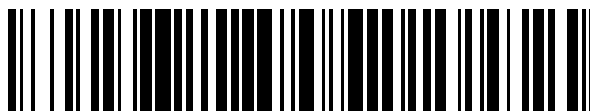


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 879**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07711099 .7**

96 Fecha de presentación: **23.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1994939**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene GHRP-6 para prevenir y eliminar las fibrosis y otros depósitos patológicos en tejidos**

30 Prioridad:
28.02.2006 CU 482006

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2012

73 Titular/es:
**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB)
AVENIDA 31 ENTRE 158 Y 190, CUBANACAN
PLAYA
CIUDAD DE LA HABANA 10600, CU**

72 Inventor/es:
**BERLANGA ACOSTA, Jorge;
CIBRIAN VERA, Danay;
GARCÍA DEL BARCO HERRERA, Diana;
GUILLÉN NIETO, Gerardo, Enrique;
SUAREZ ALBA, José;
LOPEZ MOLA, Ernesto;
SELMAN-HOUSEIN SOSA, Manuel y
VAZQUEZ CASTILLO, Mariela**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 388 879 T3

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que contiene GHRP-6 para prevenir y eliminar las fibrosis y otros depósitos patológicos en tejidos

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere al campo de la industria farmacéutica y la medicina, más específicamente al uso de péptidos secretagogos que cuando se administran repetidamente como composición farmacéutica previenen y eliminan los depósitos patológicos de material fibrótico en tejidos parenquimatosos internos como en el hígado, los pulmones, el esófago, el intestino delgado, los riñones, los vasos sanguíneos, las articulaciones y otras formas sistémicas de fibrosis cutánea de cualquier etiopatogenia.

10 **Estado de la técnica anterior**

- Los procesos de fibrosis comprenden un grupo de entidades patológicas de carácter mono-orgánico o sistémico que se caracterizan por el depósito anormal de matriz extracelular en el parénquima de casi todos los órganos internos, los vasos sanguíneos o la piel. Estas se consideran una consecuencia de acontecimientos autoinmunitarios complejos o de respuestas intersticiales a eventos imitativos e inflamatorios prolongados. En sentido general, se produce un depósito excesivo de material colagenoso en el parénquima por células intersticiales efectoras o a partir del material estromático expandido que oblitera el tejido funcional. Las células efectoras de estos procesos son de origen mesenquimatoso y suelen ser bastante específicas de acuerdo con el tejido afectado. En sentido general se ha implicado a los mio-fibroblastos como causa de fibrosis patológicas. Los mecanismos que favorecen la implantación de las fibrosis son complejos, y resultan aún poco conocidos. De todas formas, con independencia del órgano diana se considera que participan en estos acontecimientos el factor de crecimiento transformante de tipo beta (TGF- β), el factor de crecimiento derivado del tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Las fibrosis a largo plazo son generalmente mortales y no hasta ahora no existe una cura. A continuación, los autores abordarán algunos aspectos técnicos referidos a los procesos de fibrosis en algunos órganos (Ding J, Yu J, Wang C, Hu W, Li D, Luo Y, Luo H, Yu H. *Ginkgo biloba* extract alleviates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Liver International* 2005; 25: 1224-1232.) (Friedman 8L. Reversal of hepatic fibrosis - Fact or fantasy? *Hepatology*. 2006 Jan 30;43(81):882-888)

