Příjem potravy byl monitorován denně a je vyjádřen v % příjmu potravy kontrolní skupiny, které byl SC podáván fyziologický roztok. Data jsou uvedena ve tvaru průměr ± SEM a byla analyzována metodou two-way ANOVA následovanou Bonferroniho post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině.**



Obr. 25 Účinek JMV1843 na tělesnou hmotnost po 10-denním periferním podávání štíhlým myším C57BL/6. Testovaná látka byla podávána SC v dávkách 10 a 20 mg/kg/den, 2x denně, rozpuštěná ve fyziologickém roztoku ($n = 10$ myši na skupinu). Tělesná hmotnost byla monitorována denně a její přírůstek je vyjádřen v % počáteční tělesné hmotnosti. Data jsou uvedena ve tvaru průměr \pm SEM a byla analyzována metodou two-way ANOVA následovanou Bonferroniho post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ proti kontrolní skupině (fyziologický roztok).

Desetidenní podávání JMV1843 v dávce 20 mg/kg/den vedlo k signifikantnímu zvýšení hladiny krevní glukózy; v případě nižší dávky JMV1843 tento účinek nebyl pozorován. Hladiny cirkulujícího leptinu byly po podávání dávky 20 mg/kg/den zvýšeny úměrně zvýšenému obsahu tukové tkáně, žádná ze změn těchto parametrů nicméně nedosáhla statistické významnosti. Přes účinek na příjem potravy, tělesnou hmotnost a mírný nárůst adipozity nebyly pozorovány signifikantní změny v metabolických parametrech, jako např. plazmatických hladinách inzulínu, adiponektinu nebo IGF-1 (tab. 7 a 8).

Tab. 7 Změny obsahu tukové tkáně a hmotnosti jater u štíhlých myších samců C57BL/6 po 10-denním SC podávání JMV1843

| Skupina | IPAT [g] | SCAT [g] | Periren. AT [g] | Celk. AT [g] | Játra [g] |
|---------------------|-------------|-------------|--------------------|-----------------|--------------|
| Fyziologický roztok | 0.83 ± 0.05 | 0.61 ± 0.05 | 0.18 ± 0.02 | 1.63 ± 0.21 | 1.68 ± 0.08 |
| JMV1843 10 mg/kg | 0.88 ± 0.08 | 0.54 ± 0.04 | 0.20 ± 0.02 | 1.62 ± 0.13 | 1.67 ± 0.04 |
| JMV1843 20 mg/kg | 0.99 ± 0.07 | 0.64 ± 0.04 | 0.26 ± 0.02 | 1.88 ± 0.10 | 1.80 ± 0.07 |

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n = 10 myši na skupinu. Data byla analyzována metodou one-way ANOVA následovanou Dunnettovým post-hoc testem. Nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly oproti kontrolní skupině (fyziologický roztok). IPAT: intraperitoneální tuková tkáň; SCAT: podkožní tuková tkáň; Periren. AT: perirenální tuková tkáň; Celk. AT: celkové množství tukové tkáně.

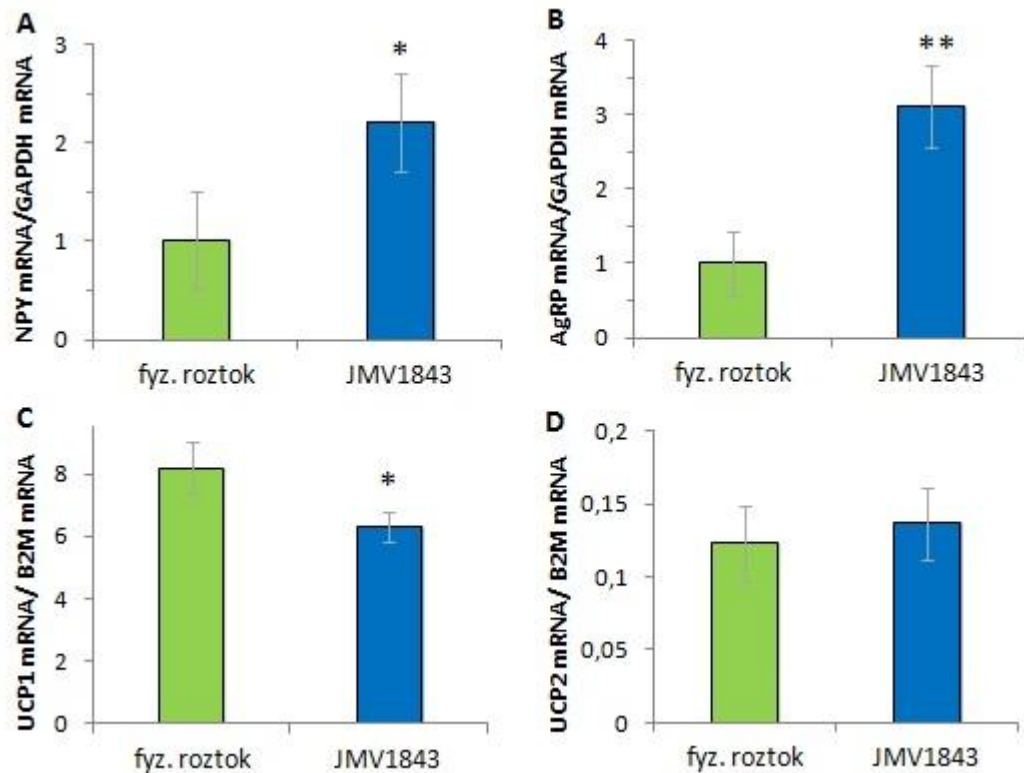
Tab. 8 Změny metabolických parametrů sytých štíhlých myších samců C57BL/6 po 10-denním SC podávání JMV1843

| Skupina | Leptin [ng/ml] | Glukóza [mmol/l] | Inzulín [ng/ml] | Adiponektin [μg/ml] | IGF-1 [ng/ml] |
|---------------------|-------------------|---------------------|--------------------|------------------------|------------------|
| Fyziologický roztok | 5.39 ± 0.55 | 6.83 ± 0.66 | 1.12 ± 0.32 | 11.24 ± 1.19 | 276 ± 77 |
| JMV1843 10 mg/kg | 6.22 ± 0.55 | 8.21 ± 0.46 | 0.85 ± 0.17 | 10.69 ± 1.04 | 215 ± 71 |
| JMV1843 20 mg/kg | 7.29 ± 0.87 | 8.86 ± 0.41 * | 1.17 ± 0.28 | 10.34 ± 0.74 | 233 ± 79 |

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n = 10 myši na skupinu. Data byla analyzována metodou one-way ANOVA následovanou Dunnettovým post-hoc testem. * P<0.05 oproti kontrolní skupině (fyziologický roztok). IGF-1: růstový faktor podobný inzulínu.

Působením opakovaného podávání JMV1843 v dávce 20 mg/kg/den došlo k signifikantnímu zvýšení exprese mRNA pro orexigenní peptidy NPY (obr. 26A) a AgRP (obr. 26B) v mediobazálním hypothalamu.

Po desetidenním podávání JMV1843 v dávce 20 mg/kg/den byla signifikantně snížena exprese mRNA pro UCP-1 v hnědé tukové tkáni (obr. 26C); na expresi UCP-2 v intraperitoneální tukové tkáni nemělo podávání JMV1843 vliv (obr. 26D).



Obr. 26 *Expresa mRNA v myších tkáních po 10-denním periferním podávání JMV1843. JMV1843 byl podáván SC v dávce 20 mg/kg/den, 2x denně, rozpuštěný ve fyziologickém roztoku (n = 10). A) Expresa neuropeptidu Y v mediobazálním hypothalamu. B) Expresa agouti-related proteinu v mediobazálním hypothalamu. Data byla normalizována vzhledem k expresi GAPDH a analyzována pomocí nepárového t-testu. C) Expresa UCP-1 v hnědé tukové tkáni. D) Expresa UCP-2 v intraperitoneální bílé tukové tkáni. Data byla normalizována vzhledem k expresi β_2 -mikroglobulinu a analyzována pomocí nepárového t-testu. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ oproti kontrolní skupině (fyziologický roztok).*

Stejně tak nebyly pozorovány žádné změny v expresi genů pro enzymy podílející se na metabolismu tuků (ACACA, FASN, LPL, SCD). Z tohoto důvodu byla stanovována exprese markerů myogeneze. V expresi mRNA pro myostatin, IGF-1 a MHC-4 nebyly nalezeny signifikantní změny, hladiny mRNA pro myogenin byly sníženy (tab. 9 a 10).

Tab. 9 *Expese mRNA pro enzymy podílející se na metabolismu tuků po 10-denním SC podáváníí JMV1843 štíhlým myším C57BL/6*

| Skupina | ACACA/18S | FASN/18S | LPL/18S | SCD/18S |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| Fyziologický roztok | $7.25 \pm 1.23 \cdot 10^{-5}$ | $4.94 \pm 1.08 \cdot 10^{-4}$ | 0.0014 ± 0.00023 | 0.0015 ± 0.00017 |
| JMV1843 20 mg/kg | $5.83 \pm 0.96 \cdot 10^{-5}$ | $4.64 \pm 0.76 \cdot 10^{-4}$ | 0.0016 ± 0.00036 | 0.0011 ± 0.00021 |

Data byla normalizována vzhledem k expresi 18S rRNA a analyzována pomocí nepárového t-testu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, n = 10 myši na skupinu. Nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly oproti kontrolní skupině (fyziologický roztok).

Tab. 10 *Expese mRNA pro markery myogeneze po 10-denním SC podáváníí JMV1843 štíhlým myším C57BL/6*

| Skupina | Myostatin/B2M | Myogenin/B2M | IGF-1/B2M | MHC-4/B2M |
|---------------------|------------------|----------------------|--------------------|-------------------|
| Fyziologický roztok | 0.37 ± 0.029 | 0.048 ± 0.0046 | 0.082 ± 0.0081 | 94.94 ± 12.87 |
| JMV1843 20 mg/kg | 0.40 ± 0.047 | 0.033 ± 0.0040 * | 0.083 ± 0.0056 | 91.16 ± 16.45 |

*Data byla normalizována vzhledem k expresi β_2 -mikroglobulinu a analyzována pomocí nepárového t-testu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, n = 10 myši na skupinu. * $P < 0.05$ oproti kontrolní skupině (fyziologický roztok).*

5.3 Nepeptidoví antagonisté GHS-R1a JMV3002 a JMV4208

Výsledky uvedené v tomto oddíle byly publikovány v článku „Triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 attenuate food intake, body weight, and adipose tissue mass in mice“, který byl přijat k tisku v časopise *Molecular and Cellular Endocrinology* (Holubová *et al.* 2014).

5.3.1 Akutní účinek JMV3002 a JMV4208 na příjem potravy

Akutní orexigenní účinek JMV3002 a JMV4208 po periferním (SC) podání štíhlým hladovým myším byl sledován s použitím dávek 1 – 20 mg/kg tělesné hmotnosti myši. Bylo zjištěno, že obě sloučeniny dávkově závisle snižují příjem potravy oproti kontrolní skupině, již byl podáván 50% PEG; statisticky významný účinek byl pozorován od dávky 5 mg/kg. Hodnota ED₅₀ byla stanovena na 2.05 mg/kg pro JMV3002 a 5.25 mg/kg pro JMV4208. Výsledky akutního testu na příjem potravy znázorňuje obr. 27.

JMV3002 podaný podkožně v dávce 5 mg/kg sytým štíhlým myším potlačil nárůst příjmu potravy vyvolaný podáním ghrelinu v téže dávce. Příjem potravy po koadministraci obou látek byl srovnatelný s příjmem potravy kontrolní skupiny, zatímco samostatně podaný JMV3002 statisticky významně snížil příjem potravy ve srovnání s kontrolní skupinou (obr. 28).

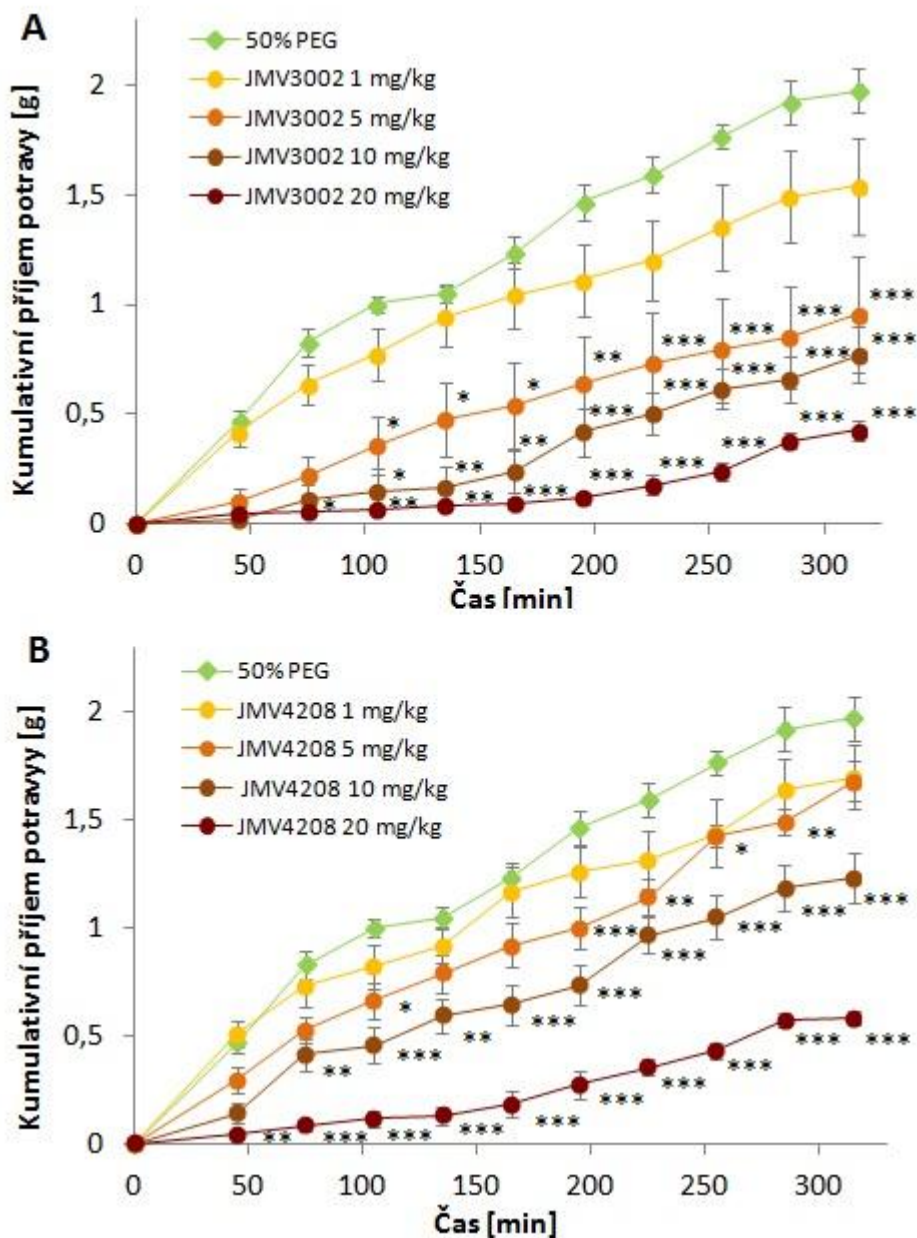
5.3.2 Farmakokinetika JMV3002 a JMV4208 *in vivo*

Obě testované sloučeniny dosáhly maximální koncentrace v krvi 30 minut po SC podání myším a byly zcela eliminovány z krevního oběhu v průběhu 8 hodin po podání. Biologický poločas JMV3002 byl 60 min a poločas JMV4208 byl 90 min, přičemž v intervalu od 2 do 8 hodin po podání koncentrace obou sloučenin v krvi pomalu klesala (obr. 29, tab. 11).

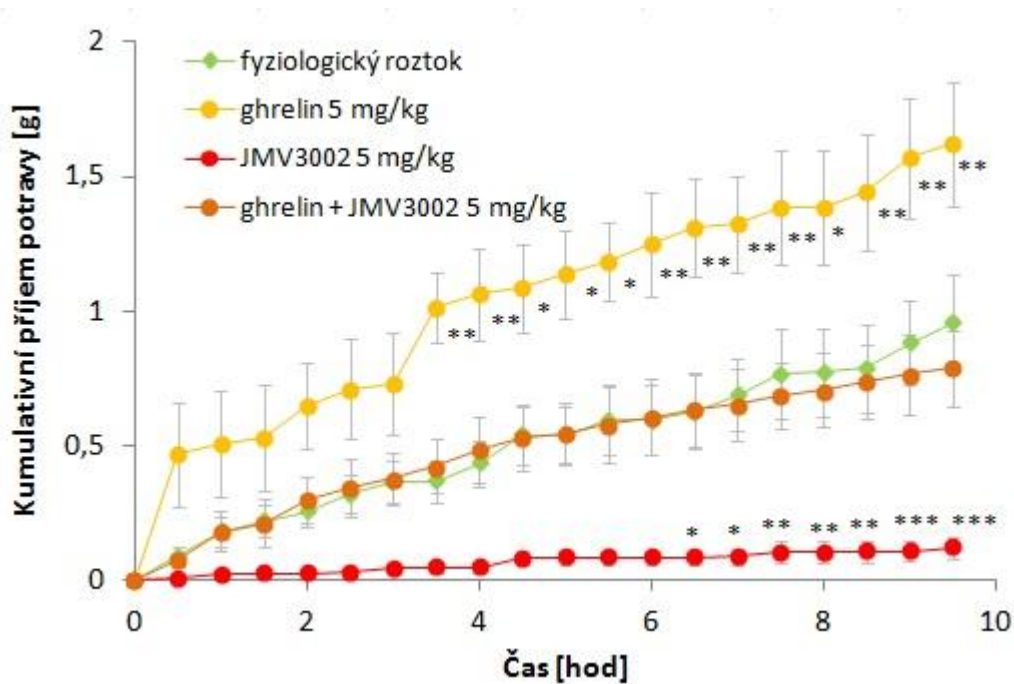
Tab. 11 Farmakokinetika antagonistů GHS-R1a *in vivo* po SC podání myším

| Sloučenina | T _{1/2} [min] | T _{max} [min] | C _{max} [ng/ml] | AUC [μg/ml/480 min] |
|------------|------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|
| JMV3002 | 60 | 30 | 960.1 | 74.75 |
| JMV4208 | 90 | 30 | 979.7 | 122.9 |

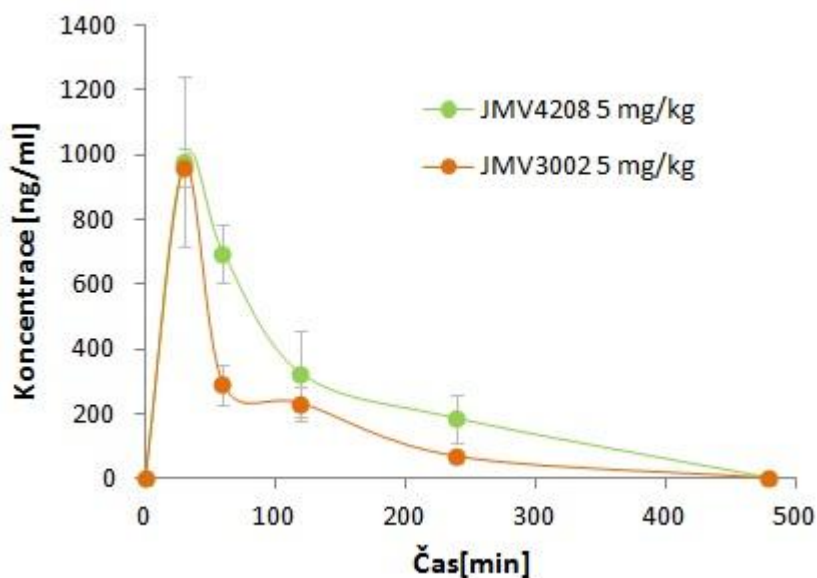
Obě sloučeniny byly podány SC v dávce 5 mg/kg a jejich koncentrace v krevní plazmě byla sledována po dobu 8 hodin. T_{1/2}: biologický poločas sloučenin v krvi; T_{max}: čas dosažení C_{max} (maximální koncentrace sloučenin v krvi); AUC: plocha pod křivkou (při vynesení koncentrace sloučeniny v krvi jako funkce času).



Obr. 27 Akutní účinek JMV3002 (A) a JMV4208 (B) na příjem potravy po jednorázovém periferním podání štíhlým hladovým myším kmene C57BL/6. Testované látky byly rozpuštěny v 50% PEG a podávány SC v dávkách 1, 5, 10 a 20 mg/kg ($n = 6$). Příjem potravy byl monitorován po dobu 5 hodin po injekci a je vyjádřen v gramech zkonsumované potravy. Data jsou uvedena jako průměr \pm SEM a byla analyzována metodou two-way ANOVA následovanou Bonferroniho post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině (50% PEG).



Obr. 28 Potlačení nárůstu příjmu potravy vyvolaného periferním podáním ghrelinu prostřednictvím podání JMV3002. Obě látky byly podány SC v dávce 5 mg/kg ($n = 5$). Příjem potravy byl monitorován po dobu 9 hodin. Hodnoty jsou uvedeny ve tvaru průměr \pm SEM a byly analyzovány metodou two-way ANOVA následovanou Bonferroniho post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině.



Obr. 29 Degradční profil JMV3002 a JMV4208 v myši krevní plazmě po jednorázovém SC podání štíhlým myším kmene C57BL/6. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM, $n = 3$ myši na skupinu.

5.3.3 Účinky JMV3002 a JMV4208 po dlouhodobém podávání obézním myším

Vzhledem k výsledkům krátkodobého experimentu na příjem potravy po jednorázovém podání antagonistů GHS-R1a byly pro dlouhodobé podávání zvoleny dávky 10 a 20 mg/kg tělesné hmotnosti myši. Čtrnáctidenní SC podávání JMV3002 a JMV4208 obézním (DIO) myším v těchto dávkách vedlo k signifikantnímu snížení příjmu potravy ve srovnání s kontrolní skupinou, které byl SC podáván 50% PEG, v němž byly testované sloučeniny rozpouštěny (obr. 30A, B).

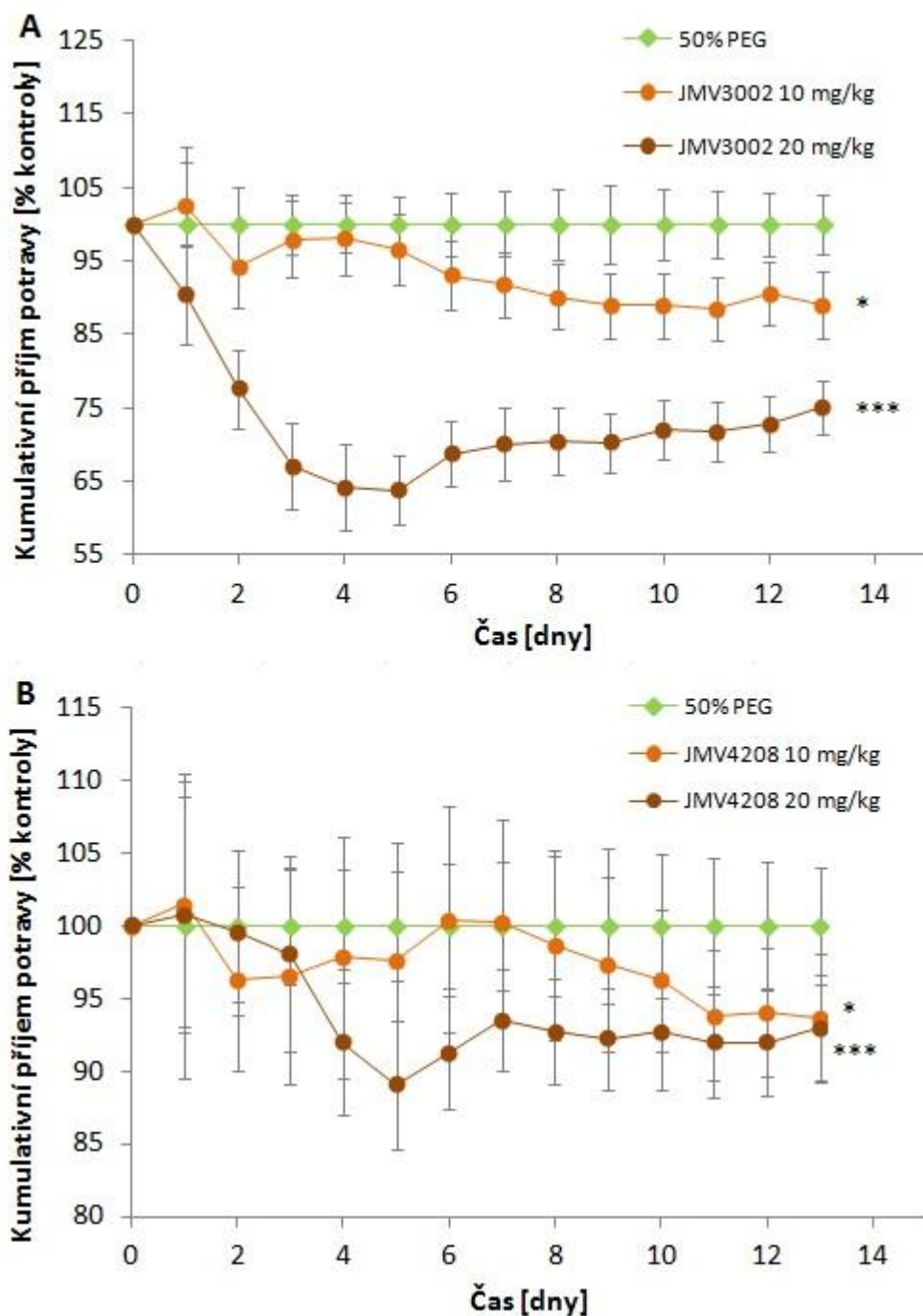
Průměrná tělesná hmotnost obézních myši byla na konci experimentu snížena o 15 % původní hmotnosti v případě podávání 20 mg/kg JMV3002 a o 10 % původní hmotnosti po podávání 20 mg/kg JMV4208. Tělesná hmotnost kontrolní skupiny byla snížena o 4 %. Aby bylo možno posoudit podíl redukce příjmu potravy na pozorovaném hmotnostním úbytku, byly do pokusu zařazeny skupiny myši krmených párově ke skupinám, jimž byly aplikovány dávky 20 mg/kg testovaných antagonistů GHS-R1a. Hmotnostní úbytek párově krmených myši byl mírnější než úbytek po podávání testovaných látek, v případě skupiny krmené párově k JMV3002 však ve srovnání s kontrolní skupinou dosáhl statistické významnosti (obr. 31A, B).

Podávání JMV3002 a JMV4208 vedlo k redukci celkového obsahu tukové tkáně, způsobené zejména úbytkem podkožního a perirenálního tuku; úbytek intraperitoneální a hnědé tukové tkáně nebyl statisticky významný. Obě sloučeniny také snížily hmotnost jater (tab. 12). Hladiny plazmatického inzulínu, glukózy, adiponektinu a triglyceridů byly nevýznamně sníženy. Hladiny cirkulujícího leptinu byly signifikantně sníženy úměrně sníženému objemu tukové tkáně (tab. 13).

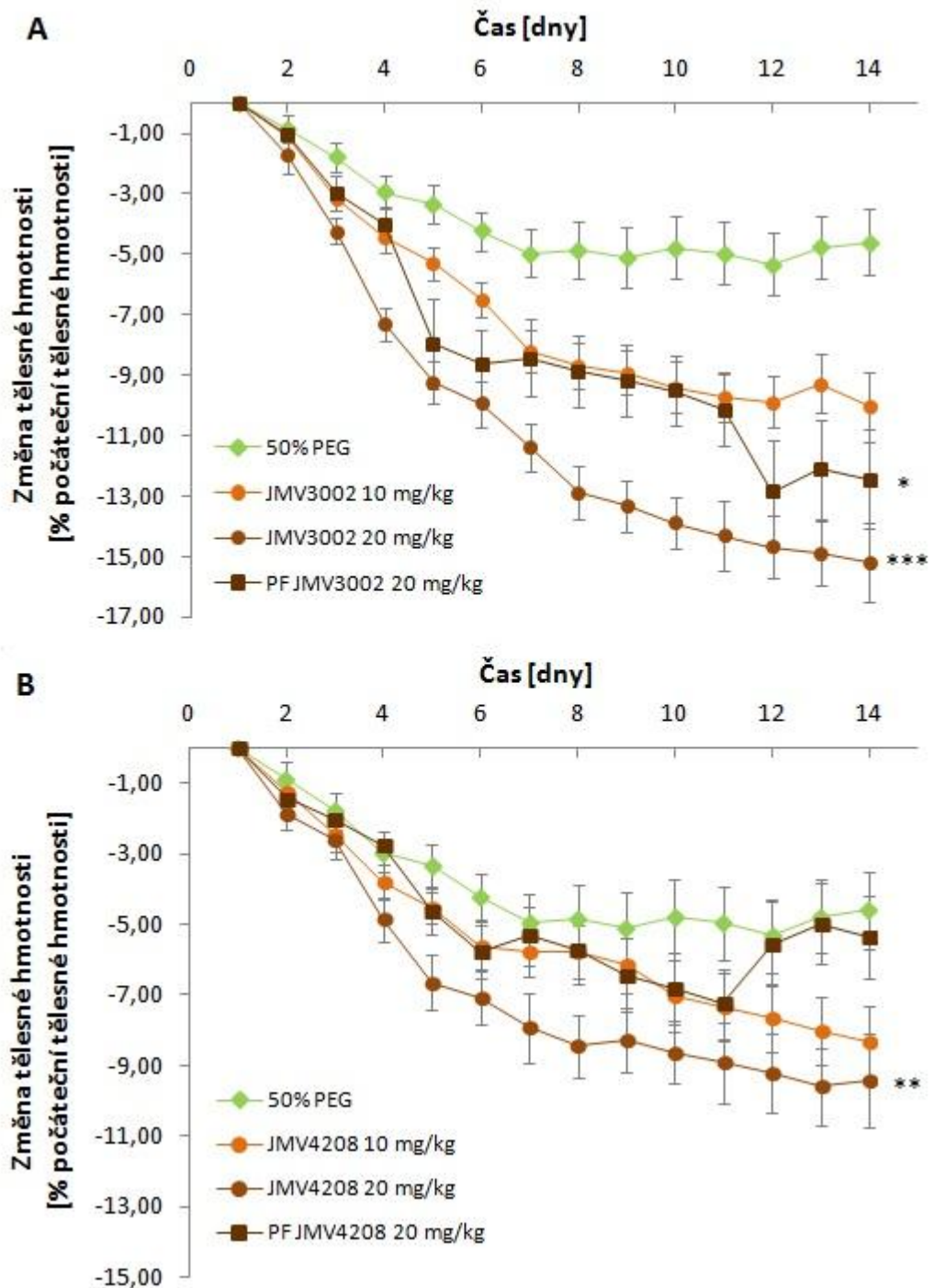
Tab. 12 Hmotnosti tukové tkáně a jater po 14-denním SC podávání JMV3002 a JMV4208 v dávce 20 mg/kg DIO myším

| Skupina | SCAT [g] | IPAT [g] | Periren. AT [g] | Celk. AT [g] | Játra [g] |
|---------|-----------------|-------------|-----------------|----------------|----------------|
| 50% PEG | 2.96 ± 0.18 | 2.22 ± 0.09 | 1.3 ± 0.06 | 6.65 ± 0.26 | 2.05 ± 0.16 |
| JMV3002 | 1.87 ± 0.09 *** | 2.03 ± 0.15 | 0.85 ± 0.09 ** | 5.13 ± 0.37 ** | 1.40 ± 0.04 ** |
| JMV4208 | 2.3 ± 0.12 * | 2.17 ± 0.15 | 0.96 ± 0.07 ** | 5.58 ± 0.22 ** | 1.68 ± 0.17 |

*Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n = 7 myši na skupinu. Data byla analyzována pomocí nepárového t-testu. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 oproti kontrolní skupině (50% PEG). Periren. AT: perirenální tuková tkáň; Celk. AT: celkové množství tukové tkáně.*



Obr. 30 Účinek JMV3002 (A) a JMV4208 (B) na příjem potravy po 14-denním periferním podávání obézním (DIO) myším C57BL/6. Testovaná látka byla podávána SC v dávkách 10 a 20 mg/kg, 2x denně, rozpuštěná v 50% PEG ($n = 10$). Příjem potravy byl monitorován denně a je vyjádřen v % příjmu potravy kontrolní skupiny, které byl SC podáván 50% PEG. Data jsou uvedena ve tvaru průměr \pm SEM a byla analyzována metodou one-way ANOVA následovanou Dunnettovým post-hoc testem. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině.