Fibrosis hepática

- Quando se ocasiona un daño en el hígado, la respuesta inflamatoria y la remodelación de la matriz extracelular (ME) restauran la función y la arquitectura normal de este órgano. Sin embargo, cuando el daño persiste, existe una alteración del equilibrio de los factores implicados en la reparación y resolución del problema altera la refutación de la ME y estimula la síntesis excesiva de sus componentes. El hígado es el principal órgano involucrado en la regulación del metabolismo, en la filtración de la sangre y en la regulación hormonal. Las células estrelladas hepáticas (HSC) se localizan en el espacio que se forma entre las células endoteliales y los hepatocitos, llamado espacio de Disse o espacio sinusoidal, desde donde rodean a las células endoteliales con sus largos procesos citoplasmáticos. Las HSC son capaces de sintetizar y secretar componentes de la ME y representan una fuente importante en procesos fibróticos. Almacenan esteres de retinilo, sintetizan factores de crecimiento y otras citocinas, además de su papel en la regulación del flujo sanguíneo sinusoidal. Las HSC pueden pasar de un estado quiescente a un estado activo inducido por la secreción paracrina de citocinas proinflamatorias, por la producción de especies reactivas del oxígeno o bien por cambios en la estructura de la ME que afectan al fenotipo celular. Durante su activación, las HSC se diferencian en miofibroblastos de forma alargada, que expresan a-actina de músculo liso y pierden el retinol almacenado. En este estado las HSC adquieren nuevas propiedades que les ayudan a mantener y amplificar la respuesta inflamatoria: capacidad proliferativa, contractibilidad, producción de citocinas y principalmente la síntesis y secreción de componentes de la ME. Entre los principales factores que estimulan la producción de proteínas de la ME en HSC activadas esta el TGF- β , sintetizado principalmente en la fase de activación por células de Kupffer; en la fase de perpetuación se produce TGF- β principalmente por las HSC, lo que soporta la activación continua. En sentido general, cualquiera de las formas de induración fibrótica del hígado es incompatible con la vida (Hepatic Failure. Última actualización 3 de septiembre de 2004. Editor(es): David Eric Bernstein, MD, Chief, Section of Hepatology, North Shore University Hospital, Director, Associate Professor, Department of Internal Medicine, Division of Hepatology, New York University School of Medicine; Francisco Talavera, PharmD, PhD, Senior Pharmacy Editor, eMedicine; Oscar S Brann, MD, Associate Clinical Professor, UCSD School of Medicine; Program Director of Gastroenterology Fellowship, Department of Internal Medicine, Naval Medical Center San Diego; Alex J Mechaber, MD, FACP, Director of Clinical Skills Program, Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Division of General Internal Medicine, University of Miami School of Medicine; and Julian Katz, MD, Professor, Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, MCP Hahnemann University) (Sarem M. Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions. *Gastroenterol Hepatol*. 2006 Feb;29(2):93-101)

Fibrosis Pulmonar

La fibrosis pulmonar es una enfermedad de progresión lenta que también incluye diversas entidades. Histológicamente, se caracteriza por una heterogeneidad temporal de las lesiones, predominando los fibroblastos.

Aunque la secuencia de eventos en la patogenia de la fibrosis pulmonar está bien documentada, hay poca información sobre los mecanismos exactos envueltos en el daño inicial. Los factores inmunológicos, principalmente autoinmunitarios, se consideran relevantes. También se ha implicado a los factores genéticos. Microscópicamente, una propiedad constante comprende el cambio hiperplásico en las células epiteliales alveolares (neumocitos tipo 2) con nucleolos prominentes y citológicamente atípicos, que a menudo imitan una infección viral. Es posible encontrar inclusiones tubulares intranucleares ultraestructurales. El proceso de depósito de la ME y, particularmente, del material colágeno en el parénquima del pulmón va insidiosamente deteriorando su arquitectura, colapsando bronquios y alveolos, que, en última instancia, dejan de funcional y comprometen la ventilación pulmonar. EL TGF- α está implicado como una de las principales citocinas que orquestan este proceso. Los mio-fibroblastos son las células efectoras productoras de ME (Medranda Gomez MA, Paricio Nunez P, Tovar Martinez A, Ferrer Marin F, Gonzalez Martinez P, Garcia Puche MJ. Pulmonary fibrosis. Rev Esp Enferm Dig. 2005 Nov; 97(11):843-4)

Fibrosis sistémica cutánea o Esclerodermia

La Esclerosis Sistémica (ES) es una enfermedad extremadamente compleja. Hasta ahora no existe ninguna teoría plausible de explicar su patogenia. No obstante, se han documentado anomalías fundamentales en fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmunitario, en particular linfocitos B y T. Alteraciones funcionales en estas células estimulan la tríada típica de cambios patológicos en la ES: fibrosis progresiva cutánea y visceral, obstrucción de las luces de arterias pequeñas y arteriolas, y anomalías inmunitarias. Las alteraciones de la inmunidad humoral y celular desencadenan la secreción de cantidades grandes de anticuerpos, algunos de ellos específicos de la enfermedad, afectan a la infiltración de células mononucleares en los tejidos y la alteración de la regulación de la producción de citocinas y factores de crecimiento. Hasta ahora no se ha aclarado cuál de estas alteraciones es el principal acontecimiento desencadenante de la enfermedad o si todos ellos se entremezclan para producir el proceso fibrótico progresivo de la ES. No obstante, un componente patogénico clave comprende la activación persistente y de regulación alterada de los genes que codifican varios tipos de colágeno y otras proteínas de EM en fibroblastos de pacientes con ES. Esta es la principal diferencia entre los fibroblastos normales capaces de una cicatrización normal de las heridas y fibroblastos en la ES con una producción incontrolada y depósito de colágeno, que tiene como resultado fibrosis patológica en el órgano afectado. De nuevo, el TGF- β es uno de los factores de crecimiento que parecen estar muy implicados en la fibrosis tisular de la ES. Uno de los efectos más importantes comprende la síntesis de varios tipos de colágeno y otras proteínas de EM como la fibronectina. Los fibroblastos de pacientes con ES expresan niveles elevados del receptor de TGF- β sobre sus superficies, responsables seguramente del incremento de la señal inducido por el TGF- β y el incremento de la producción de colágeno. Esta enfermedad también es mortal de forma irreversible (Steen V. Targeted therapy for systemic sclerosis. Autoimmun Rev. 2006 Feb; 5(2):122-4).

Nefroesclerosis diabética o Nefropatía diabética

Casi todos los pacientes diabéticos desarrollan engrosamiento de las membranas basales glomerular y tubular a los 2 o 3 años del diagnóstico de la enfermedad. Algunos de ellos llegarán también a desarrollar expansión del mesangio glomerular y fibrosis intersticial, las marcas patológicas de la nefropatía diabética progresiva. Con el tiempo, la nefropatía evoluciona y clínicamente se manifiesta como la aparición de proteinuria, hipertensión e insuficiencia renal. Existe una buena correlación entre la expansión de la región del mesangio, la severidad de la fibrosis intersticial y la arteriosclerosis, con el descenso de la tasa de filtración glomerular. Ello tiene como consecuencia que la expansión mesangial reduce la filtración glomerular por oclusión de los capilares glomerulares y disminución del área efectiva para la filtración. De la misma manera, la fibrosis túbulo-intersticial altera la arquitectura y función tubular y ello conduce a insuficiencia renal. En esta enfermedad también se ha establecido el papel del TGF-beta en la orquestación de los procesos fibrosos que ocurren el riñón de los pacientes diabéticos. Esta enfermedad tiene un curso progresivo, insidioso y termina con la vida del paciente por Insuficiencia Renal (Cohen, M. P., Ziyadeh, F. N., Hong, S. W., Shearman, C. W., Hud, E., Lautenslager, G. T., Iglesias-de la Cruz, M. C., & Chen, S. (2002). Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of TGFbeta eta1. Kidney Int, 61: 2025-2032), (Ziyadeh, F. N., Hoffman, S. S., Han, D. C., 20 Iglesias-de la Cruz, M. C., Hong, S. W., Isono, M., Chen, S., McGowan, T. A., & Sharma, K. (2000). Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression and glomerular mesangial matrix expression by treatment with monoclonal anti-TGF-beta antibody in db/db diabetic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 8015-8020)

Fibrosis del Pene o Enfermedad de Peyronie

Conceptualmente la enfermedad comprende una cicatriz patológica de la albugínea peneana (túnica albugínea) de los tejidos eréctiles que puede ocasionar en estado de reposo retracción del órgano, y en erección, curvatura y retracción. A pesar de no poder precisarse el inicio de la enfermedad, la mayoría de los autores coinciden en que la degeneración fibrótica de la túnica albugínea esta precedida por un fenómeno inflamatorio que podría estar desencadenado por un proceso vasculítico, inmunológico, un traumatismo, o una collagenopatía. Se describe un primer periodo de invasión donde la placa fibrótica puede progresar en forma silenciosa denotando la curva o la retracción del pene, presentando dolor en la erección o durante la penetración. Los síntomas que predominan son los originados por la fibrosis. Algunos pacientes pueden presentar, además, asociadas con estos síntomas, la fibrosis del cartílago del bulo de la oreja. Aunque no es una enfermedad mortal, compromete seriamente la calidad de vida de los pacientes. Nuevamente se invoca al TGF-beta como agente inductor o amplificador de la base

molecular de la enfermedad (Jakut M. New discoveries in the basic science understanding of Peyronie's disease. Curr Urol Rep. 2004 Dec;5(6):478-84)

Enfermedad Microvascular cerebral

La vasculopatía se ha identificado en cerebros por ejemplo de pacientes aquejados de la Enfermedad de Alzheimer como un marcador que puede representar un importante factor patogénico en esta enfermedad y otras formas de demencia. La distribución laminar y regional de las lesiones vasculares se correlaciona con la presencia de ovillos neurofibrilares y placas seniles. Hace más de 100 años se describió por primera vez anomalías morfológicas en los vasos cerebrales de los ancianos, que consistían en rigideces, tortuosidades y ensortijamiento. Hace menos de 20 años estos apuntes han recibido total respaldo en tanto que se ha descrito que los capilares del hipocampo senil se distorsionaban mas con la edad que los grandes vasos. A nivel ultraestructural, se distinguen: (a) inclusiones membranosas dentro de la membrana basal; y (b) depósitos microvasculares de colágeno (fibrosis) o engrosamiento de los componentes de la membrana basal. Con la edad se produce un marcado incremento de la degeneración de pericitos en los capilares. Los depósitos de fibras de colágeno en el interior de la membrana basal han sido observados en el cerebro de mamíferos. La periodicidad de 64 nm en estas fibras permitió identificar la naturaleza colagénica de esta fibrosis microvascular, con asiento entre el endotelio y los pericitos o en la cara externa de la membrana basal. El engrosamiento de la membrana basal y los depósitos de colágeno son similares en ratas y seres humanos con la edad y se considera que estos procesos de degeneración esclerosis fibrótica de la microvasculatura cerebral es la base anatómica de los procesos demenciales en general. Estas enfermedades se empeoran clínicamente en la medida que la circulación cerebral se dificulta por la oclusión de las redes arteriolares y terminan provocando la ausencia de toda vida de relación social coherente y de actividad cognitiva.