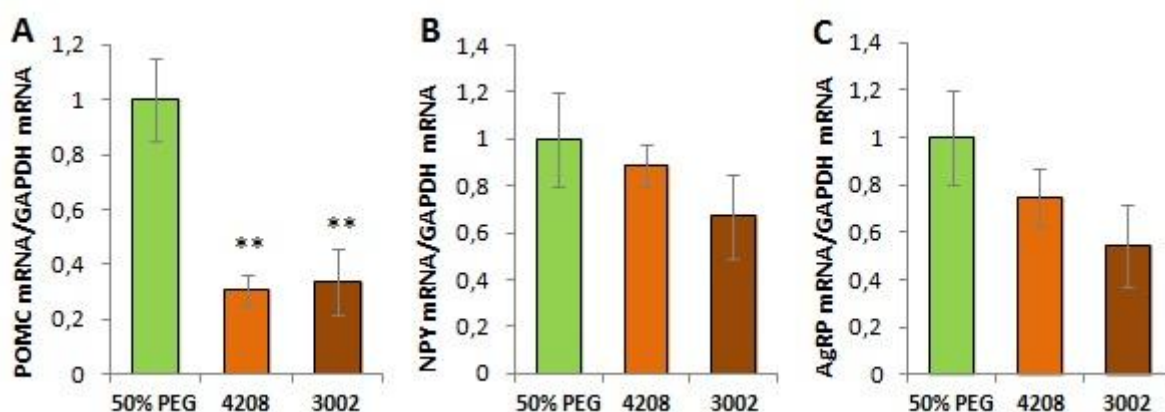
Obr. 31 Účinek JMV3002 (A) a JMV4208 (B) na tělesnou hmotnost po 14-denním periferním podávání obézním (DIO) myším C57BL/6. Testovaná látka byla podávána SC v dávkách 10 a 20 mg/kg, 2x denně, rozpuštěná v 50% PEG ($n = 10$). Tělesná hmotnost byla monitorována denně a její úbytek je vyjádřen v % počáteční tělesné hmotnosti. Data jsou uvedena ve tvaru průměr \pm SEM a byla analyzována metodou one-way ANOVA následovanou Dunnettovým post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině (50% PEG).

Tab. 13 Metabolické parametry hladových DIO myši po 14-denním SC podávání JMV3002 a JMV4208 v dávce 20 mg/kg.

| Skupina | Adiponektin [µg/ml] | Inzulín [ng/ml] | Leptin [ng/ml] | Glukóza [mmol/l] | Triglyceridy [mg/dl] |
|---------|---------------------|-----------------|----------------|------------------|----------------------|
| 50% PEG | 13.99 ± 1.33 | 2.59 ± 0.47 | 53.21 ± 6.59 | 8.11 ± 0.45 | 23.90 ± 4.32 |
| JMV3002 | 11.72 ± 1.49 | 1.92 ± 0.21 | 31.72 ± 2.9 * | 7.97 ± 0.34 | 24.40 ± 3.18 |
| JMV4208 | 13.82 ± 1.49 | 1.96 ± 0.18 | 31.49 ± 1.76 * | 7.59 ± 0.50 | 19.56 ± 3.29 |

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n = 7 myši na skupinu. Data byla analyzována pomocí nepárového t-testu. * P<0.05 oproti kontrolní skupině (50% PEG).

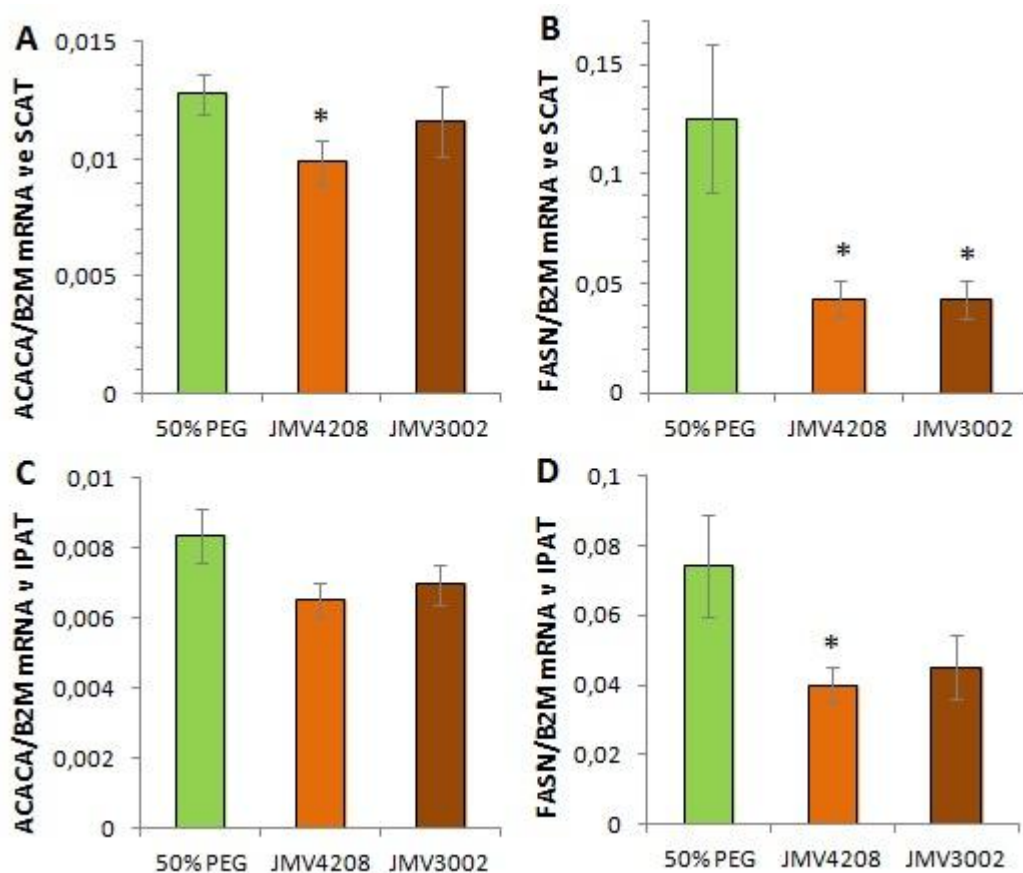
Obě testované sloučeniny v dávce 20 mg/kg způsobily po dlouhodobém podávání signifikantní snížení exprese POMC v mediobazálním hypothalamu (obr. 32A). Redukce exprese mRNA pro NPY (obr. 32B) a AgRP (obr. 32C) v MBH nebyla statisticky významná.



Obr. 32 Expese mRNA pro neuropeptidy v mediobazálním hypothalamu po 14-denním SC podávání JMV3002 a JMV4208 v dávce 20 mg/kg DIO myším. A) Expese POMC. B) Expese NPY. C) Expese AgRP. Data byla normalizována vzhledem k expresi GAPDH a analyzována pomocí nepárového t-testu. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, ** P<0.01 oproti kontrolní skupině (50% PEG), n = 7 myši na skupinu.

Dlouhodobé podávání JMV4208 v dávce 20 mg/kg vedlo ke statisticky významnému snížení exprese ACACA (obr. 33A) a FASN (obr. 33B) v podkožní tukové tkáni a ke snížení exprese FASN v intraperitoneální tukové tkáni (obr. 33D). Dlouhodobé podávání JMV3002 v dávce 20 mg/kg způsobilo redukcii exprese FASN

v podkožní tukové tkáni (obr. 33B). Snížení exprese ACACA v intraperitoneální tukové tkáni nedosáhlo po podávání testovaných sloučenin statistické významnosti (obr. 33C).



Obr. 33 *Expresa mRNA pro markery metabolismu tuků po 14-denním SC podávání JMV3002 a JMV4208 v dávce 20 mg/kg DIO myším. A) Expresa ACACA v podkožní tukové tkáni. B) Expresa FASN v podkožní tukové tkáni. C) Expresa ACACA v intraperitoneální tukové tkáni. D) Expresa FASN v intraperitoneální tukové tkáni. Data byla normalizována vzhledem k expresi β_2 -mikroglobulinu a analyzována pomocí nepárového t-testu. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM, * $P < 0.05$ oproti kontrolní skupině (50% PEG), $n = 7$ myši na skupinu.*

Žádný z antagonistů GHS-R1a neměl vliv na hladiny mRNA pro leptin, LPL, adiponektin a FABP-4 v podkožní či intraperitoneální tukové tkáni (tab. 14) ani na expresi mRNA pro ACACA, FASN, PEPCK, SREBP či CPT-1v játrech (tab. 15). Expresa mRNA pro UCP-1 v hnědé tukové tkáni byla nesignifikantně zvýšena (obr. 34).

Tab. 14 *Expres mRNA pro adipokiny a enzymy podílející se na metabolismu tuků v podkožní a intraperitoneální tukové tkáni po 14-denním SC podáváníí JMV3002 a JMV4208 v dávce 20 mg/kg DIO myším*

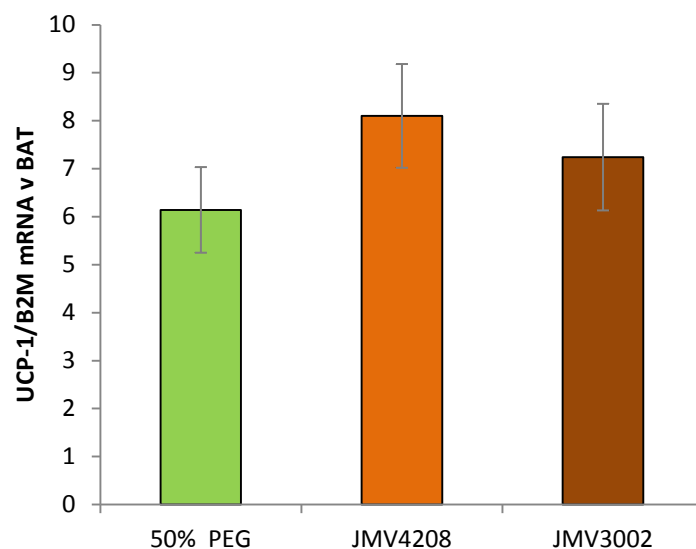
| Tkáň | Skupina | Leptin/B2M | Adiponektin/B2M | LPL/B2M | FABP-4/B2M |
|------|---------|---------------|-----------------|---------------|---------------|
| SCAT | 50% PEG | 0.191 ± 0.034 | 0.466 ± 0.028 | 1.486 ± 0.218 | 4.324 ± 0.522 |
| | JMV3002 | 0.146 ± 0.028 | 0.436 ± 0.068 | 1.410 ± 0.069 | 4.358 ± 0.538 |
| | JMV4208 | 0.199 ± 0.011 | 0.487 ± 0.018 | 1.146 ± 0.095 | 3.518 ± 0.674 |
| IPAT | 50% PEG | 0.148 ± 0.026 | 0.197 ± 0.013 | 1.055 ± 0.119 | 1.796 ± 0.170 |
| | JMV3002 | 0.105 ± 0.020 | 0.236 ± 0.039 | 1.162 ± 0.134 | 2.065 ± 0.237 |
| | JMV4208 | 0.098 ± 0.015 | 0.171 ± 0.028 | 0.803 ± 0.106 | 1.418 ± 0.158 |

Data byla normalizována vzhledem k expresi β_2 -mikroglobulinu a analyzována pomocí nepárového t-testu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n = 10 myší na skupinu. Nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly oproti kontrolní skupině (50% PEG).

Tab. 15 *Expres mRNA pro enzymy podílející se na metabolismu tuků v játrech po 14-denním SC podáváníí JMV3002 a JMV4208 v dávce 20 mg/kg DIO myším*

| Skupina | ACACA/B2M | FASN/B2M | PEPCK/B2M | SREBP/B2M | CPT-1/B2M |
|---------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| 50% PEG | 0.006 ± 0.0009 | 0.015 ± 0.007 | 0.319 ± 0.031 | 0.002 ± 0.0003 | 0.062 ± 0.008 |
| JMV3002 | 0.005 ± 0.0013 | 0.014 ± 0.005 | 0.498 ± 0.122 | 0.002 ± 0.0005 | 0.043 ± 0.009 |
| JMV4208 | 0.005 ± 0.0008 | 0.014 ± 0.004 | 0.412 ± 0.069 | 0.003 ± 0.0004 | 0.051 ± 0.006 |

Data byla normalizována vzhledem k expresi β_2 -mikroglobulinu a analyzována pomocí nepárového t-testu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n = 10 myší na skupinu. Nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly oproti kontrolní skupině (50% PEG).



Obr. 34 *Expres mRNA pro UCP-1 v hnědé tukové tkáni po 14-denním SC podávání JMV3002 a JMV4208 v dávce 20 mg/kg DIO myším. Data byla normalizována vzhledem k expresi β_2 -mikroglobulinu a analyzována pomocí nepárového t-testu. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM, $n = 7$ myší na skupinu. Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly oproti kontrolní skupině (50% PEG).*

6 DISKUZE

6.1 Dlouhodobě působící peptidoví agonisté receptoru GHS-R1a

Ghrelín a další agonisté GHS-R1a jsou v současnosti považováni za potenciální léčiva k terapii kachexie a anorexie. V první části této práce je popsáno *in vitro* a *in vivo* testování nově navržených stabilních a dlouhodobě působících peptidových agonistů receptoru GHS-R1a, kteří byli syntetizováni na našem ústavu. Byly provedeny vazebné studie sledující afinitu agonistů k receptoru GHS-R1a, funkční studie zjišťující vliv agonistů na signalizaci ghrelínového receptoru a testy *in vivo* (na myších) ke zjištění účinku analogů na příjem potravy a ověření stability v krvi.

Struktura analogů ghrelínu byla navržena na základě výsledků strukturně aktivních studií, které již byly zmíněny v úvodu (Bednarek *et al.* 2000; Matsumoto *et al.* 2001; Van Craenenbroeck *et al.* 2004), a vychází ze struktury analogů ghrelínu, které byly syntetizovány a charakterizovány v naší laboratoři (Maletínská *et al.* 2012).

Analogy byly stabilizovány začleněním nekódových aminokyselin do struktury (náhrada N-terminálního glycinu sarkosinem a případně náhrada fenylalaninu v pozici 4 nekódovými aminokyselinami naftylalaninem, cyklohexylalaninem, tercbutylalaninem, nitrofenylalaninem či dichloroalaninem), aby se zvýšila jejich odolnost vůči proteolytické degradaci a tedy prodloužilo trvání jejich účinku.

Další zásadní modifikací byla náhrada serinu v pozici 3 kyselinou diaminopropionovou. Tato záměna nevede ke ztrátě biologické aktivity ghrelínu a umožňuje nahradit nestabilní esterovou vazbu, kterou je v přirozeně se vyskytujícím ghrelínu vázána oktanová kyselina nezbytná pro biologický účinek ghrelínu, výrazně stabilnější amidovou vazbou (Bednarek *et al.* 2000).

Takto stabilizované analogy byly dále modifikovány záměnou přirozeně se vyskytujícího oktanoylu za jiné mastné kyseliny, ať už se jednalo o kyseliny s delším řetězcem, nenasycené mastné kyseliny nebo např. kyselinu adamantanocetovou. Do struktury dalších analogů byla na druhý konec aminokyselinového řetězce začleněna další mastná kyselina, jiné analogy byly zkráceny. Lipidizace peptidů, např. připojení mastné kyseliny esterovou či amidovou vazbou, je v současnosti jednou ze strategií používaných při návrhu peptidových léčiv; umožňuje zvýšit jejich stabilitu a biologický poločas (pravděpodobně díky vazbě na sérový albumin) a také zlepšit jejich průchod přes hematoencefalickou bariéru (Bellmann-Sickert & Beck-Sickinger 2010; Malavolta

& Cabral 2011). Acylaci myristovou či palmitovou kyselinou využívá např. analog inzulinu detemir (Havelund *et al.* 2004) či analog GLP-1 liraglutid (Gault *et al.* 2011).

V *in vitro* studiích jsme ukázali, že testované analogy se váží na buněčné membrány z buněk s transfekovaným receptorem GHS-R1a s afinitou ve většině případů srovnatelnou s ghrelinem či [Dpr³]ghrelinem nebo větší. Hodnoty K_i zjištěné v kompetitivních vazebných studiích se pro většinu analogů pohybovaly v nanomolární oblasti, což odpovídá hodnotám K_i pro ghrelin běžně uváděným v literatuře (Leyris *et al.* 2011; Maletínská *et al.* 2012). Také bylo zjištěno, že vybrané analogy působí srovnatelně s ghrelinem či [Dpr³]ghrelinem na aktivaci signalizačních drah ghrelu, tedy že vyvolávají srovnatelnou aktivaci inositolfosfátové kaskády a mobilizaci intracelulárních Ca²⁺ iontů.

In vivo testy sledující příjem potravy po periferním podání testovaných analogů myším ukázaly, že většina analogů významně zvyšuje příjem potravy, přičemž jejich účinek je výraznější a déletrvající ve srovnání s ghrelinem či [Dpr³]ghrelinem. Tato skutečnost pravděpodobně souvisí zejména s jejich zvýšenou stabilitou a koresponduje s výsledkem pilotního farmakokinetického experimentu na potkanech, v němž bylo ukázáno, že SC podaný [Sar¹, Dpr-my³]ghrelin má významně zvýšenou stabilitu v krvi ve srovnání s [Dpr³]ghrelinem a jeho biologický poločas v krvi činí více než 8 hodin. Oproti tomu endogenní ghrelin je v krvi degradován během několika desítek minut (De Vriese *et al.* 2004; Akamizu & Kangawa 2006).

Nejvýraznější orexigenní účinek byl pozorován po podání analogů s fenylalaninem, cyklohexylalaninem, naftylalaninem či dichlorofenylalaninem v pozici 4 a prodlouženou mastnou kyselinou (zejména dekanovou či myristovou). Další prodlužování řetězce již pravděpodobně k nárůstu účinku nepřispívá. Mírnější nárůst účinku způsobila také náhrada oktanoylu nenasycenými mastnými kyselinami či kyselinou bromoktanovou nebo adamantanooctovou. Výrazný orexigenní účinek byl pozorován i po podání analogů se dvěma mastnými kyselinami, ať už se jednalo o analogy vycházející z plného či zkráceného řetězce ghrelu.

Zvýšení příjmu potravy bylo závislé na dávce, maximální účinek většiny analogů byl pozorován 250 – 350 min po podání, orexigenní účinek přetrvával po dobu 8 – 10 hodin po podání.

Popsané výsledky vedou k závěru, že testované syntetické peptidové analogy ghrelu jsou účinnými a stabilními agonisty GHS-R1a s prodlouženým trváním účinku. Nejúčinnější z analogů budou v budoucnu použity pro dlouhodobé testování *in vivo*

na zvířecích modelech kachexie (např. na modelu kachexie vyvolané opakovaným podáváním bakteriálního toxinu lipopolysacharidu myším, nebo na potkaních modelech kachexie vyvolané 5/6 nefrektomií).

6.2 Pseudopeptidový agonista GHS-R1a JMV1843

Jak bylo řečeno výše, ghrelin a další agonisté GHS-R1a jsou v současné době středem zájmu jako potenciální léčiva k terapii kachexie. V této práci je popsáno testování akutních a dlouhodobých účinků pseudopeptidového agonisty GHS-R1a JMV1843 po periferním podávání štíhlým myším kmene C57BL/6. Výše uvedené výsledky ukazují, že JMV1843 pozitivně ovlivňuje příjem potravy a nárůst tělesné hmotnosti, což naznačuje možnost jeho využití v léčbě onemocnění spojených s chronicky sníženým příjmem potravy.

Obdobně jako v dříve popsaném experimentu sledujícím příjem potravy v intervalu 90 minut po jednorázovém podání JMV1843 (Pirnik *et al.* 2011) bylo ukázáno, že JMV1843 stimuluje příjem potravy u *ad libitum* krmených myší po dobu 5 hodin od jednorázového periferního podání. Zvýšení příjmu potravy bylo dávkově závislé, přičemž statistické významnosti bylo dosaženo při použití dávky 1 mg/kg tělesné hmotnosti myši. Dávky 5 a 10 mg/kg způsobily více než pětinasobný nárůst příjmu potravy oproti kontrolní skupině, což představuje vyšší účinek, než jaký byl v našich předešlých experimentech pozorován po podání ghreluinu ve stejné dávce (Maletínská *et al.* 2012). Lze předpokládat, že tato skutečnost může být dána prodlouženou stabilitou JMV1843 a tedy delším trváním jeho účinku ve srovnání s ghrelinem. Uvádí se, že biologický poločas ghreluinu je přibližně 9-13 minut; tato relativně nízká hodnota souvisí především s rychlou desacylací peptidu (Akamizu & Kangawa 2006). Oproti tomu JMV1843 vykazuje zvýšenou stabilitu a jeho biologický poločas po intradermálním podání zdravým dobrovolníkům se pohybuje v rozmezí 80-93 minut (Piccoli *et al.* 2007). V našem experimentu sledujícím degradaci JMV1843 v myším krevním séru *in vitro* jsme ukázali, že JMV1843 zůstal stabilní po dobu 24 hodin a teprve po 2.5 dnech poklesla jeho koncentrace přibližně na polovinu. Jak bylo popsáno v naší předchozí studii (Maletínská *et al.* 2012), ghrelin je při použití stejných podmínek experimentu degradován s poločasem 12 minut. Při stanovení degradačního profilu JMV1843 *in vivo* po periferním podání myším bylo zjištěno, že testovaná sloučenina rychle vstupuje do krevního oběhu a dosahuje maximální koncentrace v krvi 10 minut po podání. Přestože při testech *in vitro* se JMV1843 jevil

jako velmi stabilní, byl během 2 hodin po podání myším z jejich krve téměř zcela eliminován. Biologický poločas byl 21-23 minut a nulové koncentrace v krvi bylo dosaženo po 4 hodinách od podání. Tato pozorování naznačují, že JMV1843 je buďto rychle metabolizován, nebo dochází k jeho akumulaci ve tkáních.

Po deseti dnech opakovaného SC podávání JMV1843 štíhlým myším samcům bylo při použití obou dávek pozorováno signifikantní zvýšení příjmu potravy a tělesné hmotnosti. Účinek byl překvapivě mírně vyšší při použití dávky 10 mg/kg, což mohlo být způsobeno nižší rozpustností JMV1843 ve vyšší dávce nebo dosažením maximálního možného efektu při dávce 10 mg/kg. Účinek na nárůst hmotnosti trval po celou dobu experimentu, přestože příjem potravy byl významně zvýšen pouze po dobu 7 dnů a poté jeho nárůst mírně poklesl. Toto zjištění je v souladu s předpokladem, že na vzrůstu tělesné hmotnosti vyvolaném účinky ghrelinu se pravděpodobně kromě hyperfagie podílejí také další mechanismy (Kim *et al.* 2004). Bylo popsáno, že chronické podávání ghrelinu štíhlým myším vede ke snížení exprese UCP-1 v hnědé tukové tkáni (Tsubone *et al.* 2005). UCP-1 je exprimován převážně v mitochondriích hnědé tukové tkáně, zodpovídá za její vysokou termogenní kapacitu a podílí se na regulaci energetického výdeje (Clapham 2011). Jak je zmíněno v oddíle 5.2.3, bylo zjištěno, že desetidenní podávání JMV1843 způsobuje statisticky významné snížení exprese UCP-1 v hnědé tukové tkáni obdobně jako ghrelin. To napovídá, že k pozorovanému nárůstu tělesné hmotnosti myší mohla přispět také redukce energetického výdeje.

K analýze mechanismu orexigenního účinku dlouhodobě podávaného JMV1843 jsme studovali změny exprese mRNA neuropeptidu Y a agouti-related proteinu v mediobazálním hypothalamu. NPY a AgRP jsou účinné orexigenní peptidy koexprimované neurony v *nucleu arcuatu*. Bylo popsáno, že jak centrální, tak periferní chronické podávání ghrelinu vede ke zvýšení exprese NPY a AgRP v hypothalamu, což naznačuje, že neurony exprimující NPY a AgRP jsou primárním cílem ghrelinu v hypothalamu a zprostředkovávají jeho orexigenní účinek (Kamegai *et al.* 2001; Chen *et al.* 2004). Zjistili jsme, že chronické podávání JMV1843 rovněž zvyšuje hladiny mRNA pro NPY a AgRP v hypothalamu, z čehož lze usoudit, že mechanismus účinku JMV1843 na příjem potravy je podobný popsanému mechanismu účinku ghrelinu. Kromě zmíněného orexigenního efektu snižují NPY a AgRP termogenezi prostřednictvím redukce produkce UCP-1 v hnědé tukové tkáni (Billington *et al.* 1994; Small *et al.* 2001). Je tedy pravděpodobné, že účinek JMV1843 na expresi UCP-1

v hnědé tukové tkáni může být zprostředkován stimulací NPY/AgRP neuronů v hypothalamu.

Desetidenní podávání JMV1843 vedlo k mírnému, nesignifikantnímu zvýšení obsahu tukové tkáně v organismu a hladin cirkulujícího leptinu. Tato tendence je v souladu s dříve popsaným pozorováním, že přírůstek hmotnosti vyvolaný podáváním ghrelinu je dán zejména nárůstem adipozity, přičemž hmotnost svalové tkáně a vnitřních orgánů zůstává nedotčena (Tsubone *et al.* 2005). Naše zjištění, že dlouhodobé podávání JMV1843 nemělo vliv na expresi markerů myogeneze, tento závěr podporuje a naznačuje, že JMV1843 podobně jako ghrelin neovlivňuje objem svalové hmoty. Tento závěr se nicméně týká zdravých myší; v kachektickém modelu může být působení JMV1843 jiné. Výsledky analýzy exprese mRNA nicméně nepotvrdily ani signifikantní zvýšení adipogeneze. Pro potenciální využití JMV1843 se však jeví jako nejzásadnější aktivace orexigenních mechanismů.

Výše popsané účinky byly u myší, jimž byla podávána vyšší dávka JMV1843, doprovázeny statisticky významným nárůstem hladiny krevní glukózy, který při použití nižší dávky nebyl pozorován. Žádná z použitých dávek nicméně neovlivnila plazmatické koncentrace inzulínu a adiponektinu, což naznačuje absenci škodlivých účinků JMV1843 na citlivost k inzulínu. Toto pozorování je v souladu s dřívějšími studii zabývajícími se účinky chronicky podávaného ghrelinu (Kamegai *et al.* 2001; Nakazato *et al.* 2001; Kim *et al.* 2004),

6.3 Nepeptidoví antagonisté GHS-R1a JMV3002 a JMV4208

Vzhledem k tomu, že obezita a s ní spojená zdravotní rizika zaznamenávají celosvětový dramatický nárůst (Caballero 2007), stále roste i potřeba nových antiobezitních farmakologických prostředků. Blokování účinku ghrelinu prostřednictvím antagonistů GHS-R1a se jeví jako slibný přístup v terapii obezity. Z tohoto důvodu byla vyvinuta a testována celá řada syntetických antagonistů GHS-R1a (review např. Zhao & Liu 2006; Moulin *et al.* 2007b; Chollet *et al.* 2009). Antagonisté ghrelinu mohou mít další potenciální využití při některých onemocněních doprovázených hyperfagií, jako je např. Prader-Williho syndrom, genetická porucha spojená se zvýšenými plazmatickými hladinami ghrelinu (Cummings *et al.* 2002a).

V této práci jsou popsány výsledky testování dvou antagonistů GHS-R1a, JMV3002 a JMV4208, trisubstituovaných derivátů 1,2,4-triazolu. Byl studován jak jejich akutní účinek na příjem potravy u štíhlých myší, tak účinky na příjem potravy,

tělesnou hmotnost, biochemické parametry a metabolismus tuků po dlouhodobém podávání myším s obezitou indukovanou vysokotukovou dietou.

Dřívější publikace popisují účinky triazolových antagonistů GHS-R1a na příjem potravy po ICV podání potkanům (Salomé *et al.* 2009a) a po ICV či IP podání myším (Asakawa *et al.* 2003). V souladu s výsledky těchto experimentů jsme ukázali, že JMV3002 a JMV4208 snižují příjem potravy u hladových štíhlých myší také po SC podání, a že JMV3002 potlačuje nárůst příjmu potravy vyvolaný současným periferním (SC) podáním ghrelinu hladovým štíhlým myším, podobně jako bylo ukázáno v dříve publikovaných studiích s jinými antagonisty GHS-R1a (Esler *et al.* 2007; Rudolph *et al.* 2007).

Výsledky farmakokinetického experimentu *in vivo* ukázaly, že JMV3002 a JMV4208 po podkožním podání myším rychle vstupují do krevního oběhu a v průběhu prvních 30 minut po podání dosahují maximální koncentrace v krvi. Obě testované sloučeniny byly zcela eliminovány z krevního oběhu 8 hodin po podání, což naznačuje jejich poměrně dobrou stabilitu např. ve srovnání s peptidovým antagonistou GHS-R1a [Dlys³]-GHRP-6, který dosahuje nulové koncentrace v krvi již 2 hodiny po podkožním podání myším (Maletínská *et al.* 2011).

Po dvoutýdenním SC podávání JMV3002 a JMV4208 DIO myším bylo pozorováno statisticky významné snížení příjmu potravy a tělesné hmotnosti myší, a to o 15 % původní hmotnosti po podávání JMV3002 a o 10 % původní hmotnosti po podávání JMV4208. Tělesná hmotnost kontrolní skupiny, které bylo SC podáváno rozpouštědlo (50% PEG), byla také mírně snížena (cca o 4 %), podobně jako v naší předcházející studii (Maletínská *et al.* 2011), v níž jsme po 7 dnech SC podávání fyziologického roztoku pozorovali průměrný hmotnostní úbytek přibližně 3 g. Tato skutečnost může pravděpodobně souviset s citlivostí DIO myší kmene C57BL/6 na stres způsobený opakovanou manipulací a injekční aplikací testovaných látek či rozpouštědla. Velký hmotnostní úbytek myší, jimž byly podávány testované sloučeniny, byl nicméně statisticky významný ve srovnání s kontrolní skupinou.

Hmotnostní úbytek skupin, jimž byla podávána dávka 20 mg/kg antagonistů GHS-R1a, byl výraznější, než hmotnostní úbytek příslušných párově krmených skupin. Mezi párově krmenými skupinami a skupinami injikovanými antagonisty však nebyl signifikantní rozdíl. Předpokládáme, že mírně vyšší úbytek hmotnosti po podávání antagonistů GHS-R1a mohl být kromě redukce příjmu potravy zčásti způsoben také

dalšími mechanismy, např. zvýšením energetického výdeje. Tomu nasvědčuje tendence ke zvýšení exprese mRNA pro UCP-1 v hnědé tukové tkáni.

Redukce hmotnosti po dlouhodobém podávání JMV3002 a JMV4208 byla dána zejména úbytkem tukové tkáně, který byl provázen poklesem hladin cirkulujícího leptinu. V podkožní ani viscerální tukové tkáni nebyla snížena exprese mRNA pro leptin, což nasvědčuje tomu, že snížená sekrece leptinu je výsledkem sníženého množství tukové tkáně. Hladiny cirkulujícího adiponektinu ani jeho exprese v tukové tkáni nebyly podáváním antagonistů GHS-R1a ovlivněny.

Zmíněný úbytek tukové tkáně byl nejvýraznějším periferním účinkem testovaných sloučenin; zejména bylo redukováno množství podkožního a perirenálního tuku. Bylo popsáno, že GHS-R1a-deficientní myši mají nižší tělesnou hmotnost z důvodu nižší adipozity (Zigman *et al.* 2005) a podávání ghrelinu naopak u hlodavců vede k nárůstu adipozity (Tschöp *et al.* 2000). Pozorované snížení množství tuku bylo pravděpodobně zprostředkováno sníženou expresí lipogenetických enzymů ACACA a FASN, což je v souladu s pozorováním, že nárůst adipozity způsobený centrálním podáváním ghrelinu je zprostředkován zvýšením exprese ACACA a FASN v adipocytech bílé tukové tkáně (Theander-Carrillo *et al.* 2006).