El papel de la enfermedad vascular en la patogenia de la demencia esta siendo revalorado en el momento actual en tanto que se sugiere que mas del 50% de los pacientes con demencia tienen algún estigma de enfermedad vascular cerebral. Existen otros procesos neurocerebrales de tipo demenciales no de tipo Alzheimer en los que la persona experimenta serio deterioro de la memoria, el aprendizaje y de las habilidades en general. El mas representativo de estos procesos es tal vez la leucoencefalopatía arterial cerebral autosómica con infartos subcorticales (CADASIL) .La enfermedad no tiene una base molecular y celular comprendida. No obstante se conoce que las arteriopatías dadas por depósito de material granular osmófilo que va paulatinamente ocluyendo la luz de las arterias, provocando focos de isquemia en el cerebro con el posterior episodio de infarto. La pérdida de la viabilidad neuronal por los microinfartos lleva al deterioro de la actividad nerviosa superior del cerebro, y por tanto a un estado de senectud y demencia (Nakanao I. The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. Curr Neurovasc Res. 2005 Dec;2(5):409-23. ;Mott RT. Neuropathology of Alzheimer's disease. Neuroimaging Clin N Am. 2005 Nov;15(4):755-65.

Otros procesos degenerativos. Deposición de Beta Amiloide.

La enfermedad de Alzheimer, la demencia de mayor prevalencia en mayores de 65 años, es una de las principales causas de muerte en este grupo de edad. Aunque el origen de la enfermedad aun no se conoce, los cerebros de los pacientes de Alzheimer presentan acumulo de diversos tipos de proteínas dentro y fuera de las neuronas que estarían relacionados con la enfermedad. La beta amiloide es una de esas proteínas que ayuda a la formación de depósitos cerebrales extracelulares a medida que se envejece. Las placas consisten en un núcleo compacto de la proteína beta-amiloide. El riesgo para desarrollar una demencia se ve fuertemente asociado al polimorfismo de la apolipoproteína E. Apo-E En el cerebro, la Apo-E interacciona con la proteína beta-amiloide, y la Apo-E4 se asocia con un depósito aumentado de beta-amiloide y un mayor número de ovillos neurofibrilares.

Tanto la atención como los procesos de la memoria y de aprendizaje son los puntos de afectación de las funciones cerebrales mas llamativamente afectadas en la enfermedad de Alzheimer como modelo de las enfermedades demenciales que cursan con acumulación de beta-amiloide. Hasta ahora, existe un único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento del déficit cognitivo de la enfermedad de Alzheimer. La proteína beta-amiloide tiene efectos necrogénicos sobre las células cerebrales, mediado por la acción de los radicales libres. El depósito de beta-amiloide en el parénquima cerebral es un hecho distintivo de la patogenia de la enfermedad de Alzheimer, aunque también ocurre en menor grado en el envejecimiento normal.

La reducción de la síntesis de la forma neurotóxica de la proteína beta-amiloide pueden atenuar el proceso que contribuye al daño neuronal en la enfermedad de Alzheimer. Así mismo su eliminación del cerebro y su posterior excreción contribuirían a la mejora de las funciones nerviosas superiores de los pacientes. La enfermedad de Alzheimer deteriora severamente la calidad de vida del paciente, y no tiene cura hasta el presente (Gurol ME. Plasma beta-amyloid and white matter lesions in AD, MCI, and cerebral amyloid angiopathy. Neurology. 2006 Jan 10;66(1):23-9.; Han HS. The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. Curr Neurovasc Res. 2005 Dec;2(5):40923; Anderson E. The Organic Brain Syndrome (OBS) scale: a systematic review. Int J Geriatr Psychiatry. 2006 Jan 27.)

seri y col., journal of endocrinology (2005) 187,399-406, sugieren que la ghrelina mejora los daños oxidativos gástricos inducidos por el alendronato

El documento EP 1 632244, publicado en japonés como documento WO 2004/096260, hace referencia a la ghrelina para tratar enfermedades hepáticas como la hepatitis, la cirrosis hepática y la insuficiencia hepática.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una composición farmacéutica que contiene GHRP-6 para usar en la prevención, el control y la eliminación de los depósitos patológicos de material fibrótico y el exceso de matriz extracelular de los órganos internos y la piel del organismo receptor.