Po podávání obou antagonistů byla pozorována tendence ke snížení hladiny krevní glukózy a inzulínu, tyto změny však nebyly signifikantní, na rozdíl od studií s dalšími antagonisty GHS-R1a. Po perorálním podávání derivátů quinazolinonu DIO myším bylo popsáno zlepšení inzulínové sekrece po podání glukózy (Esler *et al.* 2007; Rudolph *et al.* 2007). Podávání [Dlys³]-GHRP-6 vedlo ke snížení hladin glukózy a inzulínu u ovariektomovaných myší s DIO (Maletínská *et al.* 2011).

Snížení hmotnosti jater způsobené 14-denním podáváním JMV3002 bylo s největší pravděpodobností způsobeno ztrátou nahromaděného tuku. Expese ACACA a FASN, enzymů katalyzujících lipogenetické procesy, ani CPT, podílející se na lipolýze, v játrech však nebyla podáváním žádného z antagonistů ovlivněna.

Poměrně překvapivé byly výsledky analýzy exprese mRNA pro neuropeptidy v mediobazálním hypothalamu. Snížení exprese orexigenních neuropeptidů NPY a AgRP nedosáhlo statistické významnosti, významně však byla snížena exprese anorexigenního neuropeptidu POMC. Byla publikována hypotéza, že obezita indukovaná vysokotukovou dietou narušuje funkci NPY/AgRP neuronů v *nucleu arcuatu*, vede k potlačení neuroendokrinní osy ghrelinu a zapříčiňuje centrální hypothalamickou rezistenci ke ghrelinu (Briggs *et al.* 2010). Podle této publikace je

také při DIO snížena exprese mRNA pro NPY a AgRP a centrální podávání ghrelinu nevede u myši s DIO ke zvýšení jejich exprese. Obdobně je možno usoudit, že DIO myši mohou být rezistentní vůči působení antagonistů GHS-R1a na úrovni exprese mRNA pro NPY/AgRP. V další publikaci Briggs a Andrews uvádějí, že u DIO myši ghrelin pravděpodobně neinhibuje POMC neurony prostřednictvím inhibičního neurotransmiteru kyseliny γ -aminomáselné (GABA) z NPY/AgRP neuronů, čímž může být zachován inhibiční účinek α -MSH, peptidu vznikajícího z POMC, na příjem potravy. Mechanismus způsobující rezistenci vůči ghrelinu může souviset s hyperglykemií a hyperinzulinemií asociovanou s DIO. Při DIO jsou POMC neurony regulovány zejména leptinem; redukce hmotnosti daná úbytkem tukové tkáně vede k poklesu krevních hladin leptinu, což způsobí redukci exprese POMC (Briggs & Andrews 2011). Dlouhodobé podávání antagonistů GHS-R1a JMV3002 a JMV4208 vedlo ke snížení množství tukové tkáně následovanému úbytkem cirkulujícího leptinu, což pravděpodobně vysvětluje pozorované snížení exprese POMC v mediobazálním hypothalamu. Tento výsledek doplňuje pozorování, že GHS-R1a-deficientní myši mají zachovanou citlivost k exogennímu leptinu, pokud jde o jeho anorexigenní účinky a vliv na redukci hmotnosti (Perello *et al.* 2012).

6.4 Perspektiva analogů ghrelinu pro terapeutické využití

6.4.1 Agonisté GHS-R1a pro léčbu kachexie a anorexie

Ghrelin byl testován v řadě studií na kachektických chronicky nemocných pacientech; bylo zjištěno, že zvyšuje chuť k jídlu, příjem potravy, tělesnou hmotnost a snižuje degradaci svalových proteinů, čímž pomáhá udržet konstantní beztukovou hmotnost. Mimoto potlačuje zánět a snižuje aktivitu sympatiku (Neary *et al.* 2004; Nagaya *et al.* 2005; Kodama *et al.* 2008; Strasser *et al.* 2008; Lundholm *et al.* 2010; Hiura *et al.* 2012). Je však ještě nezbytné, aby proběhlo dlouhodobé klinické testování, které by potvrdilo jednak bezpečnost dlouhodobého podávání ghrelinu, jednak jeho efektivitu ve smyslu léčby kachexie. Ze syntetických agonistů GHS-R1a byl doposud na kachektických pacientech testován pouze anamorelin a macimorelin (Allas & Aribat 2013; Guillory *et al.* 2013).

Pokud by se v klinických studiích na kachektických pacientech ukázalo podávání ghrelinu efektivní, mohly by v budoucnu nalézt uplatnění i stabilní analogy ghrelinu s prodlouženým trváním účinku.

6.4.2 Antagonisté GHS-R1a pro léčbu obezity

Blokování účinku ghrelinu prostřednictvím antagonistů či inverzních agonistů GHS-R1a je považováno za slibný potenciální terapeutický prostředek pro boj s obezitou. Nicméně, přestože do dnešního dne bylo připraveno a charakterizováno velké množství syntetických nepeptidových antagonistů GHS-R1a, žádný z nich doposud nepostoupil ke klinickému testování a většina z nich ani k dlouhodobějšímu testování na zvířecích modelech, které by umožnilo zhodnotit jejich skutečný potenciál pro léčbu obezity. Prozatím jediným kandidátem pro klinické studie, který blokuje účinek ghrelinu, je Spiegelmer NOX-B11 (Patterson *et al.* 2011; Delporte 2012; Davenport & Wright 2013; De Vriese 2014). Jak již bylo zmíněno v úvodu, řada látek, které byly ve vazebných a funkčních studiích identifikovány jako antagonisté GHS-R1a, nebyla dosud testována *in vivo* ani po akutním podání nebo nevykazovala v krátkodobých testech *in vivo* účinek na příjem potravy, což mohlo být ve většině případů dáno jejich špatnou biologickou dostupností.

Je ovšem také možné, že hlodavci nejsou vhodným modelem pro testování *in vivo* aktivity některých antagonistů ghrelinu. Podle ústního sdělení prof. Fehrenze z laboratoře prof. Martineze (IBMM, Montpellier, Francie) se antagonisté GHS-R1a na bázi trisubstituovaného 1,2,4-triazolu, z nichž někteří byli testováni v naší laboratoři, váží na buňky s transfekovaným potkaním nebo myším receptorem GHS-R1a s až o dva řády nižší afinitou než na buňky s transfekovaným lidským receptorem GHS-R1a. Nízký účinek antagonistů GHS-R1a na ovlivnění příjmu potravy u hlodavců tedy nemusí nezbytně znamenat, že by látky byly neúčinné po podání lidem. Antagonisté JMV3002 a JMV4208, o jejichž účincích na myší model obezity indukované vysokotukovou dietou pojednává tato práce, musí být pro dosažení účinku podávání v relativně vysokých dávkách (10 - 20 mg/kg). Lze předpokládat, že u lidí by mohly být účinné i dávky nižší.

Nevýhodou syntetických nepeptidových antagonistů GHS-R1a, na rozdíl od přirozeně se vyskytujícího ghrelinu nebo jeho dosud jediného peptidového antagonisty [DLys³]-GHRP-6, může být jednak jejich špatná rozpustnost, jednak potenciální vedlejší účinky. JMV3002 a JMV4208 jsou nerozpustné ve vodě či fyziologickém roztoku, musí tedy být rozpouštěny buďto v toxickém DMSO (Salomé *et al.* 2009b), nebo v roztoku polyethylenglykolu. Při experimentech jsme pozorovali, že při přidání fyziologického roztoku do roztoku antagonistů v PEG nad 50 % objemu dochází k vysrážení sloučenin z roztoku. Je tedy možné, že po SC injekční aplikaci se

mohou tyto látky srážet v podkoží, jejich vstup do krevního oběhu může být nízký a nerozpustnost tak může způsobovat nutnost podávání vysokých dávek.

Při testování JMV3002 a JMV4208 jsme pozorovali, že tyto látky po SC podání myším ve vysoké dávce způsobují mírnou sedaci; k normalizaci stavu dochází přibližně po hodině. Zároveň se jmenovanými sloučeninami jsme také testovali dalšího, v mnoha studiích používaného triazolového antagonistu GHS-R1a JMV2959 (Salomé *et al.* 2009a; Salomé *et al.* 2009b; Egecioglu *et al.* 2010; Verhagen *et al.* 2011; Skibicka *et al.* 2012; Suchankova *et al.* 2013). Ten však musel být z dlouhodobého experimentu vyřazen; přestože je na rozdíl od JMV3002 a JMV4208 velmi dobře rozpustný, jeho chronické podávání vedlo ke vzniku rozsáhlých lokálních zánětů v místě aplikace a významná ztráta hmotnosti experimentálních zvířat tak nemohla být přičítána jeho anorexigennímu působení.

Pokud by se podařilo vyřešit problém s rozpustností antagonistů GHS-R1a na bázi 1,2,4-triazolu nebo nalézt vhodnější rozpouštědlo, mohly by tyto látky v budoucnu nalézt uplatnění v léčbě obezity.

7 ZÁVĚRY

- Nové peptidové analogy ghrelinu stabilizované nekódovými aminokyselinami a navázáním mastné kyseliny stabilní amidovou vazbou se s vysokou afinitou vázaly k receptoru GHS-R1a a srovnatelně s ghrelinem působily na aktivaci signalizačních drah ghrelinu. Po jednorázovém SC podání myším signifikantně zvyšovaly příjem potravy, a to srovnatelně či více než ghrelin nebo [Dpr³]ghrelin. Jejich účinek byl dlouhotrvající, což lze přičíst zvýšené stabilitě. Testované peptidové analogy ghrelinu jsou tedy účinnými a stabilními agonisty GHS-R1a s prodlouženým trváním účinku. Nejúčinnější z analogů by po otestování v dlouhodobých experimentech na kachektických zvířecích modelech mohly v budoucnu potenciálně najít využití v terapii kachexie či anorexie.
- Pseudopeptidový agonista GHS-R1a JMV1843 zvyšoval příjem potravy po jednorázovém SC podání štíhlým myším; jeho orexigenní účinek byl větší než efekt ghrelinu podaného ve stejné dávce, což je pravděpodobně dáno jeho vyšší stabilitou, prokázanou ve farmakokinetických experimentech *in vitro*. Dlouhodobé podávání JMV1843 štíhlým myším vedlo ke zvýšení příjmu potravy a nárůstu tělesné hmotnosti. Expresí orexigenních neuropeptidů NPY a AgRP v hypothalamu byla po dlouhodobém podávání signifikantně zvýšena, což naznačuje, že mechanismus orexigenního účinku JMV1843 je shodný s mechanismem účinku ghrelinu. Mimoto byla snížena exprese UCP-1 v hnědé tukové tkáni, k pozorovanému nárůstu tělesné hmotnosti tedy pravděpodobně přispěla i redukce energetického výdeje. Tyto výsledky podporují předpoklad, že by JMV1843 mohl být účinným prostředkem pro léčbu kachexie.
- Antagonisté GHS-R1a na bázi trisubstituovaného 1,2,4-triazolu JMV3002 a JMV4208 snižovali po jednorázovém periferním podání štíhlým myším příjem potravy v závislosti na dávce. Obě látky vykazovaly poměrně dobrou stabilitu v krvi *in vivo*. Při dlouhodobém podávání obézním myším s DIO bylo pozorováno snížení příjmu potravy a úbytek tělesné hmotnosti o 15 % po podávání JMV3002, o 10 % po podávání JMV4208. Redukce hmotnosti byla dána zejména úbytkem tukové tkáně, který byl zprostředkován sníženou expresí lipogenetických enzymů ACACA a FASN. Podávání JMV3002 také způsobilo snížení hmotnosti jater. Pokud by se podařilo vyřešit problém s nerozpustností těchto látek, mohly by potenciálně být v budoucnu využity v terapii obezity nebo jiných poruch asociovaných s hyperfagií.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akamizu T. & Kangawa K. (2006) Translational research on the clinical applications of ghrelin. *Endocr J* 53, 585-91.
- Akamizu T. & Kangawa K. (2011) Therapeutic applications of ghrelin to cachexia utilizing its appetite-stimulating effect. *Peptides* 32, 2295-300.
- Akman M.S., Girard M., O'Brien L.F., Ho A.K. & Chik C.L. (1993) Mechanisms of action of a second generation growth hormone-releasing peptide (Ala-His-D-beta Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 132, 1286-91.
- Allas S. & Aribat T. (2013) Clinical perspectives for ghrelin-derived therapeutic products. *Endocr Dev* 25, 157-66.
- Andersson U., Filipsson K., Abbott C.R., Woods A., Smith K., Bloom S.R., Carling D. & Small C.J. (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279, 12005-8.
- Andrade S., Pinho F., Ribeiro A.M., Carreira M., Casanueva F.F., Roy P. & Monteiro M.P. (2013) Immunization against active ghrelin using virus-like particles for obesity treatment. *Curr Pharm Des* 19, 6551-8.
- Ankersen M., Johansen N.L., Madsen K., Hansen B.S., Raun K., Nielsen K.K., Thogersen H., Hansen T.K., Peschke B., Lau J., Lundt B.F. & Andersen P.H. (1998) A new series of highly potent growth hormone-releasing peptides derived from ipamorelin. *J Med Chem* 41, 3699-704.
- Ariyasu H., Takaya K., Iwakura H., Hosoda H., Akamizu T., Arai Y., Kangawa K. & Nakao K. (2005) Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* 146, 355-64.
- Arvat E., Maccario M., Di Vito L., Broglio F., Benso A., Gottero C., Papotti M., Muccioli G., Dieguez C., Casanueva F.F., Deghenghi R., Camanni F. & Ghigo E. (2001) Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1169-74.
- Asakawa A., Inui A., Kaga T., Katsuura G., Fujimiya M., Fujino M.A. & Kasuga M. (2003) Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52, 947-52.
- Ashitani J., Matsumoto N. & Nakazato M. (2009) Ghrelin and its therapeutic potential for cachectic patients. *Peptides* 30, 1951-6.
- Banks W.A., Tschöp M., Robinson S.M. & Heiman M.L. (2002) Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 822-7.
- Barnett B.P., Hwang Y., Taylor M.S., Kirchner H., Pfluger P.T., Bernard V., Lin Y.Y., Bowers E.M., Mukherjee C., Song W.J., Longo P.A., Leahy D.J., Hussain M.A., Tschöp M.H., Boeke J.D. & Cole P.A. (2010) Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science* 330, 1689-92.
- Beck B., Richy S. & Stricker-Krongrad A. (2004) Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. *Life Sci* 76, 473-8.
- Bednarek M.A., Feighner S.D., Pong S.S., McKee K.K., Hreniuk D.L., Silva M.V., Warren V.A., Howard A.D., Van Der Ploeg L.H. & Heck J.V. (2000) Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 43, 4370-6.

- Bellmann-Sickert K. & Beck-Sickinger A.G. (2010) Peptide drugs to target G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31, 434-41.
- Bennani-Baiti N. & Walsh D. (2011) Animal models of the cancer anorexia-cachexia syndrome. *Support Care Cancer* 19, 1451-63.
- Billington C.J., Briggs J.E., Harker S., Grace M. & Levine A.S. (1994) Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 266, R1765-70.
- Bowers C.Y. (1993) GH releasing peptides--structure and kinetics. *J Pediatr Endocrinol* 6, 21-31.
- Bowers C.Y., Momany F.A., Reynolds G.A. & Hong A. (1984) On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 114, 1537-45.
- Briggs D.I. & Andrews Z.B. (2011) Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology* 93, 48-57.
- Briggs D.I., Enriori P.J., Lemus M.B., Cowley M.A. & Andrews Z.B. (2010) Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology* 151, 4745-55.
- Broberger C. (2005) Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med* 258, 301-27.
- Broglio F., Boutignon F., Benso A., Gottero C., Prodam F., Arvat E., Ghè C., Catapano F., Torsello A., Locatelli V., Muccioli G., Boeglin D., Guerlavais V., Fehrentz J.A., Martinez J., Ghigo E. & Deghenghi R. (2002) EP1572: a novel peptidomimetic GH secretagogue with potent and selective GH-releasing activity in man. *J Endocrinol Invest* 25, RC26-8.
- Caballero B. (2007) The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev* 29, 1-5.
- Carpino P.A., Lefker B.A., Toler S.M., Pan L.C., Hadcock J.R., Cook E.R., DiBrino J.N., Campeta A.M., DeNinno S.L., Chidsey-Frink K.L., Hada W.A., Inthavongsay J., Mangano F.M., Mullins M.A., Nickerson D.F., Ng O., Pirie C.M., Ragan J.A., Rose C.R., Tess D.A., Wright A.S., Yu L., Zawistoski M.P., DaSilva-Jardine P.A., Wilson T.C. & Thompson D.D. (2003) Pyrazolinone-piperidine dipeptide growth hormone secretagogues (GHSs). Discovery of capromorelin. *Bioorg Med Chem* 11, 581-90.
- Chang L., Zhao J., Yang J., Zhang Z., Du J. & Tang C. (2003) Therapeutic effects of ghrelin on endotoxic shock in rats. *Eur J Pharmacol* 473, 171-6.
- Chen H.Y., Trumbauer M.E., Chen A.S., Weingarh D.T., Adams J.R., Frazier E.G., Shen Z., Marsh D.J., Feighner S.D., Guan X.M., Ye Z., Nargund R.P., Smith R.G., Van der Ploeg L.H., Howard A.D., MacNeil D.J. & Qian S. (2004) Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145, 2607-12.
- Cheng Y. & Prusoff W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099-108.
- Cheung W., Yu P.X., Little B.M., Cone R.D., Marks D.L. & Mak R.H. (2005) Role of leptin and melanocortin signaling in uremia-associated cachexia. *J Clin Invest* 115, 1659-65.
- Chollet C., Meyer K. & Beck-Sickinger A.G. (2009) Ghrelin--a novel generation of anti-obesity drug: design, pharmacomodulation and biological activity of ghrelin analogues. *J Pept Sci* 15, 711-30.

- Chow K.B., Sun J., Chu K.M., Tai Cheung W., Cheng C.H. & Wise H. (2012) The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol* 348, 247-54.
- Clapham J.C. (2011) Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology*.
- Costantini V.J., Vicentini E., Sabbatini F.M., Valerio E., Lepore S., Tessari M., Sartori M., Michielin F., Melotto S., Pich E.M. & Corsi M. (2011) GSK1614343, a novel ghrelin receptor antagonist, produces an unexpected increase of food intake and body weight in rodents and dogs. *Neuroendocrinology* 94, 158-68.
- Cowley M.A., Smith R.G., Diano S., Tschöp M., Pronchuk N., Grove K.L., Strasburger C.J., Bidlingmaier M., Esterman M., Heiman M.L., Garcia-Segura L.M., Nillni E.A., Mendez P., Low M.J., Sotonyi P., Friedman J.M., Liu H., Pinto S., Colmers W.F., Cone R.D. & Horvath T.L. (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649-61.
- Cullen P.J. & Lockyer P.J. (2002) Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 339-48.
- Cummings D.E., Clement K., Purnell J.Q., Vaisse C., Foster K.E., Frayo R.S., Schwartz M.W., Basdevant A. & Weigle D.S. (2002a) Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 8, 643-4.
- Cummings D.E., Purnell J.Q., Frayo R.S., Schmidova K., Wisse B.E. & Weigle D.S. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714-9.
- Cummings D.E., Weigle D.S., Frayo R.S., Breen P.A., Ma M.K., Dellinger E.P. & Purnell J.Q. (2002b) Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346, 1623-30.
- Date Y., Murakami N., Kojima M., Kuroiwa T., Matsukura S., Kangawa K. & Nakazato M. (2000) Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 477-80.
- Date Y., Murakami N., Toshinai K., Matsukura S., Nijima A., Matsuo H., Kangawa K. & Nakazato M. (2002) The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123, 1120-8.
- Davenport R.J. & Wright S. (2013) Treating obesity: is it all in the gut? *Drug Discov Today*.
- De Schutter A., Lavie C.J., Patel D.A. & Milani R.V. (2013) Obesity paradox and the heart: which indicator of obesity best describes this complex relationship? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 517-24.
- De Vriese C., Gregoire F., Lema-Kisoka R., Waelbroeck M., Robberecht P. & Delporte C. (2004) Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 145, 4997-5005.
- De Vriese C., Perret J. & Delporte C. (2014) Current and future clinical applications of ghrelin. *Endocrine Disease* [Accepted, waiting for copy editing].
- DeBoer M.D. (2009) Animal models of anorexia and cachexia. *Expert Opin Drug Discov* 4, 1145-55.
- DeBoer M.D. (2011) Ghrelin and cachexia: will treatment with GHSR-1a agonists make a difference for patients suffering from chronic wasting syndromes? *Mol Cell Endocrinol* 340, 97-105.

- DeBoer M.D. & Marks D.L. (2006) Therapy insight: Use of melanocortin antagonists in the treatment of cachexia in chronic disease. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2, 459-66.
- Deboer M.D., Zhu X., Levasseur P.R., Inui A., Hu Z., Han G., Mitch W.E., Taylor J.E., Halem H.A., Dong J.Z., Datta R., Culler M.D. & Marks D.L. (2008) Ghrelin treatment of chronic kidney disease: improvements in lean body mass and cytokine profile. *Endocrinology* 149, 827-35.
- DeBoer M.D., Zhu X.X., Levasseur P., Meguid M.M., Suzuki S., Inui A., Taylor J.E., Halem H.A., Dong J.Z., Datta R., Culler M.D. & Marks D.L. (2007) Ghrelin treatment causes increased food intake and retention of lean body mass in a rat model of cancer cachexia. *Endocrinology* 148, 3004-12.
- Deghenghi R. (1997) The development of 'impervious peptides' as growth hormone secretagogues. *Acta Paediatr Suppl* 423, 85-7.
- Deghenghi R., Cananzi M.M., Torsello A., Battisti C., Muller E.E. & Locatelli V. (1994) GH-releasing activity of Hexarelin, a new growth hormone releasing peptide, in infant and adult rats. *Life Sci* 54, 1321-8.
- Delhanty P.J., Neggers S.J. & van der Lely A.J. (2012) Mechanisms in endocrinology: Ghrelin: the differences between acyl- and des-acyl ghrelin. *Eur J Endocrinol* 167, 601-8.
- Delhanty P.J., Neggers S.J. & van der Lely A.J. (2014) Should we consider des-acyl ghrelin as a separate hormone and if so, what does it do? *Front Horm Res* 42, 163-74.
- Delporte C. (2012) Recent advances in potential clinical application of ghrelin in obesity. *J Obes* 2012, 535624.
- Delporte C. (2013) Structure and Physiological Actions of Ghrelin. *Scientifica (Cairo)* 2013, 518909.
- Demange L., Boeglin D., Moulin A., Mousseaux D., Ryan J., Bergé G., Gagne D., Heitz A., Perrissoud D., Locatelli V., Torsello A., Galleyrand J.C., Fehrentz J.A. & Martinez J. (2007) Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations of novel triazole derivatives as ligands of the ghrelin receptor. 1. *J Med Chem* 50, 1939-57.
- Depoortere I. (2009) Targeting the ghrelin receptor to regulate food intake. *Regul Pept* 156, 13-23.
- Dixit V.D., Schaffer E.M., Pyle R.S., Collins G.D., Sakthivel S.K., Palaniappan R., Lillard J.W. & Taub D.D. (2004) Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 114, 57-66.
- Egecioglu E., Jerlhag E., Salomé N., Skibicka K.P., Haage D., Bohlooly-Y M., Andersson D., Bjursell M., Perrissoud D., Engel J.A. & Dickson S.L. (2010) Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict Biol* 15, 304-11.
- Elbert T. & Veselá I. (2010) Conditions for successful labeling of oxidation sensitive peptides by Na [125I]-IODO-GENTM system. *J Label Compd Radiopharm* 53, 288-293.
- Els S., Schild E., Petersen P.S., Kilian T.M., Mokrosinski J., Frimurer T.M., Chollet C., Schwartz T.W., Holst B. & Beck-Sickinger A.G. (2012) An aromatic region to induce a switch between agonism and inverse agonism at the ghrelin receptor. *J Med Chem* 55, 7437-49.
- English P.J., Ghatei M.A., Malik I.A., Bloom S.R. & Wilding J.P. (2002) Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2984.

- Esler W.P., Rudolph J., Claus T.H., Tang W., Barucci N., Brown S.E., Bullock W., Daly M., Decarr L., Li Y., Milardo L., Molstad D., Zhu J., Gardell S.J., Livingston J.N. & Sweet L.J. (2007) Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology* 148, 5175-85.
- Evans W.J., Morley J.E., Argilés J., Bales C., Baracos V., Guttridge D., Jatoi A., Kalantar-Zadeh K., Lochs H., Mantovani G., Marks D., Mitch W.E., Muscaritoli M., Najand A., Ponikowski P., Rossi Fanelli F., Schambelan M., Schols A., Schuster M., Thomas D., Wolfe R. & Anker S.D. (2008) Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 27, 793-9.
- Falls H.D., Dayton B.D., Fry D.G., Ogiela C.A., Schaefer V.G., Brodjian S., Reilly R.M., Collins C.A. & Kaszubska W. (2006) Characterization of ghrelin receptor activity in a rat pituitary cell line RC-4B/C. *J Mol Endocrinol* 37, 51-62.
- Fearon K.C. & Moses A.G. (2002) Cancer cachexia. *Int J Cardiol* 85, 73-81.
- Garcia J.M., Cata J.P., Dougherty P.M. & Smith R.G. (2008) Ghrelin prevents cisplatin-induced mechanical hyperalgesia and cachexia. *Endocrinology* 149, 455-60.
- Garcia J.M., Friend J. & Allen S. (2013) Therapeutic potential of anamorelin, a novel, oral ghrelin mimetic, in patients with cancer-related cachexia: a multicenter, randomized, double-blind, crossover, pilot study. *Support Care Cancer* 21, 129-37.
- Garcia J.M. & Polvino W.J. (2009) Pharmacodynamic hormonal effects of anamorelin, a novel oral ghrelin mimetic and growth hormone secretagogue in healthy volunteers. *Growth Horm IGF Res* 19, 267-73.
- Gault V.A., Kerr B.D., Harriott P. & Flatt P.R. (2011) Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity. *Clin Sci (Lond)* 121, 107-17.
- Glass D. & Roubenoff R. (2010) Recent advances in the biology and therapy of muscle wasting. *Ann N Y Acad Sci* 1211, 25-36.
- Gould K.E., Taffet G.E., Michael L.H., Christie R.M., Konkol D.L., Pocius J.S., Zachariah J.P., Chaupin D.F., Daniel S.L., Sandusky G.E., Hartley C.J. & Entman M.L. (2002) Heart failure and greater infarct expansion in middle-aged mice: a relevant model for postinfarction failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H615-21.
- Granado M., Priego T., Martín A.I., Villanúa M.A. & López-Calderón A. (2005) Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E486-92.
- Grossberg A.J., Scarlett J.M. & Marks D.L. (2010) Hypothalamic mechanisms in cachexia. *Physiol Behav* 100, 478-89.
- Guerlavais V., Boeglin D., Mousseaux D., Oiry C., Heitz A., Deghenghi R., Locatelli V., Torsello A., Ghé C., Catapano F., Muccioli G., Galleyrand J.C., Fehrentz J.A. & Martinez J. (2003) New active series of growth hormone secretagogues. *J Med Chem* 46, 1191-203.
- Guillory B., Splenser A. & Garcia J. (2013) The role of ghrelin in anorexia-cachexia syndromes. *Vitam Horm* 92, 61-106.
- Halem H.A., Taylor J.E., Dong J.Z., Shen Y., Datta R., Abizaid A., Diano S., Horvath T., Zizzari P., Bluet-Pajot M.T., Epelbaum J. & Culler M.D. (2004) Novel analogs of ghrelin: physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 1, S71-5.

- Halem H.A., Taylor J.E., Dong J.Z., Shen Y., Datta R., Abizaid A., Diano S., Horvath T.L. & Culler M.D. (2005) A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain. *Neuroendocrinology* 81, 339-49.
- Hansen B.S., Raun K., Nielsen K.K., Johansen P.B., Hansen T.K., Peschke B., Lau J., Andersen P.H. & Ankersen M. (1999) Pharmacological characterisation of a new oral GH secretagogue, NN703. *Eur J Endocrinol* 141, 180-9.
- Hardie D.G. (2008) AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 4, S7-12.
- Hariri N. & Thibault L. (2010) High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23, 270-99.
- Harrold J.A., Dovey T.M., Blundell J.E. & Halford J.C. (2012) CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* 63, 3-17.
- Hassouna R., Labarthe A., Zizzari P., Videau C., Culler M., Epelbaum J. & Tolle V. (2013) Actions of Agonists and Antagonists of the ghrelin/GHS-R Pathway on GH Secretion, Appetite, and cFos Activity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 25.
- Hataya Y., Akamizu T., Takaya K., Kanamoto N., Ariyasu H., Saijo M., Moriyama K., Shimatsu A., Kojima M., Kangawa K. & Nakao K. (2001) A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4552.
- Hatzieremia S., Kostomitsopoulos N., Balafas V. & Tamvakopoulos C. (2007) A liquid chromatographic/tandem mass spectroscopic method for quantification of the cyclic peptide melanotan-II. Plasma and brain tissue concentrations following administration in mice. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 2431-8.
- Havelund S., Plum A., Ribel U., Jonassen I., Vølund A., Markussen J. & Kurtzhals P. (2004) The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. *Pharm Res* 21, 1498-504.
- Heal D.J., Gosden J. & Smith S.L. (2012) What is the prognosis for new centrally-acting anti-obesity drugs? *Neuropharmacology* 63, 132-46.
- Helmling S., Maasch C., Eulberg D., Buchner K., Schröder W., Lange C., Vonhoff S., Wlotzka B., Tschöp M.H., Rosewicz S. & Klussmann S. (2004) Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13174-9.
- Hiura Y., Takiguchi S., Yamamoto K., Takahashi T., Kurokawa Y., Yamasaki M., Nakajima K., Miyata H., Fujiwara Y., Mori M., Kangawa K. & Doki Y. (2012) Effects of ghrelin administration during chemotherapy with advanced esophageal cancer patients: A prospective, randomized, placebo-controlled phase 2 study. *Cancer*.
- Holst B., Cygankiewicz A., Jensen T.H., Ankersen M. & Schwartz T.W. (2003) High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 17, 2201-10.
- Holst B., Holliday N.D., Bach A., Elling C.E., Cox H.M. & Schwartz T.W. (2004) Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 279, 53806-17.
- Holst B., Lang M., Brandt E., Bach A., Howard A., Frimurer T.M., Beck-Sickinger A. & Schwartz T.W. (2006) Ghrelin receptor inverse agonists: identification of an active peptide core and its interaction epitopes on the receptor. *Mol Pharmacol* 70, 936-46.
- Holubová M., Spolcová A., Demianová Z., Sýkora D., Fehrentz J.A., Martinez J., Stofková A., Jurčovičová J., Drápalová J., Lacinová Z., Haluzík M., Zelezná B.