5 Dicha composición farmacéutica previene, controla y erradica los depósitos patológicos intra y extracelulares de material hialino, formas granulares amiloides de materiales eosinófilos u osmófilos en órganos internos, órganos externos y redes vasculares, como el hígado, los pulmones, el esófago, el intestino, los riñones, los vasos sanguíneos, las articulaciones y el resto de variantes de fibrosis cutáneas sistémicas de cualquier etiopatogenia cuando dicha composición se aplica al organismo receptor. Una composición para usar de acuerdo con la invención restaura la funcionalidad normal de cualquier órgano o tejido interno o externo afectado por los excesivos de material fibrótico, amiloide, osmófilo, eosinófilo o de hialina. La composición farmacéutica de la presente invención es una composición líquida, semisólida o sólida, que puede administrarse a por vía parenteral, incluidas las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, rectal y tópica, mediante infiltración local en la piel o la mucosa, los epitelios o los órganos o, con mayor precisión y/o perilesional. Una composición de acuerdo con la invención se administra, preferentemente, a animales o pacientes por vía intratecal. Una composición preferida para usar de acuerdo con la invención que se administra, preferentemente, a animales o pacientes por vía intratecal o por vía tópica:

- puede eliminar los depósitos de material fibrótico y el exceso de matriz extracelular en cualquier etiopatogenia hepática, como secuelas de hepatitis viral, alcoholismo, intoxicaciones, autoinmunitaria o idiopática, en general;
- puede eliminar los depósitos de material fibrótico y el exceso de matriz extracelular de origen tóxico, profesional, relacionado con fármacos, radioactivo, autoinmunitarios, secuelas asmáticas, alérgicas o idiopático, en general en órganos como los pulmones;
- puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibro-hialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular en órganos como los riñones, siendo la nefroesclerosis y/o la tubuloesclerosis de origen diabético, tóxico, profesional, relacionado con fármacos, autoinmunitarios o idiopático, en general, o secuelas de infecciones repetidas;
- puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular de origen autoinmunitarios o idiopático, en general, en la piel;
- puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular del páncreas y del tubo digestivo desde el esófago hasta el recto;
- puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular en la red vascular;
- puede eliminar los depósitos de material fibrótico o amiloide y/o osmófilo o eosinófilo en el cerebro y las células cerebrales
- puede reducir y/o eliminar el depósito de formas amiloides y/o hialina y/o granulares de material eosinófilo y/u osmófilo en la red vascular del cuerpo, incluido el sistema nervioso central y las meninges;
- puede reducir y/o prevenir el depósito de formas fibróticas, amiloides y/o hialina y/o granulares de material eosinófilo y/u osmófilo en las paredes de vasos sanguíneos, en general;
- puede eliminar los depósitos de formas fibróticas, amiloides y/o hialina y/o granulares de material eosinófilo y/u osmófilo de nervios craneales, extracraneales, sensoriales, motores o mixtos y/o los del sistema neurovegetativo
- o
- puede reducir y/o prevenir el depósito de formas fibróticas, amiloides y/o hialina y/o granulares de material eosinófilo y/u osmófilo en las paredes de vasos sanguíneos, en general.

Una composición preferida adicionalmente para usar de acuerdo con la invención, en la que dicha composición se va a administrar a animales o pacientes por vía parenteral, o mediante infiltración local en la piel, la mucosa, los epitelios o los órganos, por vía intralesional o por vía tópica:

- puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular de la piel, más exactamente queloides, cicatrices hipertróficas u otras formas de cicatrices exuberantes;
- puede corregir el aspecto estético de la piel tras cirugía reconstructora, estética o similar, o
- puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular de la piel, más exactamente secuelas fibróticas de cualquier forma de acné.

La invención proporciona adicionalmente el uso de péptidos GHRP-6 o GHRP-2 o hexarelina para fabricar una composición farmacéutica para detener y controlar el proceso de depósito de formas fibróticas, amiloides y/o de hialina y/o formas granulares de material eosinófilo y/u osmófilo en las células o el espacio extracelular tisular de los sistemas nerviosos centrales y periféricos, y para administrar a animales o pacientes por vía parenteral o por vía intratecal.

La invención proporciona adicionalmente el uso de GHRP-6 para fabricar una composición farmacéutica para prevenir, controlar y eliminar los depósitos patológicos de material fibrótico y el exceso de matriz extracelular de

órganos internos y la piel del organismo receptor. La composición farmacéutica de la presente invención contienen los péptidos GHRP-6, GHRP-2 y/o hexarelina a concentraciones de 5 microgramos-1 miligramo, más exactamente a 30-500 microgramos por dosis y un vehículo farmacológico aceptable.