- & Maletínská L. (2013) Ghrelin agonist JMV 1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice. *Physiol Res* 62, 435-44.
- Holubová M., Nagelová V., Lacinová Z., Haluzík M., Sýkora D., Moulin A., Blayo A.L., Fehrentz J.A., Martinez J., Stofkova A., Jurčovičová J., Železná B. & Maletínská L. (2014) Triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 attenuate food intake, body weight, and adipose tissue mass in mice. *Mol Cell Endocrinol*, DOI: 10.1016/j.mce.2014.06.003 [In press].
- Hosoda H., Kojima M., Mizushima T., Shimizu S. & Kangawa K. (2003) Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 278, 64-70.
- Hosomi S., Oshitani N., Kamata N., Sogawa M., Yamagami H., Watanabe K., Tominaga K., Watanabe T., Fujiwara Y., Maeda K., Hirakawa K. & Arakawa T. (2008) Phenotypical and functional study of ghrelin and its receptor in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1205-13.
- Howard A.D., Feighner S.D., Cully D.F., Arena J.P., Liberato P.A., Rosenblum C.I., Hamelin M., Hreniuk D.L., Palyha O.C., Anderson J., Paress P.S., Diaz C., Chou M., Liu K.K., McKee K.K., Pong S.S., Chaung L.Y., Elbrecht A., Dashkevich M., Heavens R., Rigby M., Sirinathsinghji D.J., Dean D.C., Melillo D.G., Patchett A.A., Nargund R., Griffin P.R., DeMartino J.A., Gupta S.K., Schaeffer J.M., Smith R.G. & Van der Ploeg L.H. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273, 974-7.
- Huang Q.H., Hruby V.J. & Tatro J.B. (1999) Role of central melanocortins in endotoxin-induced anorexia. *Am J Physiol* 276, R864-71.
- Héliès-Toussaint C., Moinard C., Rasmusen C., Tabbi-Anneni I., Cynober L. & Grynberg A. (2005) Aortic banding in rat as a model to investigate malnutrition associated with heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1325-31.
- Imbimbo B.P., Mant T., Edwards M., Amin D., Dalton N., Boutignon F., Lenaerts V., Wüthrich P. & Deghenghi R. (1994) Growth hormone-releasing activity of hexarelin in humans. A dose-response study. *Eur J Clin Pharmacol* 46, 421-5.
- Inui A. (2001) Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2, 551-60.
- Jacks T., Hickey G., Judith F., Taylor J., Chen H., Krupa D., Feeney W., Schoen W., Ok D. & Fisher M. (1994) Effects of acute and repeated intravenous administration of L-692,585, a novel non-peptidyl growth hormone secretagogue, on plasma growth hormone, IGF-1, ACTH, cortisol, prolactin, insulin, and thyroxine levels in beagles. *J Endocrinol* 143, 399-406.
- Jacks T., Smith R., Judith F., Schleim K., Frazier E., Chen H., Krupa D., Hora D., Nargund R., Patchett A. & Hickey G. (1996) MK-0677, a potent, novel, orally active growth hormone (GH) secretagogue: GH, insulin-like growth factor I, and other hormonal responses in beagles. *Endocrinology* 137, 5284-9.
- Joppa M.A., Gogas K.R., Foster A.C. & Markison S. (2007) Central infusion of the melanocortin receptor antagonist agouti-related peptide (AgRP(83-132)) prevents cachexia-related symptoms induced by radiation and colon-26 tumors in mice. *Peptides* 28, 636-42.
- Kamegai J., Tamura H., Shimizu T., Ishii S., Sugihara H. & Wakabayashi I. (2001) Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50, 2438-43.

- Karagiannides I., Torres D., Tseng Y.H., Bowe C., Carvalho E., Espinoza D., Pothoulakis C. & Kokkotou E. (2008) Substance P as a novel anti-obesity target. *Gastroenterology* 134, 747-55.
- Keen-Rhinehart E., Ondek K. & Schneider J.E. (2013) Neuroendocrine regulation of appetitive ingestive behavior. *Front Neurosci* 7, 213.
- Kim M.S., Namkoong C., Kim H.S., Jang P.G., Kim Pak Y.M., Katakami H., Park J.Y. & Lee K.U. (2004) Chronic central administration of ghrelin reverses the effects of leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 1264-71.
- Kobelt P., Helmling S., Stengel A., Wlotzka B., Andresen V., Klapp B.F., Wiedenmann B., Klussmann S. & Mönnikes H. (2006) Anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11 inhibits neurostimulatory and orexigenic effects of peripheral ghrelin in rats. *Gut* 55, 788-92.
- Kodama T., Ashitani J., Matsumoto N., Kangawa K. & Nakazato M. (2008) Ghrelin treatment suppresses neutrophil-dominant inflammation in airways of patients with chronic respiratory infection. *Pulm Pharmacol Ther* 21, 774-9.
- Kohno D., Gao H.Z., Muroya S., Kikuyama S. & Yada T. (2003) Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52, 948-56.
- Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H. & Kangawa K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-60.
- Kojima M., Hosoda H. & Kangawa K. (2001) Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm Res* 56 Suppl 1, 93-7.
- Kojima M. & Kangawa K. (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85, 495-522.
- Kopecký J., Hodný Z., Rossmeisl M., Srovný I. & Kozak L.P. (1996) Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am J Physiol* 270, E768-75.
- Kung D.W., Coffey S.B., Jones R.M., Cabral S., Jiao W., Fichtner M., Carpino P.A., Rose C.R., Hank R.F., Lopaze M.G., Swartz R., Chen H.T., Hendsch Z., Posner B., Wielis C.F., Manning B., Dubins J., Stock I.A., Varma S., Campbell M., DeBartola D., Kosa-Maines R., Steyn S.J. & McClure K.F. (2012) Identification of spirocyclic piperidine-azetidine inverse agonists of the ghrelin receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 4281-7.
- Kushner R.F. (2014) Weight loss strategies for treatment of obesity. *Prog Cardiovasc Dis* 56, 465-72.
- Langhans W. (2002) Peripheral mechanisms involved with catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 419-26.
- Leung P.K., Chow K.B., Lau P.N., Chu K.M., Chan C.B., Cheng C.H. & Wise H. (2007) The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cell Signal* 19, 1011-22.
- Leyris J.P., Roux T., Trinquet E., Verdié P., Fehrentz J.A., Oueslati N., Douzon S., Bourrier E., Lamarque L., Gagne D., Galleyrand J.C., M'kadmi C., Martinez J., Mary S., Banères J.L. & Marie J. (2011) Homogeneous time-resolved fluorescence-based assay to screen for ligands targeting the growth hormone secretagogue receptor type 1a. *Anal Biochem* 408, 253-62.
- Liu B., Liu G., Xin Z., Serby M.D., Zhao H., Schaefer V.G., Falls H.D., Kaszubska W., Collins C.A. & Sham H.L. (2004) Novel isoxazole carboxamides as growth

- hormone secretagogue receptor (GHS-R) antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 5223-6.
- Liu B., Liu M., Xin Z., Zhao H., Serby M.D., Kosogof C., Nelson L.T., Szczepankiewicz B.G., Kaszubska W., Schaefer V.G., Falls H.D., Lin C.W., Collins C.A., Sham H.L. & Liu G. (2006) Optimization of 2,4-diaminopyrimidines as GHS-R antagonists: side chain exploration. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 1864-8.
- Lundholm K., Gunnebo L., Körner U., Iresjö B.M., Engström C., Hylltander A., Smedh U. & Bosaeus I. (2010) Effects by daily long term provision of ghrelin to unselected weight-losing cancer patients: a randomized double-blind study. *Cancer* 116, 2044-52.
- Lutz T.A. & Woods S.C. (2012) Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 5, Unit5.61.
- Maixnerová J., Hlaváček J., Blokesová D., Kowalczyk W., Elbert T., Sanda M., Blechová M., Zelezná B., Slaninová J. & Maletínská L. (2007) Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides* 28, 1945-53.
- Malavolta L. & Cabral F.R. (2011) Peptides: important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides* 45, 309-16.
- Maletínská L., Matyšková R., Maixnerová J., Sýkora D., Pýchová M., Spolcová A., Blechová M., Drápalová J., Lacinová Z., Haluzík M. & Zelezná B. (2011) The Peptidic GHS-R antagonist [D-Lys(3)]GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *Mol Cell Endocrinol* 343, 55-62.
- Maletínská L., Pýchová M., Holubová M., Blechová M., Demianová Z., Elbert T. & Železná B. (2012) Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther* 340, 781-6.
- Martins L., Fernández-Mallo D., Novelle M.G., Vázquez M.J., Tena-Sempere M., Nogueiras R., López M. & Diéguez C. (2012) Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. *PLoS One* 7, e46923.
- Matsumoto M., Hosoda H., Kitajima Y., Morozumi N., Minamitake Y., Tanaka S., Matsuo H., Kojima M., Hayashi Y. & Kangawa K. (2001) Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 142-6.
- McClure K.F., Jackson M., Cameron K.O., Kung D.W., Perry D.A., Orr S.T., Zhang Y., Kohrt J., Tu M., Gao H., Fernando D., Jones R., Erasga N., Wang G., Polivkova J., Jiao W., Swartz R., Ueno H., Bhattacharya S.K., Stock I.A., Varma S., Bagdasarian V., Perez S., Kelly-Sullivan D., Wang R., Kong J., Cornelius P., Michael L., Lee E., Janssen A., Steyn S.J., Lapham K. & Goosen T. (2013) Identification of potent, selective, CNS-targeted inverse agonists of the ghrelin receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 5410-4.
- Mihalic J.T., Kim Y.J., Lizarzaburu M., Chen X., Deignan J., Wanska M., Yu M., Fu J., Zhang A., Connors R., Liang L., Lindstrom M., Ma J., Tang L., Dai K. & Li L. (2012) Discovery of a new class of ghrelin receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 2046-51.
- Morley J.E., Thomas D.R. & Wilson M.M. (2006) Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr* 83, 735-43.
- Morozumi N., Hanada T., Habara H., Yamaki A., Furuya M., Nakatsuka T., Inomata N., Minamitake Y., Ohsuye K. & Kangawa K. (2011) The role of C-terminal part of

- ghrelin in pharmacokinetic profile and biological activity in rats. *Peptides* 32, 1001-7.
- Motulsky H. & Neubig R. (2002) Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 7, Unit 7.5.
- Moulin A., Brunel L., Boeglin D., Demange L., Ryan J., M'Kadmi C., Denoyelle S., Martinez J. & Fehrentz J.A. (2013) The 1,2,4-triazole as a scaffold for the design of ghrelin receptor ligands: development of JMV 2959, a potent antagonist. *Amino Acids* 44, 301-14.
- Moulin A., Demange L., Bergé G., Gagne D., Ryan J., Mousseaux D., Heitz A., Perrissoud D., Locatelli V., Torsello A., Galleyrand J.C., Fehrentz J.A. & Martinez J. (2007a) Toward potent ghrelin receptor ligands based on trisubstituted 1,2,4-triazole structure. 2. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations. *J Med Chem* 50, 5790-806.
- Moulin A., Demange L., Ryan J., Mousseaux D., Sanchez P., Bergé G., Gagne D., Perrissoud D., Locatelli V., Torsello A., Galleyrand J.C., Fehrentz J.A. & Martinez J. (2008) New trisubstituted 1,2,4-triazole derivatives as potent ghrelin receptor antagonists. 3. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations. *J Med Chem* 51, 689-93.
- Moulin A., Ryan J., Martinez J. & Fehrentz J.A. (2007b) Recent developments in ghrelin receptor ligands. *ChemMedChem* 2, 1242-59.
- Muccioli G., Tschöp M., Papotti M., Deghenghi R., Heiman M. & Ghigo E. (2002) Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 440, 235-54.
- Müller T.D., Perez-Tilve D., Tong J., Pfluger P.T. & Tschöp M.H. (2010) Ghrelin and its potential in the treatment of eating/wasting disorders and cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 1, 159-67.
- Nagaya N., Itoh T., Murakami S., Oya H., Uematsu M., Miyatake K. & Kangawa K. (2005) Treatment of cachexia with ghrelin in patients with COPD. *Chest* 128, 1187-93.
- Nagaya N., Moriya J., Yasumura Y., Uematsu M., Ono F., Shimizu W., Ueno K., Kitakaze M., Miyatake K. & Kangawa K. (2004) Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation* 110, 3674-9.
- Nagaya N., Uematsu M., Kojima M., Date Y., Nakazato M., Okumura H., Hosoda H., Shimizu W., Yamagishi M., Oya H., Koh H., Yutani C. & Kangawa K. (2001a) Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 104, 2034-8.
- Nagaya N., Uematsu M., Kojima M., Ikeda Y., Yoshihara F., Shimizu W., Hosoda H., Hirota Y., Ishida H., Mori H. & Kangawa K. (2001b) Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 104, 1430-5.
- Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. & Matsukura S. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194-8.
- Nass R., Gaylinn B.D. & Thorner M.O. (2011) The ghrelin axis in disease: potential therapeutic indications. *Mol Cell Endocrinol* 340, 106-10.
- Nass R., Pezzoli S.S., Oliveri M.C., Patrie J.T., Harrell F.E., Clasey J.L., Heymsfield S.B., Bach M.A., Vance M.L. & Thorner M.O. (2008) Effects of an oral ghrelin

- mimetic on body composition and clinical outcomes in healthy older adults: a randomized trial. *Ann Intern Med* 149, 601-11.
- Neary N.M., Small C.J., Wren A.M., Lee J.L., Druce M.R., Palmieri C., Frost G.S., Ghatei M.A., Coombes R.C. & Bloom S.R. (2004) Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2832-6.
- O'Reilly B., Vander A.J. & Kluger M.J. (1988) Effects of chronic infusion of lipopolysaccharide on food intake and body temperature of the rat. *Physiol Behav* 42, 287-91.
- Otto B., Cuntz U., Fruehauf E., Wawarta R., Folwaczny C., Riepl R.L., Heiman M.L., Lehnert P., Fichter M. & Tschöp M. (2001) Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145, 669-73.
- Palus S., Schur R., Akashi Y.J., Bockmeyer B., Datta R., Halem H., Dong J., Culler M.D., Adams V., Anker S.D. & Springer J. (2011) Ghrelin and its analogues, BIM-28131 and BIM-28125, improve body weight and regulate the expression of MuRF-1 and MAFbx in a rat heart failure model. *PLoS One* 6, e26865.
- Pan L.C., Carpino P.A., Lefker B.A., Ragan J.A., Toler S.M., Pettersen J.C., Nettleton D.O., Ng O., Pirie C.M., Chidsey-Frink K., Lu B., Nickerson D.F., Tess D.A., Mullins M.A., MacLean D.B., DaSilva-Jardine P.A. & Thompson D.D. (2001) Preclinical pharmacology of CP-424,391, an orally active pyrazolinone-piperidine [correction of pyrazolidinone-piperidine] growth hormone secretagogue. *Endocrine* 14, 121-32.
- Pantel J., Legendre M., Cabrol S., Hilal L., Hajaji Y., Morisset S., Nivot S., Vie-Luton M.P., Grouselle D., de Kerdanet M., Kadiri A., Epelbaum J., Le Bouc Y. & Amselem S. (2006) Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 116, 760-8.
- Pasternak A., Goble S.D., deJesus R.K., Hreniuk D.L., Chung C.C., Tota M.R., Mazur P., Feighner S.D., Howard A.D., Mills S.G. & Yang L. (2009) Discovery and optimization of novel 4-[(aminocarbonyl)amino]-N-[4-(2-aminoethyl)phenyl]benzenesulfonamide ghrelin receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 6237-40.
- Patchett A.A., Nargund R.P., Tata J.R., Chen M.H., Barakat K.J., Johnston D.B., Cheng K., Chan W.W., Butler B. & Hickey G. (1995) Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7001-5.
- Patterson M., Bloom S.R. & Gardiner J.V. (2011) Ghrelin and appetite control in humans--potential application in the treatment of obesity. *Peptides* 32, 2290-4.
- Perdonà E., Faggioni F., Buson A., Sabbatini F.M., Corti C. & Corsi M. (2011) Pharmacological characterization of the ghrelin receptor antagonist, GSK1614343 in rat RC-4B/C cells natively expressing GHS type 1a receptors. *Eur J Pharmacol* 650, 178-83.
- Perello M., Scott M.M., Sakata I., Lee C.E., Chuang J.C., Osborne-Lawrence S., Rovinsky S.A., Elmquist J.K. & Zigman J.M. (2012) Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *J Comp Neurol* 520, 281-94.
- Petersen P.S., Woldbye D.P., Madsen A.N., Egerod K.L., Jin C., Lang M., Rasmussen M., Beck-Sickinger A.G. & Holst B. (2009) In vivo characterization of high Basal signaling from the ghrelin receptor. *Endocrinology* 150, 4920-30.

- Piccoli F., Degen L., MacLean C., Peter S., Baselgia L., Larsen F., Beglinger C. & Drewe J. (2007) Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of an oral ghrelin agonist in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1814-20.
- Pirnik Z., Bundziková J., Holubová M., Pýchová M., Fehrentz J.A., Martinez J., Zelezná B., Maletínská L. & Kiss A. (2011) Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. *Neurochem Int* 59, 889-95.
- Plata-Salamán C.R., Oomura Y. & Kai Y. (1988) Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res* 448, 106-14.
- Puleo L., Marini P., Avallone R., Zanchet M., Bandiera S., Baroni M. & Croci T. (2012) Synthesis and pharmacological evaluation of indolinone derivatives as novel ghrelin receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* 20, 5623-36.
- Raun K., Hansen B.S., Johansen N.L., Thøgersen H., Madsen K., Ankersen M. & Andersen P.H. (1998) Ipamorelin, the first selective growth hormone secretagogue. *Eur J Endocrinol* 139, 552-61.
- Rogers P.J. & Blundell J.E. (1984) Meal patterns and food selection during the development of obesity in rats fed a cafeteria diet. *Neurosci Biobehav Rev* 8, 441-53.
- Rubinfeld H., Hadani M., Taylor J.E., Dong J.Z., Comstock J., Shen Y., DeOliveira D., Datta R., Culler M.D. & Shimon I. (2004) Novel ghrelin analogs with improved affinity for the GH secretagogue receptor stimulate GH and prolactin release from human pituitary cells. *Eur J Endocrinol* 151, 787-95.
- Rudolph J., Esler W.P., O'connor S., Coish P.D., Wickens P.L., Brands M., Bierer D.E., Bloomquist B.T., Bondar G., Chen L., Chuang C.Y., Claus T.H., Fathi Z., Fu W., Khire U.R., Kristie J.A., Liu X.G., Lowe D.B., McClure A.C., Michels M., Ortiz A.A., Ramsden P.D., Schoenleber R.W., Shelekhin T.E., Vakalopoulos A., Tang W., Wang L., Yi L., Gardell S.J., Livingston J.N., Sweet L.J. & Bullock W.H. (2007) Quinazolinone derivatives as orally available ghrelin receptor antagonists for the treatment of diabetes and obesity. *J Med Chem* 50, 5202-16.
- Sabbatini F.M., Di Fabio R., Corsi M., Cavanni P., Bromidge S.M., St-Denis Y., D'Adamo L., Contini S., Rinaldi M., Guery S., Savoia C., Mundi C., Perini B., Carpenter A.J., Dal Forno G., Faggioni F., Tessari M., Pavone F., Di Francesco C., Buson A., Mattioli M., Perdonà E. & Melotto S. (2010) Discovery process and characterization of novel carbonylhydrazide derivatives as potent and selective GHSR1a antagonists. *ChemMedChem* 5, 1450-5.
- Sabbatini F.M., Melotto S., Bernasconi G., Bromidge S.M., D'Adamo L., Rinaldi M., Savoia C., Mundi C., Di Francesco C., Zonzini L., Costantini V.J., Perini B., Valerio E., Pozzan A., Perdonà E., Visentini F., Corsi M. & Di Fabio R. (2011) Azabicyclo[3.1.0]hexane-1-carbonylhydrazides as potent and selective GHSR1a ligands presenting a specific in vivo behavior. *ChemMedChem* 6, 1981-5.
- Salomé N., Haage D., Perrissoud D., Moulin A., Demange L., Egecioglu E., Fehrentz J.A., Martinez J. & Dickson S.L. (2009a) Anorexigenic and electrophysiological actions of novel ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonists in rats. *Eur J Pharmacol* 612, 167-73.
- Salomé N., Hansson C., Taube M., Gustafsson-Ericson L., Egecioglu E., Karlsson-Lindahl L., Fehrentz J.A., Martinez J., Perrissoud D. & Dickson S.L. (2009b) On the central mechanism underlying ghrelin's chronic pro-obesity effects in rats: new insights from studies exploiting a potent ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonist. *J Neuroendocrinol*.

- Sam A.H., Troke R.C., Tan T.M. & Bewick G.A. (2012) The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* 63, 46-56.
- Scerif M., Goldstone A.P. & Korbonits M. (2011) Ghrelin in obesity and endocrine diseases. *Mol Cell Endocrinol* 340, 15-25.
- Serby M.D., Zhao H., Szczepankiewicz B.G., Kosogof C., Xin Z., Liu B., Liu M., Nelson L.T., Kaszubska W., Falls H.D., Schaefer V., Bush E.N., Shapiro R., Droz B.A., Knourek-Segel V.E., Fey T.A., Brune M.E., Beno D.W., Turner T.M., Collins C.A., Jacobson P.B., Sham H.L. & Liu G. (2006) 2,4-diaminopyrimidine derivatives as potent growth hormone secretagogue receptor antagonists. *J Med Chem* 49, 2568-78.
- Shearman L.P., Wang S.P., Helmling S., Stribling D.S., Mazur P., Ge L., Wang L., Klusmann S., Macintyre D.E., Howard A.D. & Strack A.M. (2006) Ghrelin neutralization by a ribonucleic acid-SPM ameliorates obesity in diet-induced obese mice. *Endocrinology* 147, 1517-26.
- Shiiba T., Nakazato M., Mizuta M., Date Y., Mondal M.S., Tanaka M., Nozoe S., Hosoda H., Kangawa K. & Matsukura S. (2002) Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 240-4.
- Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Miyanaga F., Takaya K., Hayashi T., Inoue G., Hosoda K., Kojima M., Kangawa K. & Nakao K. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50, 227-32.
- Skibicka K.P., Hansson C., Egecioglu E. & Dickson S.L. (2012) Role of ghrelin in food reward: impact of ghrelin on sucrose self-administration and mesolimbic dopamine and acetylcholine receptor gene expression. *Addict Biol* 17, 95-107.
- Small C.J., Kim M.S., Stanley S.A., Mitchell J.R., Murphy K., Morgan D.G., Ghatgei M.A. & Bloom S.R. (2001) Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 50, 248-54.
- Smith R.G., Van der Ploeg L.H., Howard A.D., Feighner S.D., Cheng K., Hickey G.J., Wyratt M.J., Fisher M.H., Nargund R.P. & Patchett A.A. (1997) Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 18, 621-45.
- Sobrinho Crespo C., Perianes Cachero A., Puebla Jiménez L., Barrios V. & Arilla Ferreira E. (2014) Peptides and Food Intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 58.
- Soriano-Guillén L., Barrios V., Campos-Barros A. & Argente J. (2004) Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* 144, 36-42.
- Stanley S., Wynne K., McGowan B. & Bloom S. (2005) Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 85, 1131-58.
- Stevanovic D., Trajkovic V., Müller-Lüthloff S., Brandt E., Abplanalp W., Bumke-Vogt C., Liehl B., Wiedmer P., Janjetovic K., Starcevic V., Pfeiffer A.F., Al-Hasani H., Tschöp M.H. & Castañeda T.R. (2013) Ghrelin-induced food intake and adiposity depend on central mTORC1/S6K1 signaling. *Mol Cell Endocrinol* 381, 280-90.
- Strassburg S., Anker S.D., Castaneda T.R., Burget L., Perez-Tilve D., Pfluger P.T., Nogueiras R., Halem H., Dong J.Z., Culler M.D., Datta R. & Tschöp M.H.

- (2008) Long-term effects of ghrelin and ghrelin receptor agonists on energy balance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E78-84.
- Strasser F., Lutz T.A., Maeder M.T., Thuerlimann B., Bueche D., Tschöp M., Kaufmann K., Holst B., Brändle M., von Moos R., Demmer R. & Cerny T. (2008) Safety, tolerability and pharmacokinetics of intravenous ghrelin for cancer-related anorexia/cachexia: a randomised, placebo-controlled, double-blind, double-crossover study. *Br J Cancer* 98, 300-8.
- Suchankova P., Steensland P., Fredriksson I., Engel J.A. & Jerlhag E. (2013) Ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonism suppresses both alcohol consumption and the alcohol deprivation effect in rats following long-term voluntary alcohol consumption. *PLoS One* 8, e71284.
- Takaya K., Ariyasu H., Kanamoto N., Iwakura H., Yoshimoto A., Harada M., Mori K., Komatsu Y., Usui T., Shimatsu A., Ogawa Y., Hosoda K., Akamizu T., Kojima M., Kangawa K. & Nakao K. (2000) Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4908-11.
- Taylor M.S., Hwang Y., Hsiao P.Y., Boeke J.D. & Cole P.A. (2012) Ghrelin O-acyltransferase assays and inhibition. *Methods Enzymol* 514, 205-28.
- Theander-Carrillo C., Wiedmer P., Cettour-Rose P., Nogueiras R., Perez-Tilve D., Pfluger P., Castaneda T.R., Muzzin P., Schürmann A., Szanto I., Tschöp M.H. & Rohner-Jeanrenaud F. (2006) Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 116, 1983-93.
- Tisdale M.J. (2002) Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2, 862-71.
- Traebert M., Riediger T., Whitebread S., Scharrer E. & Schmid H.A. (2002) Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* 14, 580-6.
- Tschöp M. & Heiman M.L. (2002) Overview of rodent models for obesity research. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 9, Unit 9.10.
- Tschöp M., Smiley D.L. & Heiman M.L. (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-13.
- Tschöp M., Wawarta R., Riepl R.L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R. & Folwaczny C. (2001a) Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24, RC19-21.
- Tschöp M., Weyer C., Tataranni P.A., Devanarayan V., Ravussin E. & Heiman M.L. (2001b) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50, 707-9.
- Tsubone T., Masaki T., Katsuragi I., Tanaka K., Kakuma T. & Yoshimatsu H. (2005) Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regul Pept* 130, 97-103.
- Van Craenenbroeck M., Gregoire F., De Neef P., Robberecht P. & Perret J. (2004) Alascan of ghrelin (1-14): interaction with the recombinant human ghrelin receptor. *Peptides* 25, 959-65.
- van der Lely A.J., Tschöp M., Heiman M.L. & Ghigo E. (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25, 426-57.
- Velásquez D.A., Martínez G., Romero A., Vázquez M.J., Boit K.D., Dopeso-Reyes I.G., López M., Vidal A., Nogueiras R. & Diéguez C. (2011) The central Sirtuin 1/p53 pathway is essential for the orexigenic action of ghrelin. *Diabetes* 60, 1177-85.
- Verhagen L.A., Egecioglu E., Luijendijk M.C., Hillebrand J.J., Adan R.A. & Dickson S.L. (2011) Acute and chronic suppression of the central ghrelin signaling

- system reveals a role in food anticipatory activity. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, 384-92.
- Vizcarra J.A., Kirby J.D., Kim S.K. & Galyean M.L. (2007) Active immunization against ghrelin decreases weight gain and alters plasma concentrations of growth hormone in growing pigs. *Domest Anim Endocrinol* 33, 176-89.
- Waseem T., Duxbury M., Ito H., Ashley S.W. & Robinson M.K. (2008) Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery* 143, 334-42.
- Wisser A.S., Habel P., Wiedenmann B., Klapp B.F., Mönnikes H. & Kobelt P. (2010) Interactions of gastrointestinal peptides: ghrelin and its anorexigenic antagonists. *Int J Pept* 2010.
- Woods A., Dickerson K., Heath R., Hong S.P., Momcilovic M., Johnstone S.R., Carlson M. & Carling D. (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2, 21-33.
- Wren A.M., Seal L.J., Cohen M.A., Brynes A.E., Frost G.S., Murphy K.G., Dhillon W.S., Ghatei M.A. & Bloom S.R. (2001a) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5992.
- Wren A.M., Small C.J., Abbott C.R., Dhillon W.S., Seal L.J., Cohen M.A., Batterham R.L., Taheri S., Stanley S.A., Ghatei M.A. & Bloom S.R. (2001b) Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50, 2540-7.
- Wynne K., Giannitsopoulou K., Small C.J., Patterson M., Frost G., Ghatei M.A., Brown E.A., Bloom S.R. & Choi P. (2005a) Subcutaneous ghrelin enhances acute food intake in malnourished patients who receive maintenance peritoneal dialysis: a randomized, placebo-controlled trial. *J Am Soc Nephrol* 16, 2111-8.
- Wynne K., Stanley S., McGowan B. & Bloom S. (2005b) Appetite control. *J Endocrinol* 184, 291-318.
- Xin Z., Serby M.D., Zhao H., Kosogof C., Szczepankiewicz B.G., Liu M., Liu B., Hutchins C.W., Sarris K.A., Hoff E.D., Falls H.D., Lin C.W., Ogiela C.A., Collins C.A., Brune M.E., Bush E.N., Droz B.A., Fey T.A., Knourek-Segel V.E., Shapiro R., Jacobson P.B., Beno D.W., Turner T.M., Sham H.L. & Liu G. (2006) Discovery and pharmacological evaluation of growth hormone secretagogue receptor antagonists. *J Med Chem* 49, 4459-69.
- Xin Z., Zhao H., Serby M.D., Liu B., Schaefer V.G., Falls D.H., Kaszubska W., Colins C.A., Sham H.L. & Liu G. (2005) Synthesis and structure-activity relationships of isoxazole carboxamides as growth hormone secretagogue receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 15, 1201-4.
- Xu X.B., Pang J.J., Cao J.M., Ni C., Xu R.K., Peng X.Z., Yu X.X., Guo S., Chen M.C. & Chen C. (2005) GH-releasing peptides improve cardiac dysfunction and cachexia and suppress stress-related hormones and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H1643-51.
- Yang J., Brown M.S., Liang G., Grishin N.V. & Goldstein J.L. (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132, 387-96.
- Ye Z., Gao Y., Bakshi R.K., Chen M.H., Rohrer S.P., Feighner S.D., Pong S.S., Howard A.D., Blake A., Birzin E.T., Locco L., Parmar R.M., Chan W.W., Schaeffer J.M., Smith R.G., Patchett A.A. & Nargund R.P. (2000) Modeling directed design and biological evaluation of quinazolinones as non-peptidic growth hormone secretagogues. *Bioorg Med Chem Lett* 10, 5-8.

- Yin Y., Li Y. & Zhang W. (2014) The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci* 15, 4837-55.
- Yu M., Lizarzaburu M., Beckmann H., Connors R., Dai K., Haller K., Li C., Liang L., Lindstrom M., Ma J., Motani A., Wanska M., Zhang A., Li L. & Medina J.C. (2010) Identification of piperazine-bisamide GHSR antagonists for the treatment of obesity. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 1758-62.
- Zakhari J.S., Zorrilla E.P., Zhou B., Mayorov A.V. & Janda K.D. (2012) Oligoclonal antibody targeting ghrelin increases energy expenditure and reduces food intake in fasted mice. *Mol Pharm* 9, 281-9.
- Zhao H. & Liu G. (2006) Growth hormone secretagogue receptor antagonists as anti-obesity therapies? Still an open question. *Curr Opin Drug Discov Devel* 9, 509-15.
- Zhao H., Xin Z., Liu G., Schaefer V.G., Falls H.D., Kaszubska W., Collins C.A. & Sham H.L. (2004) Discovery of tetralin carboxamide growth hormone secretagogue receptor antagonists via scaffold manipulation. *J Med Chem* 47, 6655-7.
- Zhao H., Xin Z., Patel J.R., Nelson L.T., Liu B., Szczepankiewicz B.G., Schaefer V.G., Falls H.D., Kaszubska W., Collins C.A., Sham H.L. & Liu G. (2005) Structure-activity relationship studies on tetralin carboxamide growth hormone secretagogue receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 15, 1825-8.
- Zigman J.M., Nakano Y., Coppari R., Balthasar N., Marcus J.N., Lee C.E., Jones J.E., Deysher A.E., Waxman A.R., White R.D., Williams T.D., Lachey J.L., Seeley R.J., Lowell B.B. & Elmquist J.K. (2005) Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115, 3564-72.
- Zorrilla E.P., Iwasaki S., Moss J.A., Chang J., Otsuji J., Inoue K., Meijler M.M. & Janda K.D. (2006) Vaccination against weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13226-31.

WEBOVÉ STRÁNKY

- researchsarms.co.uk

MK-677 (Ibutamoren). © ResearchSARMS. Citováno 20.6.2014.

Dostupné z <http://researchsarms.co.uk/mk-677-ibutamoren>.

- www.chemicalbook.com

Anamorelin. © ChemicalBook 2010. Citováno 20.6.2014.

Dostupné z

http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB21518492.htm.

- www.aezsinc.com

Products on the market. © Æterna Zentaris Inc. 2004. Citováno 20.6.2014.

Dostupné z <http://www.aezsinc.com/en/page.php?p=20>.