Breve descripción de las figuras

- 5 Figura. Porcentaje de animales con fibrosis renal indicado por grupo al final del tratamiento con GHRP-6. Obsérvese que existen diferencias entre el grupo de placebo que recibe solución salina y los que reciben GHRP-6. La diferencia más alta se observó al comparar el grupo placebo con el grupo que recibe la dosis de 400 µg/kg, lo que sugiere un efecto dependiente de la dosis. La evaluación histológica de la reacción fibroproliferativa en el intersticio renal incluye la encapsulación de túbulos fibróticos y, también, los glomérulos fibróticos. De este modo se establece el
- 10 grado de fibrosis renal total empleado para determinar el porcentaje de animales afectados o no afectados al final del tratamiento. Se observó una diferencia estadística de $p < 0,001$ entre el grupo que recibe la dosis de 400 µg/kg de GHRP-6 y el grupo de placebo.

Ejemplos

Ejemplo 1. Reversión de la fibrosis hepática en ratas.

- 15 El presente experimento se realizó para evaluar el efecto de la composición farmacéutica basada en GHRP-6 en la reversión de la fibrosis hepática en ratas. Se indujo fibrosis hepática en ratas Wistar macho de 250 gramos de peso corporal medio ligando el conducto biliar externo. Con este fin se anestesió a las ratas con una combinación de ketamina/xilazina y se las sometió a laparotomía para exponer en conducto colédoco. El conducto se sometió a
- 20 a 3 grupos experimentales de 20 ratas cada uno: (1) Grupo control de placebo que recibe solución fisiológica salina, (2) Grupo que recibe el GHRP-6 a una dosis de 100 µg/kg y (3) Grupo que recibe GHRP-6 a una dosis de 400 µg/kg. Los tratamientos se administraron todos los días por espacio de tres semanas tras la inducción de fibrosis del parénquima hepático. Todos los comenzaron tres semanas después de establecida la fibrosis. El seguimiento del daño hepático se realizó mediante exploraciones ultrasónicas semanales del área de proyección de este órgano, el
- 25 progreso de los niveles séricos de las transaminasas GOT y GPT, los niveles de gamma glutamil transferasa (GGT) y el volumen de ascitis. Los tratamientos con GHRP-6 o placebo se aplicaron por vía intraperitoneal una vez al día. Cuando concluyeron los tratamientos se sacrificó a los animales y se extrajo suero sanguíneo y el hígado. Los fragmentos de hígado se fijaron en formalina neutra y se procesaron mediante tinción con hematoxilina/eosina o con tinción tricrómica de Masson para evaluar los daños generales y la gravedad de las induraciones fibróticas. Otros
- 30 fragmentos de tejidos hepáticos se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento para determinar el contenido de hidroxiprolina mediante hidrólisis ácida en HCl 1N, y también los niveles intrahepáticos de los marcadores del metabolismo redox. Las determinaciones bioquímicas se llevaron a cabo calculando el contenido en proteína total mediante el método de Bradford.

Tabla 1. Escala de gradación del proceso: (0) - nula, (1) - moderada, (2) limitada, (3) - grave, (4) -muy grave.

Grupo Experimental	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Placebo (N= 14)	0	0	2	5*	7 (50%)*
Dosis I (N=16)	5	9	2	0	0
Dosis I (N=20)	8	11	1	0	0
* $p < 0,001$. Prueba de Chi cuadrado.					

Tabla 2. Evaluación de los niveles de hidroxiprolina en el hígado al final de tres semanas de tratamiento.

Grupo experimental	Contenido de OH-P (µg/g de proteínas totales)
Placebo (N=14)	133,25 ± 21,69**
Dosis I (N=16)	56,71 ± 8,11*
Dosis II (N=20)	16,15 ± 1,025
** $p = 0,00021$, Placebo vs. Tratados, * $p = 0,001$ Dosis I vs, Dosis II, Prueba de t de student de dos colas,	

Tabla 3. Niveles séricos de GOT, GPT y GGT en todos los grupos al concluir las tres semanas de tratamiento.

Grupo Experimental	GOT (U/l))	GPT (U/l)	GGT (U/l)
Animales intactos	32,56 ± 9,27	20,93 ± 7,74	23,62 ± 5,21
Placebo (N=14)	115,84 ± 27,80**	155,30 ± 11,63**	143,18 ± 25,36**
Dosis I (N=16)	61,58 ± 16,10* 81,71	± 30,90*	71,53 ± 22,14*
Dosis II (N=20)	30,41 ± 6,11	60,64 ± 19,87	25,56 ± 8,63
** p=0,0003. Animales tratados con placebo frente a tratados con la Dosis II y animales intactos. *p=0.0002 Dosis I vs. Dosis II y animales Intactos. No se observaron diferencias entre los animales Intactos y los animales tratados con la Dosis II. Prueba de t de student de dos colas.			