- www.sukl.cz

Databáze léků. © SÚKL 2010. Citováno 20.6.2014

Dostupné z <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Publikace týkající se tématu dizertační práce (s IF):

1. Pirník Z., Bundzíková J., **Holubová M.**, Pýchová M., Fehrentz J.A., Martinez J., Železná B., Maletínská L., Kiss A. (2011) Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. *Neurochem Int* 59(6), 889-95. **IF = 2.659.**
2. Maletínská L., Pýchová M., **Holubová M.**, Blechová M., Demianová Z., Elbert T., Železná B. (2012) Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther* 340(3), 781-6. **IF = 3.891.**
3. **Holubová M.**, Špolcová A., Demianová Z., Sýkora D., Fehrentz J.A., Martinez J., Štofková A., Jurčovičová J., Drápalová J., Lacinová Z., Haluzík M., Železná B., Maletínská L. (2013) Ghrelin agonist JMV 1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice. *Physiol Res* 62(4), 435-44. **IF = 1.531.**
4. **Holubová M.**, Nagelová V., Lacinová Z., Haluzík M., Sýkora D., Moulin A., Blayo A.L., Fehrentz J.A., Martinez J., Štofková A., Jurčovičová J., Železná B., Maletínská L. (2014) Triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 attenuate food intake, body weight, and adipose tissue mass in mice. *Mol Cell Endocrinol*, DOI: 10.1016/j.mce.2014.06.003 (In Press). **IF = 4.039.**
5. Pirník Z., Majerčíková Z., **Holubová M.**, Pirník R., Železná B., Maletínská L., Kiss A. (2014) Effect of ghrelin receptor agonist and antagonist on the activity of arcuate nucleus tyrosine hydroxylase containing neurons in C57BL/6 male mice exposed to normal or high fat diet. *J Physiol Pharmacol* 65(4) (In Press). **IF = 2.476.**

Publikace týkající se jiných témat (s IF):

1. Špolcová A., **Holubová M.**, Mikulášková B., Nagelová V., Štofková A., Lacinová Z., Jurčovičová J., Haluzík M., Maletínská L., Železná B. (2014) Changes in FGF21 serum concentrations and liver mRNA expression in an experimental model of complete lipodystrophy and insulin-resistant diabetes. *Physiol Res* 2014 (In Press). **IF = 1.531.**

Patenty:

PV 2014-429 (Dlouhodobě působící stabilní analogy ghrelinu k léčbě kachexie)

Maletínská L., Železná B., Kuneš J., **Holubová M.**, Zemenová J.

Patentová přihláška podána v červnu 2014.

PŘÍLOHY

Příloha 1:

Maletínská L., Pýchová M., Holubová M., Blechová M., Demianová Z., Elbert T., Železná B. (2012) Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther* 340(3), 781-6.

Příloha 2:

Holubová M., Špolcová A., Demianová Z., Sýkora D., Fehrentz J.A., Martinez J., Štofková A., Jurčovičová J., Drápalová J., Lacinová Z., Haluzík M., Železná B., Maletínská L. (2013) Ghrelin agonist JMV 1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice. *Physiol Res* 62(4), 435-44.

Příloha 3

Holubová M., Nagelová V., Lacinová Z., Haluzík M., Sýkora D., Moulin A., Blayo A.L., Fehrentz J.A., Martinez J., Štofková A., Jurčovičová J., Železná B., Maletínská L. (2014) Triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 attenuate food intake, body weight, and adipose tissue mass in mice. *Mol Cell Endocrinol*, DOI: 10.1016/j.mce.2014.06.003 (In Press).

Characterization of New Stable Ghrelin Analogs with Prolonged Orexigenic Potency

Lenka Maletínská, Miroslava Pýchová, Martina Holubová, Miroslava Blechová,
Zuzana Demianová, Tomáš Elbert, and Blanka Železná

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Received June 22, 2011; accepted December 16, 2011

ABSTRACT

Ghrelin, the only known peripherally produced and centrally acting peptide that stimulates food intake, is synthesized primarily in the stomach and acts through the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a). In addition to its orexigenic effect, ghrelin stimulates the release of growth hormone (GH). In this study, we investigated the biological properties of full-length and shortened ghrelin analogs in which octanoylated Ser³ is replaced with an octanoic acid moiety coupled to diamino propionic acid (Dpr). Ghrelin analogs stabilized with Dpr(*N*-octanoyl) in position 3 and noncoded amino acids in position 1 (sarcosine) and/or position 4 (naphthylalanine or cyclohexylalanine) were found to possess affinities similar to

those of ghrelin for cell membranes with transfected GHS-R1a. In vivo, the prolonged orexigenic effects of analogs containing Dpr(*N*-octanoyl)³ compared with that of ghrelin in adult mice and a similar impact on GH secretion in young mice were found. Full-length [Dpr(*N*-octanoyl)³]ghrelin and its analogs with a noncoded amino acid in position 1 and/or 4 showed significantly prolonged stability in blood plasma compared with that of ghrelin. Ghrelin analogs with a prolonged orexigenic effect are potential treatments for GH deficiency or cachexia that accompanies chronic diseases. Desoctanoylated ghrelin analogs and N-terminal penta- and octapeptides of ghrelin did not show any biological activity.

Introduction

Ghrelin is the only known hormone synthesized in the gut and acting centrally that possesses an orexigenic effect (for reviews, see Depoortere, 2009; Castañeda et al., 2010; Wisser et al., 2010; Briggs and Andrews, 2011; Nass et al., 2011; Scerif et al., 2011). In the adenohypophysis, ghrelin releases Ca²⁺ from intracellular stores that stimulates and amplifies pulsatile secretion of growth hormone (GH) (Smith et al., 1997). Therefore, the term growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) is used for the ghrelin receptor. In the arcuate nucleus of the hypothalamus, ghrelin implements its orexigenic effect in neurons that express the most powerful neuropeptide, orexigenic neuropeptide Y (Kohn et al., 2003).

Ghrelin is the only hormone containing a serine acylated with *n*-octanoic acid, which is necessary for its biological activity (Kojima et al., 1999). The ester bond of Ser³ is hydrolyzed easily by esterases in the blood; therefore, only 10 to 20% of circulating ghrelin is octanoylated (Depoortere, 2009).

Although octanoylation is necessary for ghrelin's biological activity, the link between octanoic acid and ghrelin can be modified. When octanoic acid was connected to the peptide backbone of ghrelin by an amide (Bednarek et al., 2000), thioether, or ether bond (Matsumoto et al., 2001a), neither the binding potency nor the calcium release in the cells with transfected GHS-R1a was affected.

In vitro structure-activity studies in cells that overexpress the ghrelin receptor reveal that an N-terminal tetrapeptide with an octanoyl group in position 3 is the minimal core of ghrelin that is necessary for biological activity (Bednarek et al., 2000; Matsumoto et al., 2001a,b; Torsello et al., 2002). An alanine scan of 14 amino acids at the N terminus of ghrelin showed that, in addition to octanoylation at position 3, an N-terminal positive charge and Phe⁴ are essential for the biological activity of ghrelin (Van Craenenbroeck et al., 2004). However, the C-terminal part of ghrelin was shown to be important for the stability of ghrelin in in vivo testing (Morozumi et al., 2011).

On the basis of the structure-activity studies mentioned above, ghrelin analogs with potentially enhanced stability were designed in this study. Initially, ghrelin was modified by replacing the serine in position 3 with diamino propionic acid (Dpr), which can form a stable amide bond with octanoyl

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic [Grant 303/09/0744]; and the Academy of Sciences of the Czech Republic [Grant Z40550506].

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.

<http://dx.doi.org/10.1124/jpet.111.185371>.

ABBREVIATIONS: GH, growth hormone; Cha, cyclohexylalanine; Dpr, diamino propionic acid; ghr, ghrelin; GHS-R1a, growth hormone secretagogue receptor; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; Nal, naphthylalanine, Sar sarcosine.

acid [Dpr(*N*-octanoyl)] (according to Bednarek et al., 2000) and protect the molecule from hydrolysis by esterases. Subsequently, *N*-terminal glycine and Phe⁴ were replaced with noncoded amino acids to protect the analogs against the activity of aminopeptidases or chymotrypsin-like proteinases, respectively. The designed analogs of ghrelin were examined for their affinities to cell membranes with transfected GHS-R1a (Guerlavais et al., 2003), orexigenic effects in adult mice, GH secretagogue activities in young mice, and stabilities in blood plasma. In addition, desoctanoylated and shorter *N*-terminal analogs of ghrelin were tested similarly in the hope of obtaining a shorter active ghrelin analog.

We aimed to design peptidic ghrelin agonists with a biological activity similar to and a higher stability than ghrelin. Such substances could have a prolonged effect in the treatment of cachexia and sarcopenia.

Materials and Methods

Synthesis of Peptides. Mouse ghrelin (ghr) [Gly-Ser-Ser(*O*-octanoyl)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg], [Dpr(*N*-octanoyl)³]ghrelin ([Dpr³]ghr), their full-length analogs with a C-terminal COOH, and *N*-terminal penta- and octapeptides amidated at the C terminus (Table 1) were assembled in a solid-phase ABI433A synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA) by stepwise coupling of the corresponding fluorenylmethyloxycarbonyl amino acids to the growing chain on Rink amide resin (1% divinylbenzene, 200–400 mesh, 0.65 mmol/g) or Wang resin (1% divinylbenzene, 100–200 mesh, 0.57 mmol/g) (both from IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany). The fully protected peptides were synthesized, and the peptides were purified and analyzed according to a standard procedure (Maixnerová et al., 2007). Octanoylation of Ser³ and Dpr³ was performed using a trityl group to protect the side chain of Ser³ and a methyltrityl group to protect the side chain of Dpr³, as described in the literature (Bednarek et al., 2000).

Ghrelin and [Dpr³]ghr were iodinated at His⁹ with either Na^[125I] or nonradioactive NaI using IODO-GEN (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)-coated Eppendorf tubes according to a published procedure (Elbert and Veselá, 2010). The purification was accomplished on an Agilent Prep-C18 5 μ column (250 \times 4.6 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), a gradient elution from 10% B to

20% B over 5 min and next to 30% B in 60 min (A = water with 0.1% trifluoroacetic acid, B = acetonitrile with 0.1% of trifluoroacetic acid). The nonradioactive iodinated peptides were used as the control for molecular weights using MALDI-TOF Reflex IV mass spectrometry (Bruker Daltonics, Billerica, MA). The specific activity of the [^{125I}]ghr or [^{125I}][Dpr³]ghr was approximately 2000 Ci/mmol. Aliquots of the purified radiolabeled peptides were evaporated to dryness and kept at –20°C. Radiolabeled peptides were used for binding studies within 1 month.

Receptor Binding Studies. Binding studies were performed as described in the literature (Guerlavais et al., 2003). In brief, isolated plasma membranes from LLC PK-1 cells with transfected human GHS-R1a (10 μ g of protein per tube) were used. Cell membranes were incubated with 0.5 to 6 nM [^{125I}]ghr or [^{125I}][Dpr³]ghr in saturation experiments and with 0.05 nM [^{125I}]ghr and 1 pM to 0.1 mM nonradioactive ligand in competitive binding experiments. Incubations were performed in a total volume of 0.5 ml of binding buffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, and 0.1% bovine serum albumin) for 45 min at 25°C. Nonspecific binding was determined in the presence of 10 μ M ghrelin. The binding reaction was stopped by the addition of ice-cold washing buffer [20 mM Tris (pH 7.4), 5 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, and 0.015% Triton 20] followed by rapid filtration over GF/C filters (Whatman, Clifton, NJ) presoaked with 0.5% polyethyleneimine using a Brandel cell harvester (Brandel Inc., Gaithersburg, MD). Filters were rinsed subsequently three times with ice-cold washing buffer. Bound radioactivity was determined by gamma counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA). Nonspecific binding amounted to <15% of the total binding. Experiments were carried out in duplicate at least three times.

Experimental Animals. All of the experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and Czech Republic law 246/1992 and were approved by the committee for experiments with laboratory animals of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Inbred C57BL/6 male mice (AnLab, Prague, Czech Republic) were housed at a temperature of 23°C under a daily cycle of 12 h of light and dark (light from 6:00 AM) with free access to water and a standard chow diet that contained 25%, 9%, and 66% of calories from protein, fat, and carbohydrate, respectively. The energy content of the diet was 3.4 kcal/g (St-1; Mlýn Kocanda, Jesenice, Czech Republic).

Effect of Ghrelin Analogs on Food Intake. Twelve-week-old mice were placed into separate cages for 1 week with free access to water and food pellets. For the evaluation of the orexigenic activity of

TABLE 1

Structures and biological properties of ghrelin analogs

Xxx-Ser-Yyy-Zzz-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg. Mean \pm S.E.M. of at least three separate experiments. K_i was calculated using the Cheng-Prusoff equation (Cheng and Prusoff, 1973) ($K_i = 0.44 \pm 0.12$ nM from the saturation binding experiment). For the calculation of ED₅₀ \pm S.E.M., food intake 250 min after the subcutaneous administration of analogs in doses of 0.1 to 10 mg/kg (maximal effect) was examined. $n = 5$ –6 mice per group.

| No. | Compound | No. aa | Xxx | Yyy | Zzz | Binding Assay ([^{125I}]ghr displacement) K_i | Orexigenic Effect ED ₅₀ |
|-----|--|--------|-----|---------------------|-----|---|------------------------------------|
| | | | | | | | <i>M</i> mg/kg |
| 1 | Ghrelin | 28 | Gly | Ser(<i>O</i> -oct) | Phe | $(3.67 \pm 1.05) \times 10^{-9}$ | 2.39 ± 1.07 |
| 2 | [Dpr ³]ghr | 28 | Gly | Dpr(<i>N</i> -oct) | Phe | $(3.28 \pm 1.03) \times 10^{-9}$ | 0.82 ± 0.37 |
| 3 | [Sar ¹ ,Dpr ³]ghr | 28 | Sar | Dpr(<i>N</i> -oct) | Phe | $(2.56 \pm 1.64) \times 10^{-9}$ | 0.65 ± 0.29 |
| 4 | [Dpr ³ ,Nal ⁴]ghr | 28 | Gly | Dpr(<i>N</i> -oct) | Nal | $(4.89 \pm 0.94) \times 10^{-10}$ | 1.13 ± 0.51 |
| 5 | [Sar ¹ ,Dpr ³ ,Nal ⁴]ghr | 28 | Sar | Dpr(<i>N</i> -oct) | Nal | $(3.22 \pm 1.15) \times 10^{-10}$ | 1.27 ± 0.57 |
| 6 | [Dpr ³ ,Cha ⁴]ghr | 28 | Gly | Dpr(<i>N</i> -oct) | Cha | $(1.67 \pm 0.31) \times 10^{-9}$ | 0.35 ± 0.16 |
| 7 | [Sar ¹ ,Dpr ³ ,Cha ⁴]ghr | 28 | Sar | Dpr(<i>N</i> -oct) | Cha | $(2.70 \pm 1.42) \times 10^{-9}$ | 4.63 ± 2.07 |
| 8 | Ghr(1–5) | 5 | Gly | Ser(<i>O</i> -oct) | Phe | $(1.83 \pm 1.16) \times 10^{-6}$ | No effect |
| 9 | [Dpr ³]ghr(1–5) | 5 | Gly | Dpr(<i>N</i> -oct) | Phe | $(1.93 \pm 0.65) \times 10^{-6}$ | No effect |
| 10 | [Sar ¹ ,Dpr ³]ghr(1–5) | 5 | Sar | Dpr(<i>N</i> -oct) | Phe | NT | No effect |
| 11 | [Dpr ³]ghr(1–8) | 8 | Gly | Dpr(<i>N</i> -oct) | Phe | NT | No effect |
| 12 | [Sar ¹ ,Dpr ³]ghr(1–8) | 8 | Sar | Dpr(<i>N</i> -oct) | Phe | $(3.24 \pm 1.68) \times 10^{-6}$ | No effect |
| 13 | [Trp ³]ghr(1–5) | 5 | Gly | Trp | Phe | $>10^{-5}$ | No effect |
| 14 | [Nal ³]ghr(1–5) | 5 | Gly | Nal | Phe | $>10^{-5}$ | No effect |
| 15 | desoct ghr | 28 | Gly | Ser | Phe | $>10^{-5}$ | No effect |
| 16 | desoct [Dpr ³]ghr | 28 | Gly | Dpr | Phe | $>10^{-5}$ | No effect |

NT, not tested.

peptides, mice were fed freely before the experiment. Anorexigenic activity was tested in mice that fasted for 17 h. The experiment started at 8:00 AM, and mice were injected subcutaneously with 0.2 ml of saline or the tested compounds (dissolved in saline) at a dose of 0.1 to 10 mg/kg ($n = 5-6$ mice per group). Fifteen minutes after the injection, mice were given preweighed food pellets. Food intake was followed for 6 h. The pellets were weighed at 30-min intervals and then returned to the cage, and cumulative food intake was registered. Animals had free access to water during the experiments.

GH Assay. The effects of selected ghrelin analogs on GH release was determined in 6-week-old male C57BL/6 mice. At 8:00 AM, fed mice were injected subcutaneously with 0.2 ml of the tested compounds (dissolved in saline) at a dose of 5 mg/kg ($n = 4-5$ mice per group). Ten or 30 min after the injection, blood was collected, and the plasma was separated and stored at -20°C until being used. GH in the plasma samples was determined with a radioimmunoassay kit (IZOTOP, Budapest, Hungary) according to the protocol recommended by the manufacturer.

Degradation of Ghrelin Analogs by Mouse Plasma. Ghrelin and selected ghrelin analogs at a concentration of $1\ \mu\text{M}$ in plasma from 12-week-old mice were incubated at 37°C for various time periods. Incubation was stopped by quick freezing to -20°C . After being thawed, samples were kept at 4°C throughout the following procedures. They were filtered through YM-10 ultrafiltration membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA) by centrifugation at 4°C for 20 min at $16,000 \times g$. The filters were washed three times with 0.1% formic acid, and the filtrates were lyophilized subsequently. The samples were reconstituted with 0.1% formic acid up to the original volume of plasma for subsequent liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis. Chromatographic separation was achieved on an ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1×150 mm), packed with $1.7\text{-}\mu\text{m}$ particles (Waters, Milford, MA). The sample injection volume was $10\ \mu\text{l}$. The separation was performed using a linear gradient of 95% solvent A in solvent B to 100% solvent B over 20 min [solvent A consisted of $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrile}$, 98:2 (v/v), with 0.1% formic acid; solvent B was acetonitrile]. The flow rate was $100\ \mu\text{l}/\text{min}$ and was generated with a Rheos 2200 pump system (Flux Instruments, Reinach, Switzerland) equipped with an HTS-PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Mass detection was performed using an LTQ Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) using electrospray ionization in positive mode. Electrospray ionization parameters were as follows: sheath gas flow rate, 25 arb; auxiliary gas flow rate, 5 arb; capillary temperature, 275°C ; capillary voltage, 40 V; tube lens, 155 V; and ion spray voltage, 4.3 kV. All of the samples were run in duplicate.

Statistical Analysis. The data are presented as the mean \pm S.E.M. Saturation and competitive binding curves were plotted using GraphPad software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) while comparing the best fit for single binding site models (K_d , B_{max} , and IC_{50} values were obtained from nonlinear regression analysis). Inhibition constants (K_i) were calculated from IC_{50} values using the Cheng-Prusoff equation (Chang and Cheng, 1978).

Food intake was measured in grams of chow consumed, and the ED_{50} values were calculated using GraphPad Software as the dose of the peptide required to elicit half-maximal consumption at 250 min after the injection of the compound (time of maximal effect).

Data from GH release and from food intake experiments were analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test using GraphPad Software; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Design and Synthesis of Ghrelin Analogs. The peptide sequences were assembled on a solid support as described under *Materials and Methods*. The purity of all of the peptides was $>95\%$.

Structures of the ghrelin analogs used in this study are shown in Table 1. The ester group of the amino acid in position 3 was replaced with an amide group to increase the stability (Bednarek et al., 2000) in the series of $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ derivatives (compounds **2-7** and **9-12**). To further increase the stability of the ghrelin peptide analogs, sarcosine was used to replace glycine at the N-terminal position (analogs **3**, **5**, **7**, **10**, and **12**), and/or the noncoded amino acids naphthylalanine (Nal) (analogs **4** and **5**) and cyclohexylalanine (Cha) (analogs **6** and **7**) replaced phenylalanine at position 4. To find the minimal structure that retained biological activity, N-terminal penta- and octapeptide analogs of ghrelin (**8-12**) were synthesized. Pentapeptides **13** and **14** are shorter versions of full-length ghrelin in which Trp^3 or Nal^3 replace $\text{Ser}(\text{O-octanoyl})^3$. These analogs were found by others (Matsumoto et al., 2001a) to activate calcium release in cells with transfected ghrelin receptors. A similar pentapeptide $[\text{Trp}^3, \text{Arg}^5]\text{ghr}(1-5)$ was reported previously to stimulate GH secretion in rats and food intake in mice (Ohinata et al., 2006). Peptides **15** and **16** are the desoctanoyl forms of ghrelin and $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$, respectively.

Binding of Ghrelin Analogs to GHS-R1a. The saturable, specific binding of both $[\text{I}^{125}]\text{ghr}$ and $[\text{I}^{125}][\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ to cell membranes of LLC PK-1 cells with transfected human GHS-R1a exhibited a K_d value $< 1\ \text{nM}$ and a B_{max} value close to $10^3\ \text{fmol}/\text{mg}$ protein (Table 2). Nonspecific binding was approximately 20%. Nonlinear regression analysis showed one binding site for both ghrelin and $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ (Fig. 1).

The results of competitive displacement of $[\text{I}^{125}]\text{ghr}$ binding by ghrelin analogs are summarized in Table 1. Ghrelin and its full-length analogs **2** to **8** had K_i values in the nanomolar range. The K_i values for analogs **4** and **5**, which contained Nal in position 4, were even lower, in the 0.1 nM range. The N-terminal pentapeptides **8** and **9** and octapeptide **12** showed K_i values in the micromolar range (Table 1). Pentapeptides **13** and **14** did not displace $[\text{I}^{125}]\text{ghr}$ binding even at a concentration of $10\ \mu\text{M}$ (Table 1), and full-length peptides lacking the octanoyl group showed the same result (**15** and **16**). Competitive binding experiments performed with $[\text{I}^{125}][\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ gave results similar to those obtained with $[\text{I}^{125}]\text{ghr}$ (M. Pýchová, unpublished observations).

In Vivo Studies. The effects of subcutaneously administered ghrelin analogs on food intake were tested in fed mice (orexigenic activity) or fasted mice (anorexigenic activity). None of the tested ghrelin analogs caused a decrease in food intake in fasted mice at a dose of 10 mg/kg compared with that of the saline-treated group (M. Holubová, unpublished observations).

On the contrary, full-length analogs of ghrelin showed a very significant orexigenic effect in freely fed mice at doses of 1 to 10 mg/kg s.c. compared with that of the control (Fig. 2). In addition, the orexigenic effect of $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ analogs lasted longer than that of ghrelin and was even more pronounced in

TABLE 2

$[\text{I}^{125}]\text{ghr}$ and $[\text{I}^{125}][\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ saturation binding to LLC PK-1 cell membranes with transfected GHS-R1a

Mean \pm S.E.M. of four separate experiments.

| Radioligand | K_d | B_{max} |
|--|-----------------|------------------|
| | nM | fmol/mg protein |
| $[\text{I}^{125}]\text{ghr}$ | 0.44 ± 0.12 | 860 ± 160 |
| $[\text{I}^{125}][\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ | 0.79 ± 0.28 | 800 ± 73 |

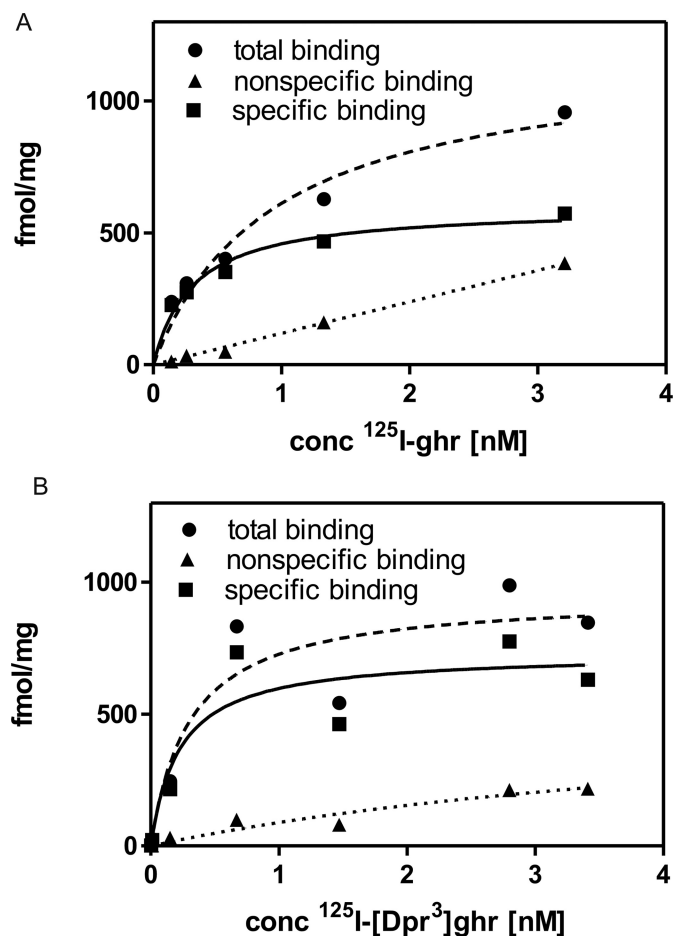


Fig. 1. $[^{125}\text{I}]\text{ghr}$ (A) and $[^{125}\text{I}][\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ (B) saturation binding to LCC PK-1 cell membranes transfected with GHS-R1a. The cells were incubated at 25°C for 45 min with increasing amounts of $[^{125}\text{I}]\text{ghr}$ or $[^{125}\text{I}][\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ in the absence (total binding) or presence (nonspecific binding) of 10 μM ghr or $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$. Specific binding was calculated by subtracting the nonspecific binding from the total binding. Binding curves were plotted using nonlinear regression. The figure is a representative example of four experiments performed in duplicate.

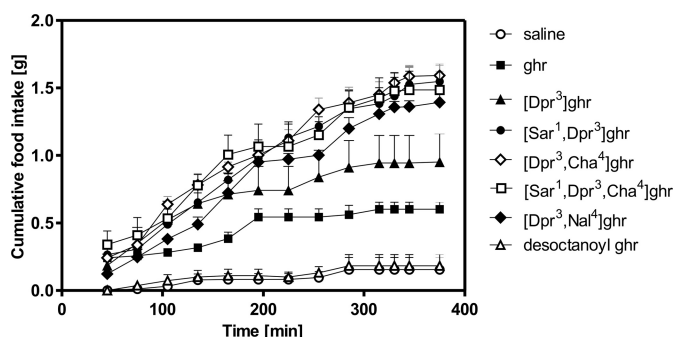


Fig. 2. Effects of ghrelin analogs on food intake of fed mice. Compounds were administered subcutaneously at a dose of 5 mg/kg. Food intake was monitored for 6 h after the injection and is expressed in grams of food consumed. $p < 0.05$ (ghrelin versus saline-treated group); $p < 0.01$ ($[\text{Sar}^1, \text{Dpr}^3, \text{Nal}^4]\text{ghr}$ versus saline-treated group); $p < 0.001$ ($[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$, $[\text{Dpr}^3, \text{Nal}^4]\text{ghr}$, $[\text{Dpr}^3, \text{Cha}^4]\text{ghr}$, $[\text{Sar}^1, \text{Dpr}^3, \text{Cha}^4]\text{ghr}$, and $[\text{Sar}^1, \text{Dpr}^3]\text{ghr}$ versus saline-treated group) ($n = 5\text{--}6$ mice per group).

analogues containing noncoded amino acids (peptides **3**, **4**, and **6** with Sar in position 1 and Nal or Cha in position 4; Fig. 2). The ED_{50} values when the maximal orexigenic effects were achieved at 250 min (Table 1) were in the range of mg/kg for all of the full-length analogs. The ED_{50} value for subcutane-

ously administered ghrelin in this study was approximately 2 mg/kg, which is similar to that reported previously (Perreault et al., 2004).

On the contrary, penta- and octapeptide ghrelin analogs, desoctanoyl ghr, and desoctanoyl $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ did not show any significant orexigenic effect even at the maximum dose of 10 mg/kg (Table 1).

A significant and comparable increase in the release of GH at a dose of 5 mg/kg was observed in 6-week-old male mice after the administration of ghrelin and the selected analogs $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$, $[\text{Dpr}^3, \text{Nal}^4]\text{ghr}$, and $[\text{Dpr}^3, \text{Cha}^4]\text{ghr}$ (compounds **2**, **4**, and **6**) both 10 and 30 min after treatment (Fig. 3).

Degradation of Ghrelin Analogs by Mouse Plasma. Ghrelin was degraded rapidly in mouse plasma (Fig. 4). However, $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ and its two analogs showed prolonged stability in mouse plasma of >4 h (Fig. 4).

Discussion

Octanoylation of Ser³ in ghrelin is unique in biological systems, and its necessity for the binding of ghrelin to its receptor and for biological activity was recognized soon after the discovery of ghrelin (Kojima et al., 1999; Bednarek et al., 2000). Protection of the octanoyl group against the activity of esterases has been accomplished by replacing Ser³ with Dpr. This change was found earlier to affect neither the binding activity nor calcium release from cells with transfected with GHS-R1a (Bednarek et al., 2000). However, the in vivo properties of $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ have not been followed previous to our study. All of the full-length ghrelin analogs in this study were based on $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$.

In the in vitro study, we confirmed similar affinities of ghrelin and $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ for GHS-R1a by obtaining similar K_d values in saturation binding and equal K_i values in competitive binding to cell membranes with transfected GHS-R1a.

In the in vivo experiments in adult mice, subcutaneously administered $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ exhibited an augmented and longer-lasting orexigenic effect than that observed for ghrelin. The result corresponded with >4 h of stability of $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ in blood plasma. Ghrelin was degraded totally in blood plasma in only 40 min, as reported also by De Vriese et al. (2004).

To protect $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}$ against degradation by aminopeptidases, glycine in position 1 was replaced with Sar according to our previous experience (Maletínská et al., 1997), where

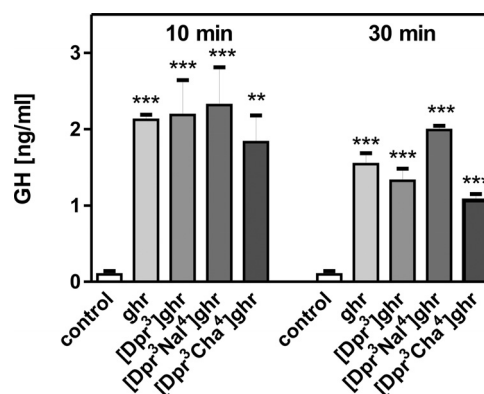


Fig. 3. Effects of ghrelin analogs on GH release. At 10 and 30 min after the subcutaneous injection of ghrelin analogs (at a dose of 5 mg/kg) to mice ($n = 4\text{--}5$), blood was collected, and GH was measured in blood plasma using a radioimmunoassay. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ versus the respective control groups.

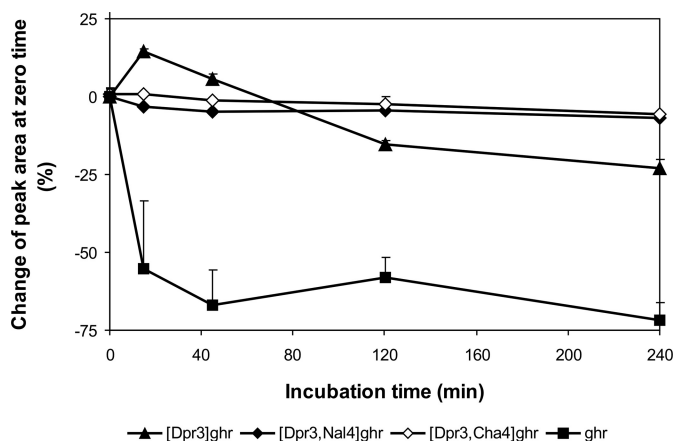


Fig. 4. Degradation profiles of the ghrelin analogs in mouse plasma. The ghrelin analog duplicates were incubated for different times (0, 15, 45, 120, and 240 min) in mouse plasma, then submitted for LC-MS analysis (for more details, see *Materials and Methods*). The results are expressed as the percentage differences from the peak areas of ghrelin analogs at time 0 with a 1 μ M initial concentration.

Sar in position 1 was not found to affect the biological activity of angiotensin II. However, replacement of Gly¹ with acetyl or *N*-acetyl-Gly (Bednarek et al., 2000; Van Craenenbroeck et al., 2004) has been shown to result in the loss of *in vitro* activity.

The Phe⁴-Leu⁵ bond of ghrelin or [Dpr³]ghr could be a cleavage site for chymotrypsin-like proteinases. As reported previously, replacement of Phe⁴ with alanine or tyrosine has resulted in complete loss of *in vitro* activity (Van Craenenbroeck et al., 2004). Therefore, Phe⁴ was replaced with the noncoded bulky hydrophobic phenylalanine derivatives Nal or Cha in this study.

Modification of [Dpr³]ghr with Nal or Cha in position 4 (compounds **4** and **6**) preserved both the affinity to the receptor and the orexigenic effect; [Dpr³Cha⁴]ghr (compound **6**) had both K_i and ED₅₀ values of only one order of magnitude less than those of [Dpr³]ghr. Both [Dpr³Nal⁴]ghr and [Dpr³Cha⁴]ghr showed stabilities of >4 h in blood plasma, which was similar to that of [Dpr³]ghr. The three analogs [Dpr³Nal⁴]ghr, [Dpr³Cha⁴]ghr, and [Dpr³]ghr all showed an effect on GH secretion comparable with that of ghrelin.

Replacement of glycine in position 1 with Sar (compound **3**) in [Dpr³]ghr resulted in an analog that preserved both its affinity to the receptor and the orexigenic effect, as observed in the analogs with modifications in position 4 (compounds **4** and **6**). Interestingly, placing both Sar in position 1 and Nal or Cha in position 4 did not produce a positive additive effect on the affinity to the receptor or the orexigenic effect (compounds **5** and **7**).

The ghrelin N-terminal penta- and octapeptides were reported not only to bind to cell membranes with transfected GHS-R1a and mobilize their calcium release (Bednarek et al., 2000; Matsumoto et al., 2001b) but also to potentiate GH secretion *in vivo* (Matsumoto et al., 2001a) and inhibit the secretion of pancreatic juice (Kapica et al., 2006). However, we found that the N-terminal ghrelin pentapeptide (compound **8**), [Dpr³]ghr pentapeptide (compound **9**), [Dpr³]ghr octapeptide (compound **11**), and their Sar¹ analogs (compounds **10** and **12**) possessed K_i values only in the micromolar range and had no effect on food intake. Similar results were obtained with the N-terminal pentapeptides containing

Nal³ and Trp³, which were reported previously to accomplish calcium release from GHS-R1a-transfected cell membranes and to have an orexigenic effect (Matsumoto et al., 2001a; Ohinata et al., 2006). In agreement with our findings, the biological activity of the ghrelin N-terminal pentapeptide was questioned previously because it neither bound to hypothalamus or pituitary membranes nor stimulated GH secretion *in vivo* (Torsello et al., 2002).

It has been shown in several studies that the desoctanoylation of ghrelin dramatically decreases binding to GHS-R1a (Kojima et al., 1999; Bednarek et al., 2000; Matsumoto et al., 2001a). In our study, we did not find binding to the receptor, an orexigenic effect, or an anorexigenic effect for both desoctanoyl ghrelin and desoctanoyl [Dpr³]ghr at doses up to 10 mg/kg s.c. in mice. We confirmed that desoctanoylation completely destroys the orexigenic effect of ghrelin and that the desoctanoylated peptide does not possess an anorexigenic effect.

With its unique lipopeptide chemical structure, ghrelin is the only known orexigenic hormone that is released peripherally. The diverse effects of ghrelin suggest possible clinical applications for GH deficiency, eating disorders, or gastrointestinal diseases.

In this study, stabilization of the octanoyl group by the introduction of Dpr(*N*-octanoyl)³ into ghrelin when combined with noncoded phenylalanine derivatives, such as Nal or Cha in position 4, produced stable ghrelin analogs with a high affinity to GHS-R1a and an orexigenic effect as potent as ghrelin, but with a substantially longer duration.

Ghrelin agonists have been tested recently as promising therapeutics in cachexia that accompanies cancer, chronic kidney disease, or heart failure (reviewed in DeBoer, 2008; Krasnow and Marks, 2010). The ghrelin analogs that were investigated in this study could be useful in further studies on the physiological role of ghrelin, and these peptides may be useful for the treatment of cachexia.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the excellent technical assistance of H. Vysušilová. We thank D. Sýkora from the Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic, for valuable advice in the LC-MS analyses. LLC PK-1 cell membranes transfected with GHS-R were a gift from C. M'Kadmi, Faculté de Pharmacie, Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, France.

Authorship Contributions

Participated in research design: Maletínská and Železná.
Conducted experiments: Maletínská, Pýchová, Holubová, and Železná.
Contributed new reagents or analytic tools: Blechová, Demianová, and Elbert.
Performed data analysis: Maletínská, Pýchová, and Holubová.
Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Maletínská, Pýchová, Demianová, Elbert, and Železná.

References

- Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, and Heck JV (2000) Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* **43**:4370–4376.
- Briggs DI and Andrews ZB (2011) Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology* **93**:48–57.
- Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, and Tschöp MH (2010) Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol* **31**:44–60.

- Chang CH and Cheng YC (1978) Ribonucleotide reductase isolated from human cells. Heterogeneity among the sources. *Biochem Pharmacol* **27**:2297–2300.
- Cheng Y and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099–3108.
- DeBoer MD (2008) Emergence of ghrelin as a treatment for cachexia syndromes. *Nutrition* **24**:806–814.
- Depoortere I (2009) Targeting the ghrelin receptor to regulate food intake. *Regul Pept* **156**:13–23.
- Elbert T and Veselá I (2010) Conditions for successful labeling of oxidation sensitive peptides by Na¹²⁵I]-IODO-GENTM system. *J Label Compd Radiopharm* **53**:288–293.
- De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, and Delporte C (2004) Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* **145**:4997–5005.
- Guerlavais V, Boeglin D, Mousseaux D, Oiry C, Heitz A, Deghenghi R, Locatelli V, Torsello A, Ghé C, Catapano F, et al. (2003) New active series of growth hormone secretagogues. *J Med Chem* **46**:1191–1203.
- Kapica M, Laubitz D, Puzio I, Jankowska A, and Zabielski R (2006) The ghrelin pentapeptide inhibits the secretion of pancreatic juice in rats. *J Physiol Pharmacol* **57**:691–700.
- Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, and Yada T (2003) Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* **52**:948–956.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, and Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**:656–660.
- Krasnow SM and Marks DL (2010) Neuropeptides in the pathophysiology and treatment of cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* **4**:266–271.
- Maixnerová J, Hlaváček J, Blokesová D, Kowalczyk W, Elbert T, Sanda M, Blechová M, Železná B, Slaninová J, and Maletínská L (2007) Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides* **28**:1945–1953.
- Maletínská L, Neugebauer W, Pérodin J, Lefebvre M, and Escher E (1997) Angiotensin analogues palmitoylated in positions 1 and 4. *J Med Chem* **40**:3271–3279.
- Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, Tanaka S, Matsuo H, Kojima M, Hayashi Y, and Kangawa K (2001a) Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **287**:142–146.
- Matsumoto M, Kitajima Y, Iwanami T, Hayashi Y, Tanaka S, Minamitake Y, Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, and Kangawa K (2001b) Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun* **284**:655–659.
- Morozumi N, Hanada T, Habara H, Yamaki A, Furuya M, Nakatsuka T, Inomata N, Minamitake Y, Ohsuye K, and Kangawa K (2011) The role of C-terminal part of ghrelin in pharmacokinetic profile and biological activity in rats. *Peptides* **32**:1001–1007.
- Nass R, Gaylinn BD, and Thorner MO (2011) The ghrelin axis in disease: potential therapeutic indications. *Mol Cell Endocrinol* **340**:106–110.
- Ohinata K, Kobayashi K, and Yoshikawa M (2006) [Trp³, Arg⁵]-ghrelin(1–5) stimulates growth hormone secretion and food intake via growth hormone secretagogue (GHS) receptor. *Peptides* **27**:1632–1637.
- Perreault M, Istrate N, Wang L, Nichols AJ, Tozzo E, and Stricker-Krongrad A (2004) Resistance to the orexigenic effect of ghrelin in dietary-induced obesity in mice: reversal upon weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**:879–885.
- Scerif M, Goldstone AP, and Korbonits M (2011) Ghrelin in obesity and endocrine diseases. *Mol Cell Endocrinol* **340**:15–25.
- Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyratt MJ Jr, Fisher MH, Nargund RP, and Patchett AA (1997) Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* **18**:621–645.
- Torsello A, Ghé C, Bresciani E, Catapano F, Ghigo E, Deghenghi R, Locatelli V, and Muccioli G (2002) Short ghrelin peptides neither displace ghrelin binding in vitro nor stimulate GH release in vivo. *Endocrinology* **143**:1968–1971.
- Van Craenenbroeck M, Gregoire F, De Neef P, Robberecht P, and Perret J (2004) Ala-scan of ghrelin (1–14): interaction with the recombinant human ghrelin receptor. *Peptides* **25**:959–965.
- Wisser A, Habel P, Wiedenmann B, Klapp B, Mönnikes H, and Kobelt P (2010) Interactions of gastrointestinal peptides: ghrelin and its anorexigenic antagonists. *Int J Pept* **2010**:817457.

Address correspondence to: Dr. Blanka Železná, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic. E-mail: zelezna@uochb.cas.cz

Ghrelin Agonist JMV 1843 Increases Food Intake, Body Weight and Expression of Orexigenic Neuropeptides in Mice

M. HOLUBOVÁ¹, A. ŠPOLCOVÁ¹, Z. DEMIANOVÁ¹, D. SÝKORA², J. A. FEHRENTZ³, J. MARTINEZ³, A. ŠTOFKOVÁ⁴, J. JURČOVIČOVÁ⁴, J. DRÁPALOVÁ⁵, Z. LACINOVÁ⁵, M. HALUZÍK⁵, B. ŽELEZNÁ¹, L. MALETÍNSKÁ¹

¹Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, ²Institute of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Prague, Czech Republic, ³IBMM UMR 5247, CNRS-Universités Montpellier 1- Montpellier 2, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France, ⁴Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ⁵Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received November 23, 2012

Accepted February 12, 2013

On-line April 16, 2013

Summary

Ghrelin and agonists of its receptor GHS-R1a are potential substances for the treatment of cachexia. In the present study, we investigated the acute and long-term effects of the GHS-R1a agonist JMV 1843 (H-Aib-DTrp-D-gTrp-CHO) on food intake, body weight and metabolic parameters in lean C57BL/6 male mice. Additionally, we examined stability of JMV 1843 in mouse blood serum. A single subcutaneous injection of JMV 1843 (0.01-10 mg/kg) increased food intake in fed mice in a dose-dependent manner, up to 5-times relative to the saline-treated group (ED₅₀=1.94 mg/kg at 250 min). JMV 1843 was stable in mouse serum *in vitro* for 24 h, but was mostly eliminated from mouse blood after 2 h *in vivo*. Ten days of treatment with JMV 1843 (subcutaneous administration, 10 or 20 mg/kg/day) significantly increased food intake, body weight and mRNA expression of the orexigenic neuropeptide Y and agouti-related peptide in the medial basal hypothalamus and decreased the expression of uncoupling protein 1 in brown adipose tissue. Our data suggest that JMV 1843 could have possible future uses in the treatment of cachexia.

Key words

GHS-R agonists • JMV 1843 • Male C57BL/6 mice • Food intake • NPY/AgRP

Corresponding author

L. Maletínská, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry,

Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic. Fax: +420 220183571. E-mail: maletin@uochb.cas.cz

Introduction

Ghrelin is an endogenous ligand of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). Structurally, ghrelin is a linear 28-amino-acid peptide with an octanoyl acid bound to Ser³ that is necessary for its biological activity but is highly prone to fast hydrolysis (Kojima *et al.* 1999). Due to the limited half-life of the octanoylated ghrelin, more stable analogs are being developed for potential clinical use.

Ghrelin is the only known orexigenic gut hormone that acts directly in the brain by enhancing both the expression and secretion of the orexigenic neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP) (Cowley *et al.* 2003, Chen *et al.* 2004). Although ghrelin was originally discovered as an endogenous growth hormone (GH) secretagogue with the potential to be used in the treatment of GH deficiency (Kojima *et al.* 1999), attention is currently focused more on ghrelin analogs with orexigenic effects that have potential applications in the treatment of cachexia.

In long-term studies, ghrelin and its peptide agonists such as BIM-28125 and BIM-28131, designed by IPSEN, increased body fat but not lean body mass in

lean rats, and this effect was independent of GH-releasing action (Tschöp *et al.* 2000, Strassburg *et al.* 2008). Under conditions of chronic wasting states, such as cachexia in chronic kidney disease, adjuvant arthritis or heart failure, ghrelin and BIM-28125 and BIM-28131 preferably prevented muscle wasting by attenuating muscle proteolysis (Deboer *et al.* 2008) or by the expression of ubiquitin ligases preventing muscle atrophy (Palus *et al.* 2011) but not by anabolic action.

Two orally active ghrelin agonists, TZIP-102 of Tranzyme Pharma for the treatment of gastroparesis and anamorelin of Helsinn for the treatment of cachexia/anorexia in patients with non-small cell lung cancer are in clinical testing phase 2 and 3, respectively.

The ghrelin peptide agonist [Aib-DTrp-DgTrp-CHO] named JMV 1843, formerly known as EP-1572 (Broglia *et al.* 2002, Guerlavais *et al.* 2003) was originally designed as a GH secretagogue. JMV 1843 was demonstrated to have high binding affinity for both human pituitary cell membranes and LLC PK-1 cells transfected transiently with human GHS-R1 (Guerlavais *et al.* 2003) where this compound also activated MAPK/ERK1/2 (Mousseaux *et al.* 2006). In young dogs, JMV 1843 was shown to stimulate growth hormone secretion (Guerlavais *et al.* 2003). In healthy men, orally or subcutaneously (SC) administered JMV 1843 rapidly and dose-dependently enhanced its concentration in the blood plasma and subsequently stimulated growth hormone secretion (Piccoli *et al.* 2007). JMV 1843 was tested as AEZS-130 in Phase 3 clinical trial to assess the use of this compound as a diagnostic tool in adults with GH deficiency and has also been tested in Phase 2 study for the treatment of cachexia by Aeterna Zentaris.

The goal of this study was to investigate the acute and long-term effects of the SC-administered GHS-R1a agonist JMV 1843 on food intake, body weight and metabolic parameters in lean C57BL/6 mice. Additionally, we examined stability of the compound in mouse blood serum both *in vitro* and *in vivo*. Our results suggest that because of its prolonged stability compared with ghrelin and its ability to positively affect food intake, likely through the activation of hypothalamic NPY/AgRP neurons, JMV 1843 could have a potential to treat cachexia and malnutrition.

Methods

Synthesis of the GHS-R1a agonist JMV 1843

JMV 1843 [H-Aib-DTrp-D-gTrp-CHO] was

synthesized at IBMM UMR5247, Faculté de Pharmacie, Montpellier, as described by Guerlavais *et al.* (2003).

Experimental animals

All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the Czech Republic law No. 246/1992 and were approved by the Committee for Experiments with Laboratory Animals of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Inbred C57BL/6 male mice (AnLab, Prague, Czech Republic) were housed at a temperature of 23 °C under a daily cycle of 12-hour periods of light and dark (light period starting at 6:00 a.m.). Mice had free access to water and a standard chow diet that contained 25 %, 9 % and 66 % of calories from protein, fat and carbohydrate, respectively (St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice, Czech Republic).

Acute effect of the GHS-R agonist JMV 1843 on food intake

Fifteen-week-old mice were randomly divided into groups of 6 animals and were kept in separate cages for one week. Before the experiment, mice had free access to food and water. Thereafter, the food pellets were removed at 8:00 a.m. and the mice were injected SC with 0.2 ml of saline or JMV1843 (dissolved in saline) at a dose ranging from 0.01 to 10 mg/kg of body weight (b.w.) (n=6 mice per group, b.w. 23-26 g). Fifteen minutes after the injection, mice were given pre-weighed food pellets. Food intake was monitored for 5 h; the pellets were weighed at 30 min intervals and then returned to the cages and cumulative food intake was registered. Animals had free access to water during the experiment.

Measurement of pharmacokinetics in the blood serum in vitro and in vivo

For *in vitro* pharmacokinetics, the sera of adult male C57BL/6 mice were spiked with JMV 1843 to a final concentration of 10⁻⁶ M and incubated at 37 °C. Samples were collected at 30 min, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 and 144 h after the start of the incubation and were immediately frozen and stored at -20 °C.

Simultaneously, fed 15-week-old male C57BL/6 mice were SC injected with 0.2 ml of JMV 1843 (dissolved in saline) at a dose of 5 or 10 mg/kg of b.w. and sacrificed by decapitation at 10 min, 30 min, 1, 2, 4 or 8 h after injection (n=3). Blood was collected and serum was isolated and stored at -20 °C.

In both experiments, JMV 1843 was extracted from serum using an acetonitrile precipitation of proteins as described previously (Hatzieremia *et al.* 2007). Samples were then subjected to an LC-MS system consisting of an Alliance HPLC (Waters, USA) and a Q-TOF-Micro hybrid mass spectrometer (Waters, USA). Chromatographic separation was carried out with a Discovery HS C18 column (Supelco, USA), with a particle size of 5 μm and a column size of 50 x 2.1 mm ID. Mobile phase A consisted of 0.1 % HCOOH in water, and mobile phase B contained 0.1 % HCOOH in acetonitrile. For the separation of analytes, a gradient from 5 % to 100 % B over 5.5 min was used at a flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Effect of 10-day administration of the GHS-R agonist JMV 1843 on food intake and metabolic parameters in mice

At the age of 16 weeks, mice were randomly divided into three groups of 10 animals and placed into separate cages with free access to food and water. The following week, mice were subjected to a 10-day food intake experiment. The mice were injected SC with saline or JMV 1843 at a dose of 10 or 20 mg/kg of b.w./day (twice a day at 8:00 a.m. and 6:00 p.m., single doses of 5 or 10 mg/kg of b.w., respectively) for 10 days. Consumption of the St-1 diet and the weight of the mice were monitored simultaneously.

At the end of the experiment, fed mice were sacrificed by decapitation at 8:00 a.m. Trunk blood was collected and plasma was prepared and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The white adipose tissue (WAT, abdominal plus gonadal adipose tissue), the subcutaneous adipose tissue (SCAT), the brown adipose tissue (BAT), the musculus gastrocnemius and the liver of all mice were dissected, weighed, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. The rate of adiposity was expressed as fat-to-body weight ratio (ratio of the total adipose tissue weight to the total body weight). Brains were dissected, placed into isopentane at -15 to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one minute, frozen on dry ice and kept at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until sectioning. Coronal sections (200 μm) were cut (starting -1.25 mm from the bregma) using a cryostat, mounted on glass slides, and immersed in absolute ethanol for 50 s. Immediately thereafter the medial basal hypothalamus (including the median eminence, arcuate nuclei, ventromedial nuclei, and dorsomedial nuclei) was dissected with a razor blade from a series of sections under a microscope. The tissue was homogenized in RNA extraction lysis buffer, and

kept at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until RNA extraction.

Determination of hormonal and biochemical parameters

The plasma insulin and adiponectin concentrations were measured by RIA assays (Linco Research, St. Charles, MI, USA), and leptin and IGF-1 concentrations were determined by ELISA assays (Linco Research, St. Charles, MI, USA and BioVendor, Heidelberg, Germany, respectively). The blood glucose levels were measured using a Glucocard glucometer (Arkray, Kyoto, Japan). All measurements were carried out according to the protocols recommended by the manufacturers.

Determination of mRNA expression

Samples of adipose tissue (BAT, WAT) and muscle were homogenized, total RNA was extracted and RNA concentration was determined as previously described (Maletínská *et al.* 2011). Determination of the mRNA expression of genes of interest (uncoupling protein 1 (UCP1) in brown adipose tissue; uncoupling protein 2 (UCP2), acetyl-CoA carboxylase 1 (ACACA), fatty acid synthase (FASN), lipoprotein lipase (LPL) and stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) in abdominal plus gonadal adipose tissue; myostatin, myogenin, myosin heavy chain 4 (MHC4) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in muscle) was performed using an ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The expression of $\beta 2$ microglobulin (B2M) was used to compensate for variations in input RNA amounts and the efficiency of reverse transcription, and the modified formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$ was used to calculate the relative gene expression.

Total RNA from the medial basal hypothalamus was isolated using the RNAqueous Micro Kit (Ambion, Austin, TX). The concentration of RNA for the target genes NPY and AgRP was determined as detailed previously (Stofkova *et al.* 2010). Input RNA amounts were calculated with a multiple comparative method for the mRNAs of interest and GAPDH. Statistical analysis was performed using GenEx Ver. 5 software (MultiD Analyses AB, Goteborg, Sweden).

Statistical analysis

The data are presented as the means \pm SEM for the number of animals indicated in the figures and tables. The data were analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *post-hoc* test (food intake and body weight evaluation), one-way

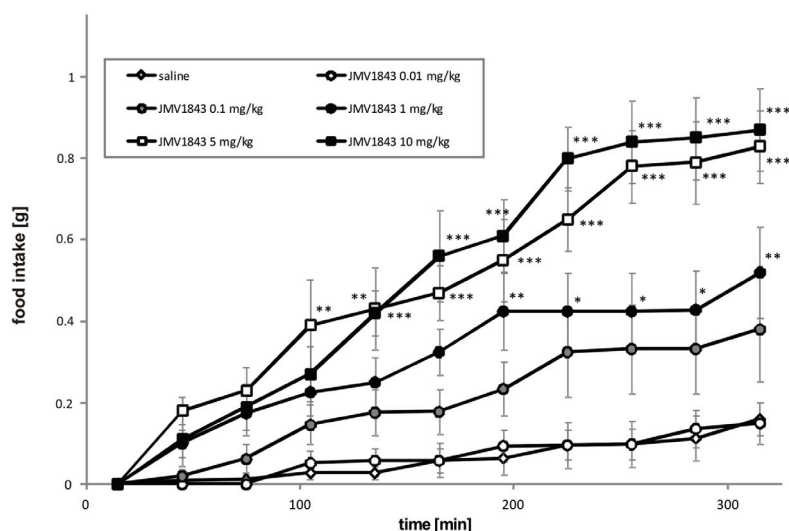


Fig. 1. Acute effect of JMV 1843 on food intake in C57BL/6 mice (SC administration, doses of 0.01, 0.1, 1, 5 and 10 mg/kg). Food intake was monitored for 5 h after injection and is expressed in grams of food consumed. The data were analyzed by two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test. The significance levels were * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. the saline-treated group ($n = 6$).

ANOVA followed by a Dunnett *post-hoc* test (metabolic parameters) or t-test (mRNA expressions), as indicated in the figures and table legends, using GraphPad Software (San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant. In the acute food intake test, the ED₅₀ value was calculated using GraphPad software as the dose of the compound required to elicit half-maximal consumption at 250 min after the injection of the compound (time of maximal effect).

Results

Acute effects of JMV 1843 in lean mice

The acute orexigenic effect of the SC administered ghrelin agonist JMV 1843 was determined in fed 15-week-old C57BL/6 mice using doses from 0.01 to 10 mg/kg of b.w. JMV 1843 increased food intake in fed mice in a dose-dependent manner, with an ED₅₀ value of 1.94 mg/kg at 250 min. Doses of 5 and 10 mg/kg caused greater than 5-fold increases in food intake compared with the administration of saline alone (Fig. 1).

Pharmacokinetics of JMV 1843 *in vitro* and *in vivo*

JMV 1843 showed good stability *in vitro* in mouse serum for 24 h when incubated at 37 °C, maintaining 50 % of its initial concentration after 60 h (Fig. 2A). However, it was almost completely eliminated from mouse blood after 2 h following SC administration in mice, with elimination half-lives of 21 and 23 min at the doses of 5 mg/kg and 10 mg/kg, respectively (Fig. 2B).

Effects of 10-day administration of JMV 1843 in lean mice

Our short-term food intake experiment showed that the use of 10 mg/kg of JMV 1843 resulted in the most significant increase in food intake. However, due to the relatively fast elimination of the compound from mouse blood, daily doses of 10 and 20 mg/kg of b.w., injected SC at doses of 5 and 10 mg/kg, two times daily, respectively, were chosen for the 10-day administration experiment.

Ten days of treatment with JMV 1843 at both doses significantly increased average daily food intake (Fig. 3A) and body weight (Fig. 3B) compared with the saline control treatment. Treatment with JMV 1843 at a dose of 20 mg/kg of b.w./day significantly increased glucose level. However, at the 10 mg/kg of b.w./day dose, no effect on blood glucose was found. Circulating leptin levels were increased proportionally with the increased adiposity by both doses of JMV 1843 but changes in both parameters did not reach significance. Despite these effects on food intake, body weight and adiposity, no significant changes in metabolic parameters, such as insulin, adiponectin and IGF-1 plasma levels, were detected (Table 1).

Expression of NPY and AgRP mRNAs in the medial basal hypothalamus

Treatment with JMV 1843 at a dose of 20 mg/kg of b.w./day significantly increased the expression of mRNAs for the orexigenic peptides NPY and AgRP in medial basal hypothalamus comprising the median eminence, arcuate, paraventricular and dorsomedial nuclei (Fig. 4A,B).

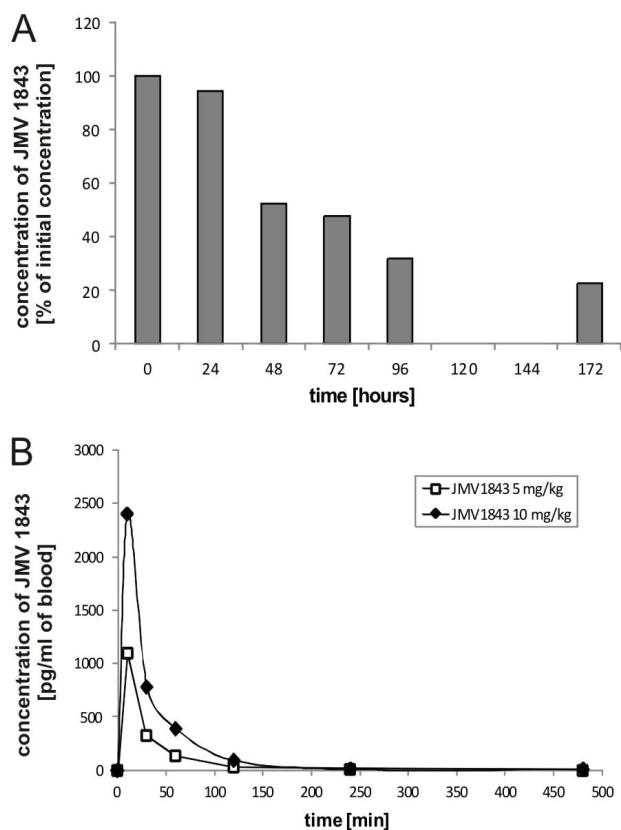


Fig. 2. Degradation profile of JMV 1843 **(A)** in mouse blood serum *in vitro* and **(B)** after administration to C57BL/6 mice *in vivo*. **(A)** Mouse serum spiked with JMV 1843 (10^{-6} M) was incubated at 37 °C for the indicated time periods. Samples prepared by acetonitrile precipitation were subjected to LC-MS analysis. The data are expressed as a percentage of the concentration at time zero. **(B)** Mice ($n=3$ per group) were SC injected with JMV 1843 at the doses of 5 and 10 mg/kg and were sacrificed after the time periods indicated in the figure. Samples prepared by acetonitrile precipitation were subjected to LC-MS analysis. The data are expressed as the concentration of JMV1843.

Discussion

Ghrelin and other agonists of the growth hormone secretagogue receptor (GHSR-1a) are currently being investigated as potent therapeutic agents for the treatment of cachexia, a complex wasting syndrome accompanying a wide array of chronic diseases. Effects of ghrelin, such as increase in appetite, food intake and body adiposity, suggest its potential to counteract the symptoms of cachexia. Therefore ghrelin can help to preserve energy reserves and improve clinical outcomes in cachectic patients. Due to the limited stability of ghrelin and its short half-life in circulation, ghrelin analogs with greater stability are being developed for the treatment of cachexia.

In this study, we investigated the acute and long-term effects of the pseudopeptide GHS-R1a agonist

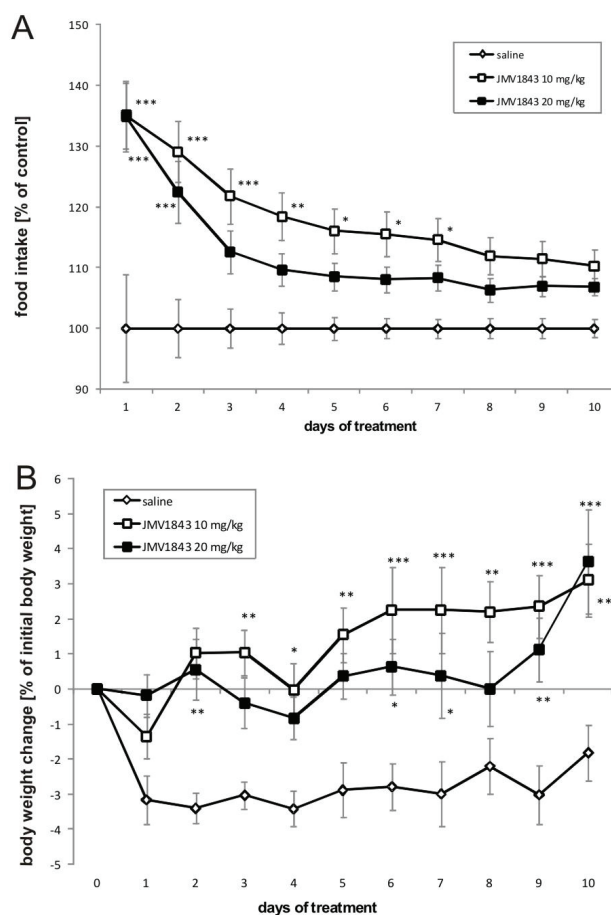


Fig. 3. Long-term effect of JMV 1843 on food intake and body weight in C57BL/6 mice (SC administration, 10 and 20 mg/kg of b.w./day, administered as 5 and 10 mg/kg twice per day for 10 days, respectively). Food intake and body weight were monitored daily. **(A)** Cumulative food intake expressed as a percentage of the food intake of the control group, **(B)** body weight change expressed as a percentage of the initial body weight. The data were analyzed by two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test. The significance levels were * $P<0.05$, ** $P<0.01$, and *** $P<0.001$ vs. the saline-treated group ($n=10$).

JMV 1843 subcutaneously administered to lean C57BL/7 male mice. The data presented here clearly indicate that JMV 1843 positively affects food intake and body weight gain, suggesting its potential to beneficially affect disorders accompanied by chronically decreased food intake.

Similarly to the previously described 90 min food intake experiment (Pirnik *et al.* 2011), our dose response acute experiment showed that a single SC injection of JMV 1843 constantly stimulated 5-h food intake in *ad libitum*-fed lean mice during the light phase. JMV 1843 increased food consumption in a dose dependent manner, reaching statistical significance at a dose of 1 mg/kg of b.w. Doses of 5 and 10 mg/kg of b.w. caused greater than 5-fold increases in food intake during the 5-h period, compared to the saline-treated group.

Table 1. Metabolic parameters after 10-day *s.c.* administration of JMV 1843 in fed male mice.

| Group/ treatment | Body weight [g] | WAT [g] | SCAT [g] | Fat/body weight [%] | Leptin [ng/ml] | Liver [g] | Glucose [mmol/l] | Insulin [ng/ml] | Adiponectin [µg/ml] | IGF-1 [ng/ml] |
|------------------------------|--------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------------|--------------|---------------------|--------------------|------------------------|------------------|
| <i>Saline</i> | 31.46 ± 0.77 | 0.83 ± 0.05 | 0.61 ± 0.05 | 5.16 ± 0.21 | 5.39 ± 0.55 | 1.68 ± 0.08 | 6.83 ± 0.66 | 1.12 ± 0.32 | 11.24 ± 1.19 | 276 ± 77 |
| <i>JMV 1843 10 mg/kg</i> | 32.18 ± 0.68 | 0.88 ± 0.08 | 0.54 ± 0.04 | 5.00 ± 0.32 | 6.22 ± 0.55 | 1.67 ± 0.04 | 8.21 ± 0.46 | 0.85 ± 0.17 | 10.69 ± 1.04 | 215 ± 71 |
| <i>JMV 1843 20 mg/kg</i> | 33.22 ± 0.65 | 0.99 ± 0.07 | 0.64 ± 0.04 | 5.68 ± 0.27 | 7.29 ± 0.87 | 1.80 ± 0.06 | 8.86 ± 0.41 * | 1.17 ± 0.28 | 10.34 ± 0.74 | 233 ± 79 |

All values are expressed as mean ± SEM (n=10 per group). Significance (one-way ANOVA followed by a Dunnett *post-hoc* test) is *P<0.05 vs. saline-treated group. WAT – white adipose tissue, SCAT – subcutaneous adipose tissue.