Tabla 4. Niveles de marcadores de estrés oxidativo en las muestras de hígado al final de la tercera semana de tratamiento.

Grupos Experimentales	SODt	Catalasa	HPT	MDA
Grupo Intacto	28261,08 ± 1260,94	16,40 ± 3,95	27,25 ± 2,47	0,06 ± 0,01
Grupo solución salina-placebo	573,83 ± 645,93**	580,58 ± 57,39**	108,66 ± 15,82**	0,25 ± 0,04**
Grupo Dosis I	11058,07 ± 744,61*	68,50 ± 12,73*	43,06 ± 1,83*	0,14 ± 0,02*
Grupo Dosis II	21029,87 ± 498,28	31,50 ± 4,3	21,16 ± 1,71	0,08 ± 0,01
** p=0,0001. Placebo vs. tratados con Dosis II e Intactos. *p= 0,0003 Dosis I vs. Dosis II e Intactos. No se observaron diferencias entre Intactos y Dosis II. Prueba de t-de student de dos colas.				

- 5 El tratamiento con GHRP-6 demuestra claramente la capacidad del péptido para erradicar y controlar el depósito de materiales colagenosos y extracelulares en el parénquima hepático producido por la ligadura del conducto colédoco. La importancia del tratamiento se demuestra mediante la convergencia de los datos morfológicos y bioquímicos, que soporta la corrección del estado fibrótico periductal y periportal gravemente comprometido. Es importante indicar que los animales en el grupo de placebo no mostraron remisión espontánea.

10 **Ejemplo 2.** Reversión de la fibrosis hepática en ratas.

- El presente experimento se realizó para evaluar el efecto de la composición farmacéutica que contiene GHRP-6 en la reversión de la fibrosis hepática en ratas, en la que dicha fibrosis hepática se indujo mediante tetracloruro de carbono (CCl₄). Este es un agente hepatotóxico que provoca hepatitis crónica y fibrosis cuando se administra a largo plazo. Se indujo fibrosis hepática en ratas Wistar macho de 250 gramos de peso corporal medio mediante la administración intraperitoneal de CCl₄ al 50 %/50 % (v/v) en aceite de oliva, dos veces a la semana durante 4 semanas. Transcurrido este periodo, se sacrificó el 25% de las ratas y se las sometió a análisis bioquímicos y estudios de anatomía patológica. El proceso de la fibrosis hepática se demostró en todos los animales estudiados. El resto de los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales de 15 ratas cada uno: (1) Grupo control de placebo que recibe solución fisiológica salina, (2) Grupo que recibe el GHRP-6 a una dosis de 100 µg/kg y (3) Grupo que recibe GHRP-6 a una dosis de 400 µg/kg. Los tratamientos se aplicaron una vez al día durante cuatro semanas tras la detección del proceso fibrótico en el parénquima hepático. Los tratamientos comenzaron inmediatamente después de establecida la fibrosis y de suspendida la administración del CCl₄. Cuando concluyeron los tratamientos se sacrificó a los animales y se extrajo suero sanguíneo y el hígado. Los fragmentos de hígado se fijaron en formalina neutra y se procesaron mediante tinción con hematoxilina/eosina o con tinción tricrómica de Masson para evaluar los daños generales y la gravedad de las induraciones fibróticas. Otros fragmentos de tejidos hepáticos se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento para determinar el contenido de hidroxiprolina mediante hidrólisis ácida en HCl 1N, y también los niveles intrahepáticos de los marcadores del metabolismo redox. Las determinaciones bioquímicas se llevaron a cabo calculando el contenido en proteína total mediante el método de Bradford. La respuesta al tratamiento con la composición farmacéutica se caracterizó determinando los niveles séricos de las transaminasas GOT y GPT, criterios histológicos a escala cuantitativa y algunos marcadores distintivos de los niveles de peroxidación lipídica.

Tabla 5. Escala de gradación del proceso: (0) - nula, (1) - moderada, hasta un 25% del corte (2) - limitada hasta un 50% del corte, (3) - grave, hasta un 75% del corte (4) - muy grave, mas de un 75% del corte. Evaluación histológica de la reacción fibro-proliferativa en patrón de puentes, incluida la necrosis en la zona III. Numero de animales por grupo según grado de compromiso al final del tratamiento.

Grupo	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Experimental (n= 15)					
Placebo	0	0	0	5*	10**
Dosis I	0	9	6*	0	0
Dosis II	8*	7	0	0	0
*p<0,001. Prueba de Chi cuadrado. Grado 0. Grupo II vs. Placebo y Dosis I. Grado 1. Dosis I y II vs. Placebo. Placebo, grados 3 y 4 vs. Animales tratados.					