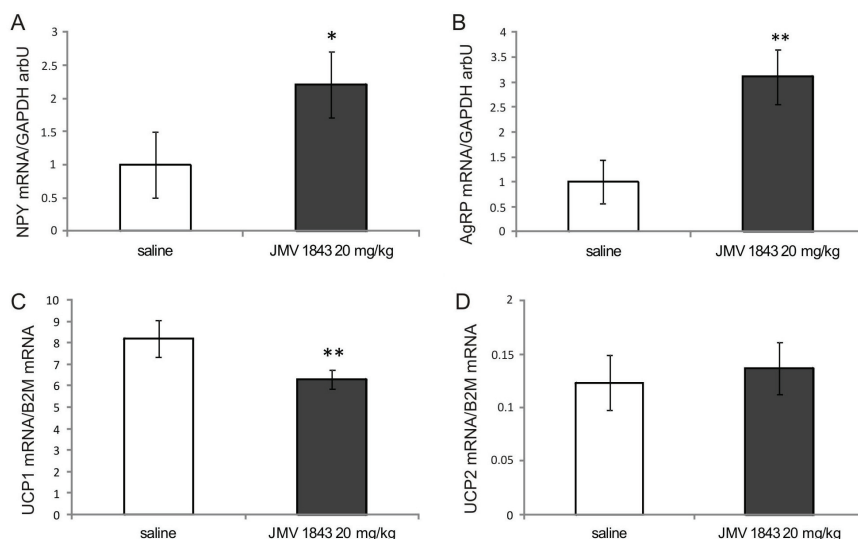


Fig. 4. Expression of mRNA in mouse tissues after 10-day administration of JMV1843 at a dose of 20 mg/kg of b.w./day: **(A)** NPY mRNA levels, **(B)** AgRP mRNA levels in the medial basal hypothalamus. The data were normalized to GAPDH and analyzed by the unpaired t-test. The significance levels were * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. the saline-treated group ($n = 10$). **(C)** UCP1 mRNA levels in brown adipose tissue, **(D)** UCP2 mRNA levels in white adipose tissue. The data were normalized to β_2 microglobulin and analyzed by the unpaired t-test. The significance levels were * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. the saline-treated group ($n = 10$).

This increase was even greater than the one observed in our previous experiments with ghrelin at the same dose (Maletínská *et al.* 2012). The stronger potency of JMV 1843 could be due to its prolonged stability and more long-lasting effect relative to ghrelin. Ghrelin has been reported to have a short biological half-life of approximately 9–13 min, mostly due to the rapid desacylation of the peptide (Akamizu and Kangawa 2006). In contrast, the synthetic pseudopeptide JMV 1843 showed increased stability, with a half-life of 80–93 min after different doses of intradermal application in men (Piccoli *et al.* 2007). In our *in vitro* experiment examining the degradation of JMV 1843 in mouse serum, we showed that JMV 1843 remained almost completely stable for approximately 24 h and was present at 50 % of its initial concentration after 2.5 days. However, ghrelin was degraded rapidly under the same conditions with a half-life of 12 min, as shown in our previous study (Maletínská *et al.* 2012). The pharmacokinetics of JMV 1843 determined *in vivo* in mice after SC administration showed that the drug promptly entered blood stream, with a peak concentration 10 min after administration. Although JMV 1843 was found to be stable *in vitro*, it was almost completely eliminated from mouse blood after 2 h following the SC administration, having a biological half-life of 21–23 min and reaching a zero concentration after 4 h. These observations suggest that JMV 1843 is either rapidly metabolized or accumulated in tissues.

JMV 1843 administered subcutaneously for ten days significantly increased the food intake and body weight of lean mice at both doses. Surprisingly, the effect of the lower dose was slightly more pronounced than the effect of the higher dose. This finding is most likely due

to the lower solubility at the higher dose, reaching the maximal possible effect of the compound at the lower dose or saturation of influx mechanisms at the lower dose. Importantly, the weight gain at both doses was maintained until the last measurement, although the effect on food intake stayed significant for seven days and then dropped slightly. This finding seems to be consistent with the suggestion that mechanisms other than hyperphagia may mediate ghrelin-induced increase in body weight (Kim *et al.* 2004). It was previously demonstrated that chronic ghrelin treatment in lean mice decreased the expression of UCP1 in brown adipose tissue (Tsubone *et al.* 2005). UCP1, which is expressed predominantly in BAT mitochondria, is responsible for the high thermogenic capacity of BAT and regulates energy expenditure; it allows proton re-entry into the mitochondrial matrix without passing through ATP-synthase, which enables energy dissipation *via* the production of heat (Clapham 2011). In this study, we showed that a ten-day treatment with JMV 1843 significantly decreased the expression of UCP1 mRNA in BAT similarly to the above mentioned down-regulation of UCP1 mRNA after the treatment with ghrelin. This suggests a possible reduction of energy expenditure, which may also contribute to the described increase in body weight. Furthermore, treatment with JMV 1843 tended to increase the UCP2 mRNA level in WAT. This observation corresponds to the effect of ghrelin described by (Tsubone *et al.* 2005); however, the functional significance of this effect remains unknown.

To further dissect the mechanisms underlying the orexigenic effect of the chronic administration of JMV 1843, we examined the changes in the mRNA levels of NPY and AgRP in the medial basal hypothalamus. NPY

and AgRP are potent orexigenic peptides co-expressed in subsets of neurons in the arcuate nucleus. It was shown that both central and peripheral chronic administration of ghrelin increase hypothalamic NPY and AgRP mRNA levels, indicating that NPY/AgRP containing neurons are the primary hypothalamic targets of ghrelin and obligatory mediators of its orexigenic effect (Kamegai *et al.* 2001, Chen *et al.* 2004). We found that the treatment with JMV 1843 significantly elevated NPY and AgRP mRNA expression, suggesting that the mechanism of action of JMV 1843 regarding food intake is similar to that described for ghrelin. In addition to orexigenic effects, both NPY and AgRP also decrease thermogenesis *via* the reduction of UCP1 production in BAT (Billington *et al.* 1994, Small *et al.* 2001). Therefore, it is plausible to hypothesize that the effects JMV 1843 on UCP1 mRNA expression in BAT could be mediated by the stimulation of hypothalamic NPY/AgRP neurons.

Ten days treatment with JMV 1843 moderately but non-significantly increased the white adipose tissue content and circulating leptin level. These results are in agreement with previous observations suggesting that ghrelin-induced weight gain of the whole body might be primarily induced by an increase in adiposity, while the weight of muscle mass and other organs remains unaffected (Tsubone *et al.* 2005). This conclusion is further supported by our finding that JMV 1843 had no effect on myogenesis markers and significantly decreased myogenin mRNA levels, indicating that the treatment did not affect muscle mass. However, results of mRNA expression analysis of fat metabolism genes did not confirm significant increase in adipogenesis. Nevertheless, neither adipose tissue nor muscle mass was decreased and orexigenic mechanisms were activated, which seems to be most important for potential use of the compound for the treatment of cachexia.

The above mentioned effects were in animals treated with 20 mg/kg of b.w./day dose of JMV 1843 accompanied by significantly increased blood glucose levels, which were not observed at the dose of 10 mg/kg

of b.w./day. On the other hand, neither of the doses of JMV 1843 affected the serum concentrations of insulin, adiponectin and IGF-1, suggesting no deleterious effects on insulin sensitivity. These results are consistent with those of previous studies that examined the effects of the chronic administration of ghrelin (Kamegai *et al.* 2001, Nakazato *et al.* 2001, Kim *et al.* 2004).

Conclusion

In conclusion, we have shown that JMV 1843 has prolonged stability compared with ghrelin and increases food intake and body weight in lean mice through the activation of the hypothalamic mRNA expression of NPY and AgRP and significant decrease in UCP1 expression in brown adipose tissue pointing to a decreased energy expenditure. Our data suggest the hypothesis that JMV 1843 may have beneficial effects on malnutrition and cachexia induced by chronically decreased food intake. Furthermore, it can be hypothesized that the effect of JMV 1843 could be even more pronounced under the conditions of chronic cachexia, which will be the subject of future investigations by our group.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant numbers 303/09/0744 and 303/10/1368), the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (grant number RVO:61388963) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant number MSMT6046137307). The authors would like to thank Dr. A. Kiss and Dr. Z. Pirnik (Institute of Experimental Endocrinology, SAS, Slovakia) for the kind help with the isolation of the medial basal hypothalamus and H. Vysušilová for excellent technical assistance.

References

- AKAMIZU T, KANGAWA K: Translational research on the clinical applications of ghrelin. *Endocr J* **53**: 585-591, 2006.
- BILLINTON CJ, BRIGGS JE, HARKER S, GRACE M, LEVINE AS: Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* **266**: R1765-R1770, 1994.

- BROGLIO F, BOUTIGNON F, BENSO A, GOTTERO C, PRODAM F, ARVAT E, GHÉ C, CATAPANO F, TORSELLO A, LOCATELLI V, MUCCIOLI G, BOEGLIN D, GUERLAVAIS V, FEHRENTZ JA, MARTINEZ J, GHIGO E, DEGHENGI R: EP1572: a novel peptido-mimetic GH secretagogue with potent and selective GH-releasing activity in man. *J Endocrinol Invest* **25**: RC26-RC28, 2002.
- CHEN HY, TRUMBAUER ME, CHEN AS, WEINGARTH DT, ADAMS JR, FRAZIER EG, SHEN Z, MARSH DJ, FEIGNER SD, GUAN XM, YE Z, NARGUND RP, SMITH RG, VAN DER PLOEG LH, HOWARD AD, MACNEIL DJ, QIAN S: Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* **145**: 2607-2612, 2004.
- CLAPHAM JC: Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology* **63**: 111-123, 2012.
- COWLEY MA, SMITH RG, DIANO S, TSCHÖP M, PRONCHUK N, GROVE KL, STRASBURGER CJ, BIDLINGMAIER M, ESTERMAN M, HEIMAN ML, GARCIA-SEGURA LM, NILLNI EA, MENDEZ P, LOW MJ, SOTONYI P, FRIEDMAN JM, LIU H, PINTO S, COLMERS WF, CONE RD, HORVATH TL: The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**: 649-661, 2003.
- DEBOER MD, ZHU X, LEVASSEUR PR, INUI A, HU Z, HAN G, MITCH WE, TAYLOR JE, HALEM HA, DONG JZ, DATTA R, CULLER MD, MARKS DL: Ghrelin treatment of chronic kidney disease: improvements in lean body mass and cytokine profile. *Endocrinology* **149**: 827-835, 2008.
- GUERLAVAIS V, BOEGLIN D, MOUSSEAU D, OIRY C, HEITZ A, DEGHENGI R, LOCATELLI V, TORSELLO A, GHÉ C, CATAPANO F, MUCCIOLI G, GALLEYRAND JC, FEHRENTZ JA, MARTINEZ J: New active series of growth hormone secretagogues. *J Med Chem* **46**: 1191-1203, 2003.
- HATZIEREMIA S, KOSTOMITSOPOULOS N, BALAFAS V, TAMVAKOPOULOS C: A liquid chromatographic/tandem mass spectroscopic method for quantification of the cyclic peptide melanotan-II. Plasma and brain tissue concentrations following administration in mice. *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**: 2431-2438, 2007.
- KAMEGAI J, TAMURA H, SHIMIZU T, ISHII S, SUGIHARA H, WAKABAYASHI I: Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* **50**: 2438-2443, 2001.
- KIM MS, NAMKOONG C, KIM HS, JANG PG, KIM PAK YM, KATAKAMI H, PARK JY, LEE KU: Chronic central administration of ghrelin reverses the effects of leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**: 1264-1271, 2004.
- KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, NAKAZATO M, MATSUO H, KANGAWA K: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**: 656-660, 1999.
- MALETÍNSKÁ L, MATYŠKOVÁ R, MAIXNEROVÁ J, SÝKORA D, PÝCHOVÁ M, SPOLCOVÁ A, BLECHOVÁ M, DRÁPALOVÁ J, LACINOVÁ Z, HALUZÍK M, ZELEZNÁ B: The Peptidic GHS-R antagonist [D-Lys(3)]GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *Mol Cell Endocrinol* **343**: 55-62, 2011.
- MALETÍNSKÁ L, PÝCHOVÁ M, HOLUBOVÁ M, BLECHOVÁ M, DEMIANOVÁ Z, ELBERT T, ŽELEZNÁ B: Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther* **340**: 781-786, 2012.
- MOUSSEAU D, LE GALLIC L, RYAN J, OIRY C, GAGNE D, FEHRENTZ JA, GALLEYRAND JC, MARTINEZ J: Regulation of ERK1/2 activity by ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1A involves a PLC/PKCvarepsilon pathway. *Br J Pharmacol* **148**: 350-365, 2006.
- NAKAZATO M, MURAKAMI N, DATE Y, KOJIMA M, MATSUO H, KANGAWA K, MATSUKURA S: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**: 194-198, 2001.
- PALUS S, SCHUR R, AKASHI YJ, BOCKMEYER B, DATTA R, HALEM H, DONG J, CULLER MD, ADAMS V, ANKER SD, SPRINGER J: Ghrelin and its analogues, BIM-28131 and BIM-28125, improve body weight and regulate the expression of MuRF-1 and MAFbx in a rat heart failure model. *PLoS One* **6**: e26865, 2011.
- PICCOLI F, DEGEN L, MACLEAN C, PETER S, BASELGIA L, LARSEN F, BEGLINGER C, DREWE J: Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of an oral ghrelin agonist in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 1814-1820, 2007.

-
- PIRNIK Z, BUNDZIKOVÁ J, HOLUBOVÁ M, PÝCHOVÁ M, FEHRENTZ JA, MARTINEZ J, ŽELEZNÁ B, MALETÍNSKÁ L, KISS A: Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. *Neurochem Int* **59**: 889-895, 2011.
- SMALL CJ, KIM MS, STANLEY SA, MITCHEL JR, MURPHY K, MORGAN DG, GHATEI MA, BLOOM SR: Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* **50**: 248-254, 2001.
- STOFKOVA A, ZELEZNA B, ROMZOVA M, ULICNA O, KISS A, SKURLOVA M, JURCOVICOVA J: Effect of feeding status on adjuvant arthritis severity, cachexia, and insulin sensitivity in male Lewis rats. *Mediators Inflamm* **2010**, article ID 398026, 2010.
- STRASSBURG S, ANKER SD, CASTANEDA TR, BURGET L, PEREZ-TILVE D, PFLUGER PT, NOGUEIRAS R, HALEM H, DONG JZ, CULLER MD, DATTA R, TSCHÖP MH: Long-term effects of ghrelin and ghrelin receptor agonists on energy balance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**: E78-E84, 2008.
- TSCHÖP M, SMILEY DL, HEIMAN ML: Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**: 908-913, 2000.
- TSUBONE T, MASAKI T, KATSURAGI I, TANAKA K, KAKUMA T, YOSHIMATSU H: Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCPI mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regul Pept* **130**: 97-103, 2005.
-



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce



Triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 attenuate food intake, body weight, and adipose tissue mass in mice

M. Holubová^{a,b}, V. Nagelová^a, Z. Lacinová^b, M. Haluzík^b, D. Šýkora^c, A. Moulin^d, A.L. Blayo^d, J.A. Fehrentz^d, J. Martinez^d, A. Stofkova^e, J. Jurčovičová^e, B. Železná^a, L. Maletínská^{a,*}

^aInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Prague, Czech Republic

^bThird Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

^cInstitute of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Prague, Czech Republic

^dIBMM UMR 5274, CNRS – Universités Montpellier 1- Montpellier 2, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

^eDepartment of Normal, Pathological and Clinical Physiology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2014

Received in revised form 19 May 2014

Accepted 5 June 2014

Available online xxx

Keywords:

GHS-R1a antagonists

JMV4208

JMV3002

Male C57BL/6 mice

Diet-induced obesity

Food intake

ABSTRACT

The only peripherally released orexigenic hormone, ghrelin, plays a key role in food intake and body weight regulation. Antagonizing the ghrelin receptor, GHS-R1a, represents a promising approach for anti-obesity therapy. In our study, two novel GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002, which are tri-substituted 1,2,4-triazoles, decreased food intake in fasted lean mice in a dose-dependent manner, with ED₅₀ values of 5.25 and 2.05 mg/kg, respectively. Both compounds were stable in mouse blood, with half-lives of 90 min (JMV4208) and 60 min (JMV3002), and disappeared from the blood 8 h after administration. Fourteen days of treatment with the ghrelin antagonists (20 mg/kg twice a day) decreased food intake, body weight and adipose tissue mass in mice with diet-induced obesity (DIO). These results are likely attributable to an impact on food intake reduction and an attenuated expression of the lipogenesis-promoting enzymes (acetyl-CoA carboxylase 1 in subcutaneous fat and fatty acid synthase in subcutaneous and intraperitoneal fat). The decrease in fat mass negatively impacted circulating leptin levels. These data suggest that JMV4208 and JMV3002 could be useful therapeutic agents for the treatment of obesity.

© 2014 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Ghrelin, an endogenous ligand of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a), is a linear 28-amino-acid peptide with an n-octanoyl group on the Ser³ residue and is predominantly produced by the stomach (Kojima et al., 1999). Ghrelin is the only known orexigenic hormone produced in the periphery (Nass et al., 2011) and directly enhances both expression and secretion of the orexigenic neuropeptides neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP) in the arcuate nucleus of the hypothalamus (Cowley et al., 2003; Kojima and Kangawa, 2005). Ghrelin promotes positive energy balance, serving as a short-term hunger signal and a long-term adiposity signal (Nakazato et al., 2001; Tschöp et al., 2000). It displays a strong growth hormone-releasing effect (Kojima et al., 1999; Smith et al., 1997) and has

many other physiological functions, including control of gastric motility, energy expenditure, pancreatic endocrine functions, and glucose metabolism (Muccioli et al., 2002).

Because of the wide spectrum of biological activities of ghrelin in neuroendocrine and metabolic pathways, numerous synthetic peptide and nonpeptide GHS-R1a ligands, acting as agonists, antagonists or inverse agonists, have been developed and tested (Moulin et al., 2007b). Whereas ghrelin receptor agonists represent substances that could be beneficial for the treatment of cachexia and food intake disorders (Akamizu and Kangawa, 2011; Maletínská et al., 2012; Pírník et al., 2011), antagonizing GHS-R1a could facilitate weight loss in patients with obesity (Nass et al., 2011).

Antagonizing GHS-R1a with the peptidic antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 caused a reduction of food intake and body weight gain in lean, *ob/ob* (leptin-deficient) and DIO (diet-induced obesity) mice. It also reduced food intake and body weight and improved obesity-related metabolic abnormalities in ovariectomized mice fed a high-fat diet, a model of postmenopausal obesity (Asakawa et al., 2003; Maletínská et al., 2011). [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7,9,Leu-11]-Substance P is a potent and highly efficacious

* Corresponding author. Address: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic. Tel.: +420 220183567; fax: +420 220183571.

E-mail address: maletin@uochb.cas.cz (L. Maletínská).

Nomenclature

| | | | |
|------------------|--|-----------|---|
| ACACA | acetyl-CoA carboxylase 1 | ID | internal diameter |
| AgRP | agouti-related peptide | IGF-1 | insulin-like growth factor 1 |
| AUC | area under curve | IPAT | intraperitoneal adipose tissue |
| β_2m | β_2 microglobulin | LC-MS | liquid chromatography-mass spectrometry |
| BAT | brown adipose tissue | LPL | lipoprotein lipase |
| b.w. | body weight | MRM | multiple reaction monitoring |
| C_{max} | maximal concentration of compound in blood | NPY | neuropeptide Y |
| CPT-1a/1b | carnitine palmitoyltransferase 1a/1b | PEG | polyethylene glycol |
| DIO | diet-induced obesity | PEPCK | phosphoenolpyruvate carboxykinase |
| ED ₅₀ | median effective dose | POMC | proopiomelanocortin |
| FABP-4 | fatty acid binding protein 4 | s.c. | subcutaneous |
| FASN | fatty acid synthase | SCAT | subcutaneous adipose tissue |
| GABA | gamma-aminobutyric acid | SREBP | sterol regulatory element-binding protein |
| GAPDH | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | St-1 | standard diet for mice |
| GH | growth hormone | $T_{1/2}$ | half-life of the compound in blood |
| GHS-R1a | growth hormone secretagogue receptor 1a (ghrelin receptor) | T_{max} | time at C_{max} |
| HF | high-fat (diet) | UCP1 | uncoupling protein 1 |

inverse agonist of GHS-R with potential anorexigenic activity (Petersen et al., 2009).

Several classes of small-molecule nonpeptide GHS-R1a antagonists have been described. 2,4-diaminopyrimidine derivatives decreased food intake and body weight in rats after acute oral administration (Serby et al., 2006). Piperidine-substituted quinazolinone derivatives were shown to improve glucose-stimulated insulin secretion, suppress appetite, and promote weight loss in rats and DIO mice after oral administration (Esler et al., 2007; Rudolph et al., 2007). Intraperitoneal administration of indolinone derivatives significantly improved glucose tolerance in mice and reduced food intake stimulated both by fasting conditions and by centrally administered ghrelin in rats (Puleo et al., 2012).

Some more recently developed nonpeptide GHS-R1a antagonists based on a trisubstituted 1,2,4-triazole structure (Demange et al., 2007; Moulin et al., 2007a; Moulin et al., 2008) suppressed ghrelin-induced and fasting-induced food intake after acute central administration in rats. These drugs also blocked the chronic effects of ghrelin on fat accumulation and consecutive weight gain after chronic central administration to rats (Salomé et al., 2009a,b). However, it was not clear whether the triazole-based GHS-R1a antagonists can lead to weight reduction after peripheral administration.

Therefore, in this study, we examined the acute effects of the trisubstituted triazole derivatives, JMV4208 and JMV3002, on food intake in lean mice. Furthermore, we studied the pharmacokinetics of these compounds in mouse blood, as well as their effects on food intake, body weight, metabolic parameters, and the expression of enzymes involved in fat metabolism after 14 days of chronic administration to mice with diet-induced obesity.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of GHS-R1a antagonists

JMV4208 and JMV3002 were synthesized at IBMM UMR5247, Faculté de Pharmacie, Montpellier. The synthesis and in vitro pharmacological characterization of the compounds was described previously by Moulin and colleagues (Moulin et al., 2008). The structures of both drugs are shown in Fig. 1.

2.2. Experimental animals

All experiments followed ethical guidelines for animal experiments and the Czech Republic law No. 246/1992 and were

approved by the Committee for Experiments with Laboratory Animals of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Inbred C57BL/6 male mice (Charles River, Germany) were housed at 23 °C with a 12-h light/dark cycle (light period starting at 6:00 a.m.). The animals had free access to water and a standard rodent chow diet that contained 25%, 9% and 66% of calories from protein, fat and carbohydrate, respectively (3.4 kcal/g; St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice, Czech Republic).

2.3. Acute effects of GHS-R1a antagonists on food intake

At the age of 12–14 weeks, the mice were randomly divided into experimental groups and were kept individually in separate cages for one week. The night before the experiment, the mice were fasted for 17 h with free access to water. At 8:00 a.m., the mice were injected subcutaneously (s.c.) with 1, 5, 10 or 20 mg/kg of body weight (b.w.) of JMV4208 or JMV3002 (dissolved in 50% polyethylene glycol 300 (PEG) in saline because of the limited solubility of the drugs in water, at volume of 0.2 ml/mouse), or with 0.2 ml of 50% PEG in saline ($n = 6$ mice per group). Food intake was monitored for 5 h at 30-min intervals. The animals had free access to water during the experiment.

2.4. Acute effects of JMV3002 co-administered with ghrelin on food intake

Fifteen-week-old mice were randomly divided into experimental groups of 5 animals and were kept individually in separate cages for one week. At 8:00 a.m., the fed mice were s.c. injected with 0.2 ml of saline, ghrelin, JMV3002, or JMV3002 co-administered with ghrelin at a dose of 5 mg/kg of b.w. for all compounds

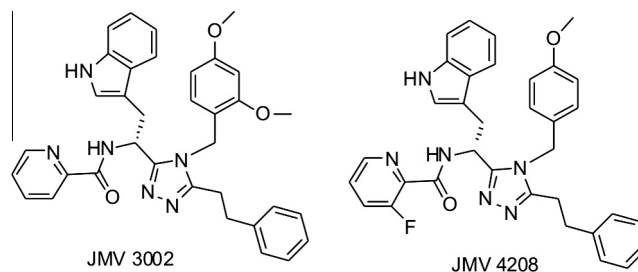


Fig. 1.

(37.7 nmol ghrelin/mouse, 213 nmol JMV3002/mouse). Food intake was monitored for 9 h at 30-min intervals. The animals had free access to water during the experiment.

2.5. Measurement of *in vivo* pharmacokinetics in the blood serum

The measurement of *in vivo* pharmacokinetics was performed as previously described (Holubová et al., 2013). Fifteen-week-old mice were s.c. injected with 0.2 ml of JMV4208 or JMV3002 dissolved in 50% PEG in saline at a dose of 5 mg/kg of b.w. ($n = 3$ mice per group). Blood was collected at 30, 60, 120, 240, and 480 min post-injection, and the blood plasma was isolated and stored at -20°C . The analyzed compounds were extracted from the blood plasma using an acetonitrile precipitation of proteins and then analyzed using a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) system. Chromatographic separation was performed in an Eclipse Plus C18 column, with a column size of 2.1 mm \times 50 mm ID, packed with 5 μm of sorbent. The system was equipped with a guard column that was 2.1 \times 12.5 mm ID and packed with the same sorbent (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The LC system consisted of a binary pump, a vacuum degasser, an autosampler and a temperature-controlled column compartment, all from the Agilent 1200 LC series (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The mass spectrometer API 3200 (Sciex, Concord, ON, Canada) was used as a detector. Compound-specific MRM were measured. The internal standard calibration method was used for quantification.

2.6. Effect of 14-day administration of GHS-R1a antagonists on food intake and metabolic parameters in mice with high-fat diet-induced obesity

From 8 weeks of age, C57BL/6 mice were supplied with a high-fat (HF) diet for 12 weeks to induce obesity. The energy content of the HF diet was 5.3 kcal/g, with 13%, 60%, and 27% of the calories derived from protein, fat, and carbohydrate, respectively. The HF diet consisted of 40% standard St-1 diet, 34% powdered cow-milk-based human baby formula, 25% lard, and 1% corn starch w/w (Kopecký et al., 1996). Mice were categorised to DIO-prone and DIO-resistant groups with *ad libitum* access to HF diet (Archer et al., 2003; Levin and Keeseey, 1998; Levin and Dunn-Meynell, 2002). Mice resistant to the HF diet (approximately 15% of animals on the HF diet) were withdrawn from the experiment. The average body weight of the mice used for the following experiments was 47 g (the usual body weight of lean C57BL/6 male mice of the same age is 25–30 g).

The mice were divided into seven groups of 10 animals and placed into separate cages with free access to the HF diet and water. At the age of 20 weeks, they were subjected to a 14-day food intake experiment. Five groups were injected s.c. either with the vehicle solution (50% PEG in saline; control group) or with JMV4208 and JMV3002 dissolved in the vehicle, at a dose of 10 or 20 mg/kg of b.w. twice a day (at 8:00 a.m. and 6:00 p.m.). The amount of the HF diet consumed and the weight of the mice were monitored simultaneously. The remaining two groups served as pair-fed controls to the animals treated with JMV4208 and JMV3002 at a dose of 20 mg/kg of b.w.; every pair-fed group consumed the same amount of the high-fat diet as did the group treated with the corresponding drug during the corresponding day of the experiment.

At the end of the experiment, overnight-fasted mice were sacrificed by decapitation at 8:00 a.m. The trunk blood was collected, and the plasma was then separated and stored at -20°C . The intra-peritoneal (omental) adipose tissue (IPAT), subcutaneous adipose tissue (SCAT), brown adipose tissue (BAT), perirenal adipose tissue and livers of all the mice were dissected. SCAT and BAT were dissected completely, in case of IPAT only the omental fat pads and

not the adipose tissue around the intestines were collected. Tissue samples were weighed, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C for later extraction of RNA. The degree of adiposity was expressed as the fat-to-body weight ratio (ratio of the total adipose tissue weight to the total body weight). The brains were dissected, placed into isopentane at -15 to -20°C for one minute, frozen on dry ice, and kept at -70°C until sectioning. Two hundred-micrometer-thick coronal sections were cut (starting -1.25 mm from the bregma) using a cryostat, mounted on glass slides, and immersed in absolute ethanol for 50 s. The medial basal hypothalamus (including the median eminence, arcuate nuclei, ventromedial nuclei, and dorsomedial nuclei) was immediately dissected with a razor blade from a series of sections under a microscope. The tissue was homogenized in RNA extraction lysis buffer, and kept at -70°C until RNA extraction.

2.7. Determination of hormonal and biochemical parameters

The plasma insulin and adiponectin concentrations were measured by RIA assays (Millipore, St. Charles, MI, USA and Linco Research, St. Charles, MI, USA, respectively), and the leptin concentrations were determined by ELISA assay (Millipore, St. Charles, MI, USA). The serum glucose levels were measured using a Glucocard glucometer (Arkray, Kyoto, Japan). The serum triglyceride levels were measured by quantitative enzymatic reaction (Sigma, St. Louis, USA). All measurements were carried out according to the protocols recommended by the manufacturers.

2.8. Determination of mRNA expression

Samples of adipose tissue (brown, subcutaneous, and abdominal plus gonadal) and liver were homogenized with a MagNA Lyser Instrument using MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The total RNA was extracted from the homogenized samples with a MagNA Pure instrument using a MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The RNA concentration was determined from the absorbance at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). For reverse transcription to synthesize the first-strand cDNA, 0.25 μg of the total RNA was used with random primers, following the manufacturer's instructions in the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The following genes of interest were selected for PCR identification: uncoupling protein 1 (UCP1) in BAT; acetyl-CoA carboxylase 1 (ACACA), fatty acid synthase (FASN), lipoprotein lipase (LPL), adiponectin, leptin, and fatty acid binding protein 4 (FABP-4) in SCAT and IPAT; and ACACA, FASN, LPL, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), sterol regulatory element-binding protein (SREBP), and carnitine palmitoyltransferase 1a/1b (CPT-1a/1b) in liver. Amplification of the mRNA was performed using an ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, NO AmpErase[®] UNG, specific TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and nuclease-free water (Fermentas Life Science, Vilnius, Lithuania). The PCR amplifications were performed at least in duplicate, in a total reaction volume of 25 μl , using standard conditions (50 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min, followed by 40 cycles of 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s and 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min). The expression of beta-2-microglobulin (B2 M) was used to compensate for variations in input RNA amounts and in the efficiency of the reverse transcription, and the modified formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$ was used to calculate the relative gene expression.

The total RNA from the medial basal hypothalamus was isolated using the RNAqueous Micro Kit (Ambion, Austin, TX, USA). The concentration of RNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm with a NanoDrop 2000 Spectrophotometer

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA samples were reverse-transcribed to yield cDNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The quantitative PCR reactions were performed using TaqMan Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A fluorogenic probe for the control GAPDH gene was labeled with the VIC reporter dye. Probes for the target genes, NPY, AgRP, and POMC were labeled with the FAM reporter dye. The reactions were performed using the TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The samples were run in triplicate. The thermal cycling was performed in accordance with the manufacturer's protocol as follows: one initial setup step for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Data were collected using the CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Input RNA amounts were calculated with a multiple comparative method for the mRNAs of interest and GAPDH. The statistical analyses were performed using GenEx Ver. 5 software (MultiD Analyses AB, Goteborg, Sweden).

MIQE compliance of the RT-PCR method described in the manuscript is guaranteed by the material manufacturer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Both of the housekeeping genes used in the assays demonstrated invariant gene expression.

2.9. Statistical analysis

The data are presented as the means ± SEM for the number of animals indicated in the figures and tables. They were analyzed by either a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni *post hoc* test, or a one-way ANOVA followed by the Dunnett's *post hoc* test or a t-test, as stated in the figure and table legends, using the Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant. In the acute food intake test, the ED₅₀ value, the dose of the compound required to obtain half of the response of the vehicle-treated group at the time of the maximum response (45 min post-injection), was calculated using GraphPad software.

3. Results

3.1. Acute effects of GHS-R1a antagonists on food intake

Both compounds decreased the fasting-induced food intake relative to controls; a significant effect was observed from a dose of 5 mg/kg of b.w. Food intake was reduced in a dose-dependent manner. The ED₅₀ was 2.05 mg/kg of b.w. for JMV3002 (Fig. 2A) and 5.25 mg/kg of b.w. for JMV4208 (Fig. 2B).

3.2. Antagonizing of the ghrelin-mediated increase in food intake with JMV3002

Subcutaneously administered JMV3002 at a dose of 5 mg/kg of b.w. suppressed the ghrelin-induced increase in food intake in fed lean mice. Food intake after the co-administration of both compounds at the same dose was comparable to the food intake of the control group, whereas JMV3002 administered alone at 5 mg/kg of b.w. significantly decreased food intake compared with the control group (Fig. 3).

3.3. Pharmacokinetics of GHS-R1a antagonists in vivo

JMV4208 and JMV3002 reached their maximum blood concentration 30 min after s.c. injection and disappeared from the blood completely within 8 h, with a slow decline in the blood concentration from 2 to 8 h after administration. The half-life of JMV4208

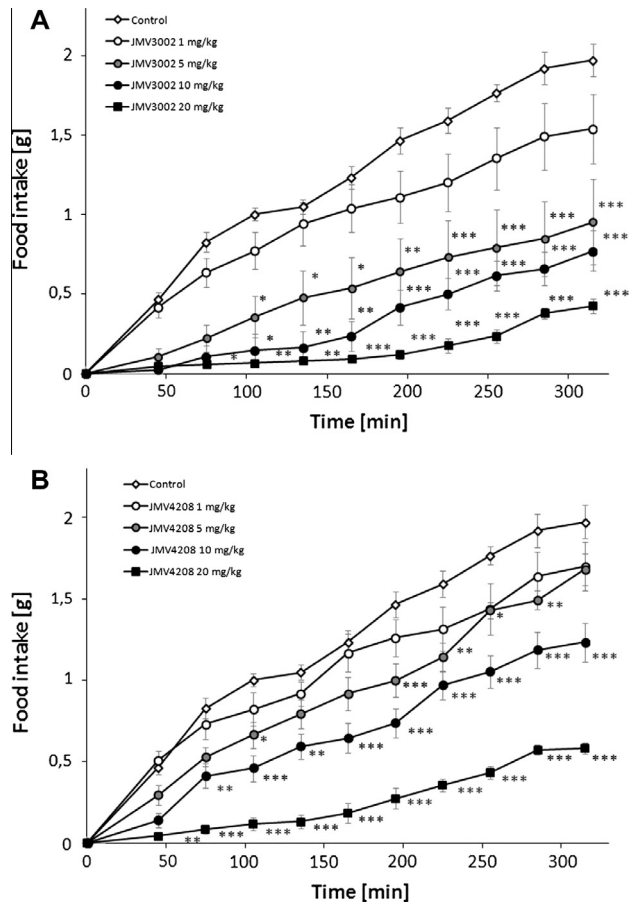


Fig. 2.

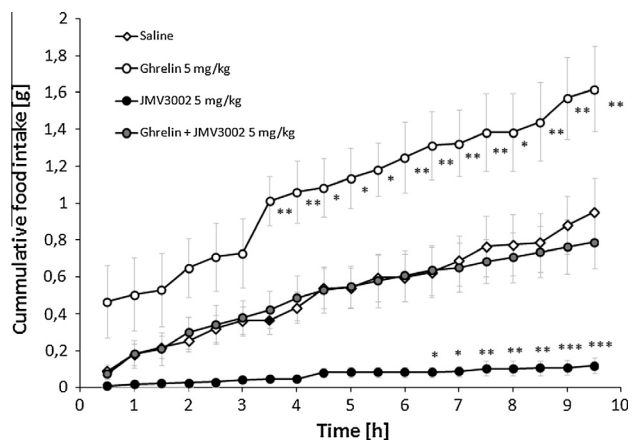


Fig. 3.

was 90 min, and the half-life of JMV3002 was 60 min (Fig. 4 and Q3 Table 1).

3.4. Effects of 14 days of GHS-R1a antagonists administration on food intake, body weight, adiposity, and metabolic parameters in obese (DIO) mice

Based on the results from the acute food intake experiment, a dose of 10 mg/kg of b.w. which caused the most significant effect was chosen for chronic administration of the GHS-R1a antagonists. Additionally, to ensure a clear effect, the higher dose of 20 mg/kg of

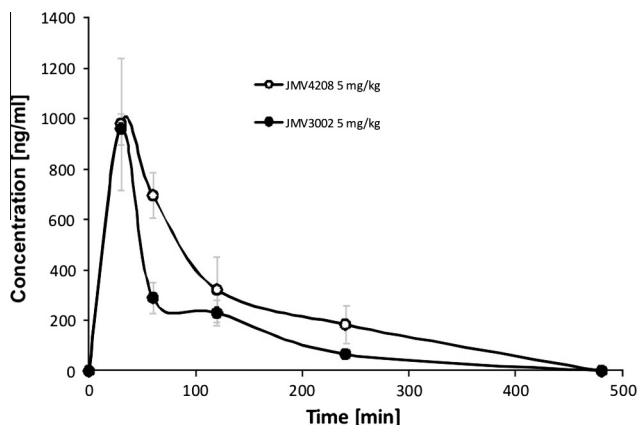


Fig. 4.

b.w. was also included in the experiment. Fourteen days of treatment with JMV4208 and JMV3002 at both doses significantly decreased food intake in DIO mice compared with the controls (Fig. 5A, B). Their mean body weights were reduced by 10% and 15% after their treatment with JMV4208 and JMV3002, respectively, whereas that of the control group was reduced by approximately 4%. To examine the relative contribution of reduced food intake to the observed weight loss, a group was included that was pair-fed to the higher dose group (20 mg/kg of b.w.). The weight loss of the pair-fed groups was less pronounced, but it reached statistical significance by day 14 in the case of JMV3002 PF group when compared with the controls (Fig. 6A and B).

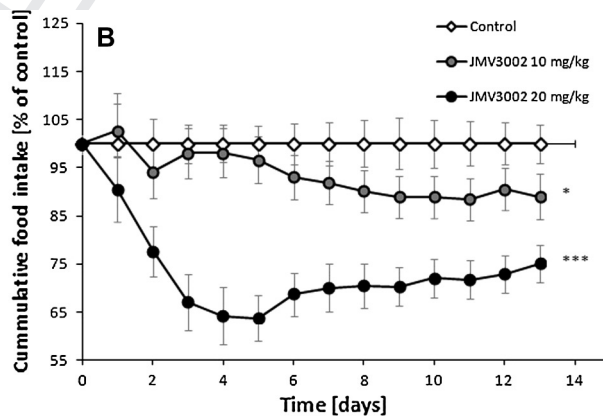
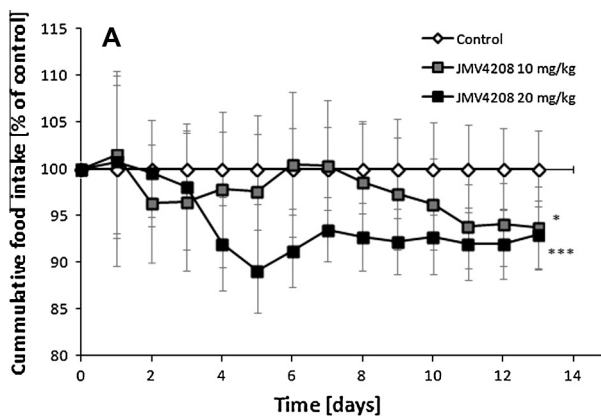


Fig. 5.

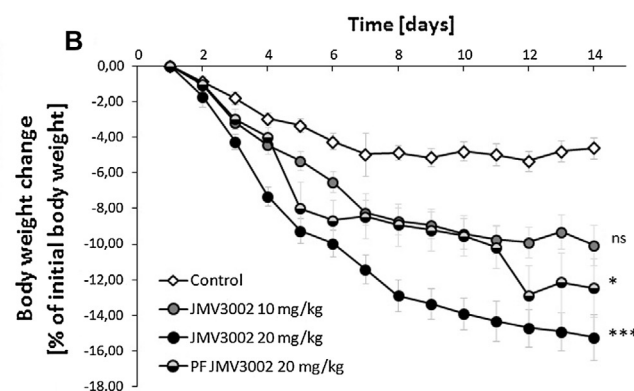
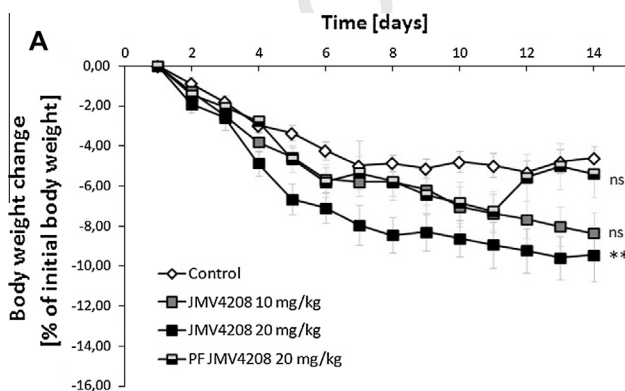


Fig. 6.

Both antagonists lowered the total adipose tissue mass by decreasing subcutaneous and perirenal fat, while intraperitoneal fat and brown fat were not affected. Additionally, both of the drugs caused decreased liver mass (Table 2). The compounds also tended to normalize the animals' insulin levels, although these results were not statistically significant. Moreover, the circulating leptin levels were reduced in proportion to the decrease in adipose tissue mass, while the adiponectin levels were not affected. No significant changes in the basal glucose levels were observed after the mice were treated with the antagonists (Table 3).

3.5. Changes in gene expression of markers of lipid metabolism and UCP1 after 14 days of GHS-R1a antagonists administration in obese (DIO) mice

Chronic administration of JMV4208 at a dose of 20 mg/kg of b.w. significantly decreased the mRNA expression of acetyl-CoA carboxylase 1 (Fig. 7A) and fatty acid synthase (Fig. 7B) in subcutaneous adipose tissue and mRNA expression of fatty acid synthase in intraperitoneal adipose tissue (Fig. 7D). Chronic treatment with JMV3002 caused a significant reduction in the gene expression of fatty acid synthase in subcutaneous adipose tissue (Fig. 7B). The decrease in mRNA expression of acetyl-CoA in intraperitoneal adipose tissue was not statistically significant (Fig. 7C). Neither of the antagonists affected leptin mRNA levels in intraperitoneal or subcutaneous adipose tissue (data not shown). The expression of acetyl-CoA carboxylase 1, carnitine palmitoyltransferase 1a/1b, and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver was not affected by the ghrelin antagonists (data not shown). UCP1 gene

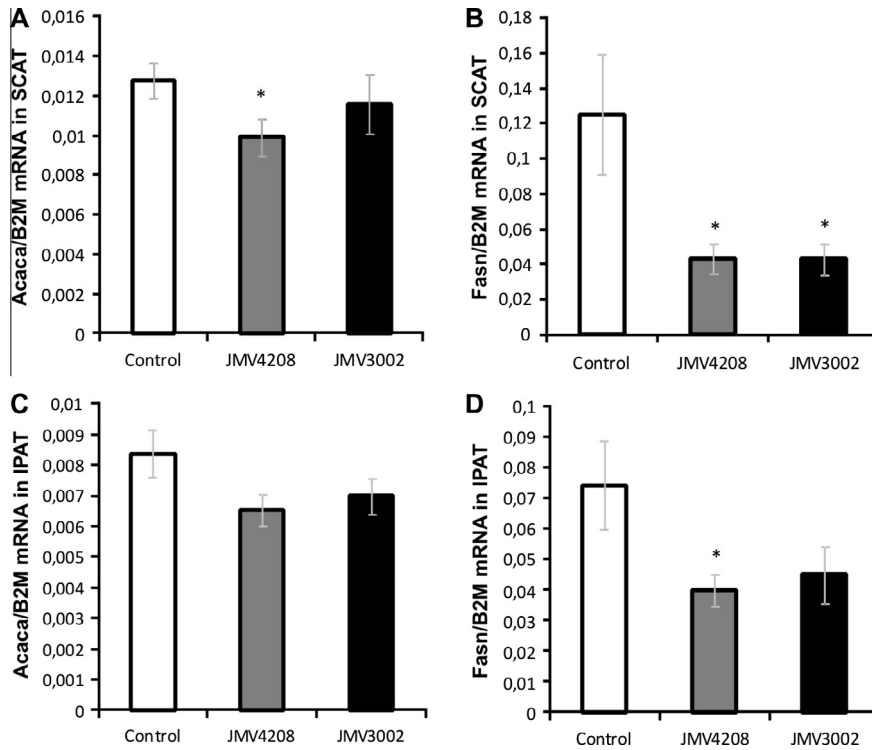


Fig. 7.

expression in brown adipose tissue was not significantly affected by either JMV4208 or JMV3002 (data not shown).

3.6. Changes in the expression of food intake-regulating neuropeptides in the medial basal hypothalamus after the 14-day GHS-R1a antagonists administration in obese (DIO) mice

Chronic administration of JMV4208 and JMV3002 at a dose of 20 mg/kg of b.w. significantly decreased the expression of proopiomelanocortin (POMC) mRNA in the medial basal hypothalamus (Fig. 8A). The reduced expression of neuropeptide Y (NPY) mRNA (Fig. 8B) and agouti-related peptide (AgRP) mRNA (Fig. 8C) was not statistically significant.

4. Discussion

Obesity and its associated health risks are drastically increasing worldwide (Caballero, 2007), driving the demand for novel pharmacological treatment methods. Blocking the actions of ghrelin through GHS-R1a receptor antagonism is a promising approach for anti-obesity therapy; thus, several synthetic GHS-R1a

antagonists or inverse agonists have been developed and tested (Chollet et al., 2009; Moulin et al., 2007b; Zhao and Liu, 2006). Ghrelin antagonism or blocking also seems to be potentially beneficial in some conditions associated with hyperphagia, e.g. Prader-Willi syndrome, which is linked with elevated plasma ghrelin levels (Cummins et al., 2002; Kobelt et al., 2006).

In this study, we tested two novel ghrelin antagonists that were based on a trisubstituted triazole structure. We investigated their acute impact on food intake in lean mice and their long-term effects on food intake, body weight, and lipid metabolism in mice with diet-induced obesity.

Previously described acute food intake experiments examined intracerebroventricular administration of triazole-based GHS-R1a antagonists in rats (Salomé et al., 2009a) and both intracerebroventricular and intraperitoneal injection of [Dlys³]-GHRP-6 in mice (Asakawa et al., 2003). Similarly to the results of those experiments, we showed that subcutaneously administered ghrelin antagonists, JMV4208 and JMV3002, decreased fasting-induced food intake in lean mice. JMV3002 suppressed food intake induced by s.c. co-administered ghrelin in lean mice. This result is in accordance with previous studies with other GHS-R1a antagonists,

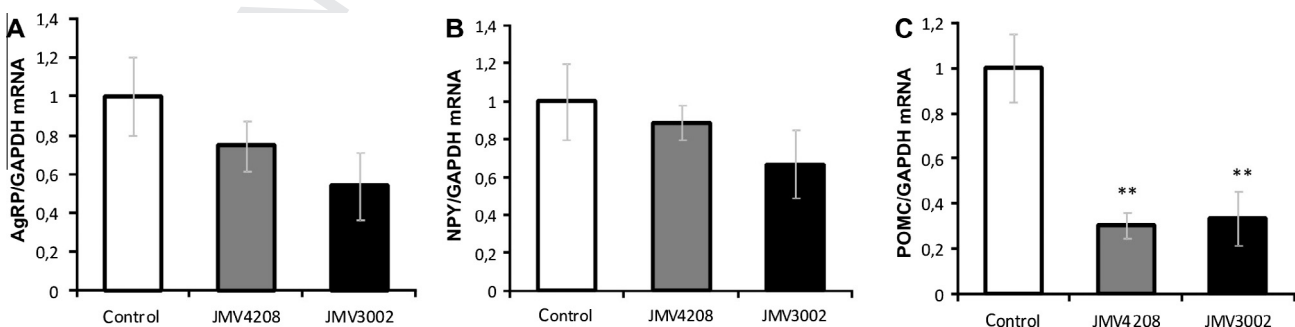


Fig. 8.

which have shown that acute administration of the compounds suppressed food intake in fasted lean mice and eliminated the stimulatory effect on feeding induced by peripheral injection of ghrelin in lean mice (Esler et al., 2007; Rudolph et al., 2007).

The pharmacokinetics of JMV4208 and JMV3002 in mice showed that after subcutaneous administration, both drugs promptly entered the blood stream and reached a peak concentration within 30 min. Both GHS-R1a antagonists were completely eliminated from the blood 8 h after administration, indicating their relatively good stability *in vivo*, compared with the peptidic ghrelin antagonist, [Dlys³]-GHRP-6, which reached a zero concentration 130 min after administration in mice (Maletínská et al., 2011).

After two weeks of s.c. administration of JMV4208 and JMV3002 in mice with high-fat diet-induced obesity, cumulative food intake and body weight decreased. However, the body weight of the control group receiving the vehicle injections was also slightly lowered, similar to our previous study (Maletínská et al., 2011), in which a weight loss of approximately 3 g was observed after 7 days of s.c. administration of saline. This result may have occurred because the C57BL/6 DIO model is rather sensitive to the manipulation and s.c. injection. Nevertheless, the decrease in body weight induced by the GHS-R1a antagonists was significantly more pronounced than the change observed in the control vehicle-injected group.

The weight loss in the groups treated with the 20 mg/kg doses of both antagonists was greater than that of the pair-fed groups. Nevertheless, there was no significant difference between the pair-fed groups and the groups treated with the corresponding drug (except of days 12–14, JMV4208 PF group). We hypothesize that this non-significant difference could be partially caused by mechanisms others than food intake reduction and consecutive adipose tissue reduction, e.g. enhanced energy expenditure. This possibility is suggested by the mildly increased mRNA expression of UCP-1 in brown adipose tissue (data not shown). UCP-1 regulates energy expenditure via the production of heat (Clapham, 2011) and its expression is downregulated by ghrelin (Tsubone et al., 2005).

The decrease in body weight after chronic treatment with the GHS-R1a antagonists was due to a reduction in stored fat that was followed by a decrease in circulating leptin levels. However, neither the circulating adiponectin levels nor the adiponectin mRNA expression in adipose tissue were affected. As the relative leptin mRNA expression was not lowered in subcutaneous or visceral adipose tissue, we suggest that the attenuated leptin secretion resulted from the decreased mass of adipose tissue.

Both GHS-R1a antagonists tended to lower insulin and glucose levels in DIO mice, but the decrease was not statistically significant. In contrast, orally administered quinazolinone-based GHS-R1a antagonists were reported to improve glucose-induced insulin secretion in DIO male mice (Esler et al., 2007; Rudolph et al., 2007). [Dlys³]-GHRP-6 attenuated both glucose and insulin levels in ovariectomized DIO mice but not in those with intact ovaries (Maletínská et al., 2011).

The JMV3002-induced decrease in liver weight of DIO mice was likely due to a loss of accumulated fat. However, neither acetyl-CoA carboxylase nor fatty acid synthase, enzymes that catalyze lipogenesis, nor carnitine palmitoyltransferase, which catalyzes lipolysis, were affected by the GHS-R1a antagonists at the mRNA level (data not shown).

The GHS-R1a antagonists showed the most pronounced peripheral effects in adipose tissue, where they attenuated subcutaneous and peritoneal fat mass, as well as the total fat mass. Analogously, GHS-R1a-deficient mice have a lower body weight mainly due to decreased adiposity (Zigman et al., 2005), and ghrelin administration conversely induces adiposity in rodents (Tschöp et al., 2000). The decreased adipose tissue mass observed in this study was most

likely mediated by the lower gene expression of the lipogenic enzymes acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase. Conversely, an increase in adiposity induced by centrally administered ghrelin was found to be mediated by an enhanced expression of acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase in white adipocytes in a previous study. (Theander-Carrillo et al., 2006).

Briggs et al. (Briggs et al., 2010) suggested that obesity impairs NPY/AgRP neuronal function in the arcuate nucleus (ARC), suppresses the neuroendocrine ghrelin axis, and causes central hypothalamic ghrelin resistance in DIO mice. They also suggested that DIO decreases the expression of AgRP and NPY mRNA and that centrally administered ghrelin is unable to promote the expression of these genes in mice with DIO. Analogously we can conclude from this study that DIO mice may be resistant to the effects of GHS-R1a antagonists at the level of NPY/AgRP mRNA expression.

In another article, Briggs and Andrews (Briggs and Andrews, 2011) suggested that in DIO mice, ghrelin does not presumably inhibit POMC neurons via GABA inhibitory inputs from NPY/AgRP neurons. This maintains the suppressive effect of the POMC peptide, α -MSH, on food intake. The mechanisms causing NPY/AgRP resistance to ghrelin may be related to hyperglycemia and hyperinsulinemia associated with DIO. At DIO, POMC neurons are regulated mainly by leptin. Body weight reduction causes drop in leptin blood levels, which leads to the reduction of POMC expression.

The ghrelin receptor antagonists, JMV4802 and JMV3002, induced a decrease in adipose tissue mass followed by a decline in plasma leptin levels that could be linked to attenuated hypothalamic expression of POMC mRNA. These results complement those described by Perello et al. (2012), who found that GHS-R1a-deficient mice retained sensitivity to the anorexigenic and body-weight-lowering effects of exogenously administered leptin.

5. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that the novel triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 show relatively long stability in mouse blood and attenuate food intake after a single administration in lean mice. In mice with diet induced obesity, both compounds decreased food intake and body weight. The GHS-R1a antagonists decreased the amount of adipose tissue by lowering the gene expression of lipogenic enzymes. This decrease in adipose tissue yielded lower leptin levels. The anorexigenic effect of the compounds could be potentially beneficial in anti-obesity therapy or in therapy of other conditions associated with hyperphagia.

Declaration of interest

There is no conflict of interest to declare.

Funding

This research was supported by the Grant Agency of the Charles University in Prague (project GA UK No. 560112) and RVO: 61388963 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. J. Kuneš (Institute of Physiology, AS CR) for critically reading the manuscript, Dr. Z. Pirnik (Institute of Experimental Endocrinology, SAS, Slovakia) for kindly helping with the isolation of the medial basal hypothalamus, and H. Vysušilová for providing excellent technical assistance.

References

- Akamizu, T., Kangawa, K., 2011. Therapeutic applications of ghrelin to cachexia utilizing its appetite-stimulating effect. *Peptides* 32, 2295–2300.
- Archer, Z.A., Rayner, D.V., Rozman, J., Klingenspor, M., Mercer, J.G., 2003. Normal distribution of body weight gain in male Sprague–Dawley rats fed a high-energy diet. *Obes. Res.* 11, 1376–1383.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Katsura, G., Fujimiyama, M., Fujino, M.A., Kasuga, M., 2003. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52, 947–952.
- Briggs, D.I., Andrews, Z.B., 2011. Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology* 93, 48–57.
- Briggs, D.I., Enriore, P.J., Lemus, M.B., Cowley, M.A., Andrews, Z.B., 2010. Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology* 151, 4745–4755.
- Caballero, B., 2007. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol. Rev.* 29, 1–5.
- Chollet, C., Meyer, K., Beck-Sickinger, A.G., 2009. Ghrelin—a novel generation of anti-obesity drug: design, pharmacomodulation and biological activity of ghrelin analogues. *J. Pept. Sci.* 15, 711–730.
- Clapham, J.C., 2011. Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology*.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., Horvath, T.L., 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649–661.
- Cummings, D.E., Clement, K., Purnell, J.Q., Vaisse, C., Foster, K.E., Frayo, R.S., Schwartz, M.W., Basdevant, A., Weigle, D.S., 2002. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat. Med.* 8, 643–644.
- Demange, L., Boeglin, D., Moulin, A., Mousseaux, D., Ryan, J., Bergé, G., Gagne, D., Heitz, A., Perrissoud, D., Locatelli, V., Torsello, A., Galleyrand, J.C., Fehrentz, J.A., Martinez, J., 2007. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations of novel triazole derivatives as ligands of the ghrelin receptor. *J. Med. Chem.* 50, 1939–1957.
- Esler, W.P., Rudolph, J., Claus, T.H., Tang, W., Barucci, N., Brown, S.E., Bullock, W., Daly, M., Decarr, L., Li, Y., Milardo, L., Molstad, D., Zhu, J., Gardell, S.J., Livingston, J.N., Sweet, L.J., 2007. Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology* 148, 5175–5185.
- Holubová, M., Spolcová, A., Demianová, Z., Sýkora, D., Fehrentz, J.A., Martinez, J., Stofková, A., Jurčovičová, J., Drápalová, J., Lacinová, Z., Haluzík, M., Zelezná, B., Maletínská, L., 2013. Ghrelin agonist JMV 1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice. *Physiol. Res.* 62, 435–444.
- Kobelt, P., Helmling, S., Stengel, A., Wlotzka, B., Andresen, V., Klapp, B.F., Wiedenmann, B., Klusmann, S., Mönnikes, H., 2006. Anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11 inhibits neurostimulatory and orexigenic effects of peripheral ghrelin in rats. *Gut* 55, 788–792.
- Kojima, M., Kangawa, K., 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* 85, 495–522.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.
- Kopecký, J., Hodný, Z., Rossmeisl, M., Syrový, I., Kozak, L.P., 1996. Reduction of dietary obesity in *ap2-Ucp* transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am. J. Physiol.* 270, E786–788.
- Levin, B.E., Dunn-Meynell, A.A., 2002. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, R46–R54.
- Levin, B.E., Keesey, R.E., 1998. Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. *Am. J. Physiol.* 274, R412–9.
- Maletínská, L., Matyšková, R., Maixnerová, J., Sýkora, D., Pýchová, M., Spolcová, A., Blechová, M., Drápalová, J., Lacinová, Z., Haluzík, M., Zelezná, B., 2011. The Peptidic GHS-R antagonist [D-Lys(3)]GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 343, 55–62.
- Maletínská, L., Pýchová, M., Holubová, M., Blechová, M., Demianová, Z., Elbert, T., Zelezná, B., 2012. Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 340, 781–786.
- Moulin, A., Demange, L., Bergé, G., Gagne, D., Ryan, J., Mousseaux, D., Heitz, A., Perrissoud, D., Locatelli, V., Torsello, A., Galleyrand, J.C., Fehrentz, J.A., Martinez, J., 2007a. Toward potent ghrelin receptor ligands based on trisubstituted 1,2,4-triazole structure. 2. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations. *J. Med. Chem.* 50, 5790–5806.
- Moulin, A., Ryan, J., Martinez, J., Fehrentz, J.A., 2007b. Recent developments in ghrelin receptor ligands. *ChemMedChem* 2, 1242–1259.
- Moulin, A., Demange, L., Ryan, J., Mousseaux, D., Sanchez, P., Bergé, G., Gagne, D., Perrissoud, D., Locatelli, V., Torsello, A., Galleyrand, J.C., Fehrentz, J.A., Martinez, J., 2008. New trisubstituted 1,2,4-triazole derivatives as potent ghrelin receptor antagonists. 3. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations. *J. Med. Chem.* 51, 689–693.
- Muccioli, G., Tschöp, M., Papotti, M., Deghenghi, R., Heiman, M., Ghigo, E., 2002. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur. J. Pharmacol.* 440, 235–254.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., Matsukura, S., 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194–198.
- Nass, R., Gaylinn, B.D., Thorne, M.O., 2011. The ghrelin axis in disease: potential therapeutic indications. *Mol. Cell. Endocrinol.* 340, 106–110.
- Perello, M., Scott, M.M., Sakata, I., Lee, C.E., Chuang, J.C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Elmquist, J.K., Zigman, J.M., 2012. Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *J. Comp. Neurol.* 520, 281–294.
- Petersen, P.S., Woldbye, D.P., Madsen, A.N., Egerod, K.L., Jin, C., Lang, M., Rasmussen, M., Beck-Sickinger, A.G., Holst, B., 2009. In vivo characterization of high Basal signaling from the ghrelin receptor. *Endocrinology* 150, 4920–4930.
- Pirnik, Z., Bundziková, J., Holubová, M., Pýchová, M., Fehrentz, J.A., Martinez, J., Zelezná, B., Maletínská, L., Kiss, A., 2011. Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. *Neurochem. Int.* 59, 889–895.
- Puleo, L., Marini, P., Avallone, R., Zanchet, M., Bandiera, S., Baroni, M., Croci, T., 2012. Synthesis and pharmacological evaluation of indolinone derivatives as novel ghrelin receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 5623–5636.
- Rudolph, J., Esler, W.P., O'connor, S., Coish, P.D., Wickens, P.L., Brands, M., Bierer, D.E., Bloomquist, B.T., Bondar, G., Chen, L., Chuang, C.Y., Claus, T.H., Fathi, Z., Fu, W., Khire, U.R., Kristie, J.A., Liu, X.G., Lowe, D.B., McClure, A.C., Michels, M., Ortiz, A.A., Ramsden, P.D., Schoenleber, R.W., Shelekhin, T.E., Vakilopoulos, A., Tang, W., Wang, L., Yi, L., Gardell, S.J., Livingston, J.N., Sweet, L.J., Bullock, W.H., 2007. Quinazolinone derivatives as orally available ghrelin receptor antagonists for the treatment of diabetes and obesity. *J. Med. Chem.* 50, 5202–5216.
- Salomé, N., Haage, D., Perrissoud, D., Moulin, A., Demange, L., Egecioglu, E., Fehrentz, J.A., Martinez, J., Dickson, S.L., 2009a. Anorexigenic and electrophysiological actions of novel ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonists in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 612, 167–173.
- Salomé, N., Hansson, C., Taube, M., Gustafsson-Ericson, L., Egecioglu, E., Karlsson-Lindahl, L., Fehrentz, J.A., Martinez, J., Perrissoud, D., Dickson, S.L., 2009b. On the central mechanism underlying ghrelin's chronic pro-obesity effects in rats: new insights from studies exploiting a potent ghrelin receptor antagonist. *J. Neuroendocrinol.* 21, 777–785.
- Serby, M.D., Zhao, H., Szczepankiewicz, B.G., Kosogof, C., Xin, Z., Liu, B., Liu, M., Nelson, L.T., Kaszubska, W., Falls, H.D., Schaefer, V., Bush, E.N., Shapiro, R., Droz, B.A., Knourek-Segel, V.E., Fey, T.A., Brune, M.E., Beno, D.W., Turner, T.M., Collins, C.A., Jacobson, P.B., Sham, H.L., Liu, G., 2006. 2,4-Diaminopyrimidine derivatives as potent growth hormone secretagogue receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 49, 2568–2578.
- Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., Feighner, S.D., Cheng, K., Hickey, G.J., Wyvrat, M.J., Fisher, M.H., Nargund, R.P., Patchett, A.A., 1997. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.* 18, 621–645.
- Theander-Carrillo, C., Wiedner, P., Cettour-Rose, P., Nogueiras, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P., Castaneda, T.R., Muzzin, P., Schürmann, A., Szanto, I., Tschöp, M.H., Rohner-Jeanrenaud, F., 2006. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J. Clin. Invest.* 116, 1983–1993.
- Tschöp, M., Smiley, D.L., Heiman, M.L., 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908–913.
- Tsubone, T., Masaki, T., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., Yoshimatsu, H., 2005. Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regul. Pept.* 130, 97–103.
- Zhao, H., Liu, G., 2006. Growth hormone secretagogue receptor antagonists as anti-obesity therapies? Still an open question. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 9, 509–515.
- Zigman, J.M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J.N., Lee, C.E., Jones, J.E., Deysher, A.E., Waxman, A.R., White, R.D., Williams, T.D., Lachey, J.L., Seeley, R.J., Lowell, B.B., Elmquist, J.K., 2005. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 115, 3564–3572.

607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679