5

Tabla 6. Evaluación de los niveles de hidroxiprolina en el hígado al final del tratamiento.

Grupo Experimental (N=15)	Contenido de OH-P (µg/g de proteínas totales)
Placebo	86,19 ± 11,43**
Dosis I	40,21 ± 3,54*
Dosis II	10,22 ± 4,33
**p=0,00021. Placebo vs. Tratados. *p=0,001 Dosis I vs. Dosis II. Prueba de t-de student de dos colas.	

Tabla 7. Niveles séricos de GOT y GPT en todos los grupos al concluir el tratamiento.

Grupo Experimental	GOT (UI/l)	GPT (UI/l)
Animales intactos	31,56 ± 6,55	18,77 ± 6,53
Placebo	111,97 ± 36,50**	274,14 ± 21,75**
Dosis I	56,31 ± 12,19*	77,15 ± 22,66*
Dosis II	28,18 ± 4,71	26,94 ± 12,42
** p=0,0005. Placebo vs. Tratado con la Dosis II y Animales Intactos. *p=0,001 Dosis I vs. Dosis II y animales intactos. No se observaron diferencias entre los animales intactos y los animales tratados con la Dosis II. Prueba de t-de student de dos colas.		

10

Tabla 8. Niveles de marcadores de estrés oxidativo en las muestras de hígado al final de la tercera semana de tratamiento.

Grupo experimental	SODt	Catalasa	HPT	MDA
Grupo Intacto	28261,08 ± 1260,94	14,84 ± 1,24	18,72 ± 3,22	0,09 ± 0,02
Grupo solución salina-Placebo	289,2 ± 116,1**	560,59 ± 44,28**	257,84 ± 86,14**	0,56 ± 1,04 **
Grupo Dosis I	17632,08 ± 321,55*	60,43 ± 11,81* 55,11 ± 2,77		0,16 ± 1,16*
Grupo Dosis II	20187,87 ± 245,13	22,67 ± 3,56	26,44 ± 2,43	0,09 ± 0,01
** p=0,0002. Placebo vs Tratados: Dosis I y II y animales Intactos. *p= 0,0005 Dosis I vs. Dosis II, Placebo y animales Intactos. No se observaron diferencias entre los animales Intactos y los animales tratados con la Dosis II. Prueba de t-de student de dos colas.				

El tratamiento con GHRP-6 demuestra la capacidad de este péptido para eliminar y controlar el depósito de material colágeno y de matriz extracelular en general en el parénquima del hígado como consecuencia de la administración reiterada de CCl₄. El tratamiento también previene la muerte de los hepatocitos de forma individual, focal y pericentrolobulillar. La importancia del tratamiento se demuestra mediante datos morfológicos, enzimáticos y

15

bioquímicos convergentes, que avalan la inversión de una fibrosis hepática difusa grave establecida y comprometida con un patrón de forma de puentes confluentes, hasta niveles casi indetectables sin remisión. Nuevamente, los animales del grupo placebo no mostraron remisiones espontáneas.

Ejemplo 3. Reversión de la fibrosis renal de nefroesclerosis en ratas. Tercer experimento.

El presente experimento se realizó para evaluar el efecto de la composición farmacéutica que contiene GHRP-6 en la reversión de la fibrosis renal en ratas. En este caso, el proceso se indujo mediante administración sostenida del agente antineoplásico doxorubicina (DX) a una dosis de 2,5 mg/kg dos veces a la semana durante 8 semanas. La presencia de depósito fibrótico en los espacios peri-portal, peri-bronquial y de todo el intersticio renal con un patrón cístico-nodular se demostró mediante estudios histopatológicos de estos órganos en el 25 % de la población de ratas intoxicadas con doxorubicina. A partir de este punto se interrumpió la administración de DX y se inició el tratamiento con la composición farmacéutica que contiene GHRP-6. El tratamiento se aplicó una vez al día a 100 y 400 µg/kg en un volumen de 1 ml por vía intraperitoneal durante 4 semanas. El resto de los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales de 20 ratas cada uno: (1) Grupo control de placebo que recibe solución fisiológica salina, (2) Grupo que recibe el GHRP-6 a una dosis de 100 µg/kg y (3) Grupo que recibe GHRP-6 a una dosis de 400 µg/kg. Cuando concluyeron los tratamientos se sacrificó a los animales mediante sobredosis de anestesia y se extrajeron los hígados, los riñones, los pulmones y los sueros sanguíneos. Los fragmentos de tejido se fijaron en formalina neutra y se procesaron mediante tinción con hematoxilina/eosina o con tinción tricrómica de Masson para evaluar los daños generales y la gravedad de las induraciones fibróticas. Otros fragmentos se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento para determinar el contenido de hidroxiprolina mediante hidrólisis ácida en HCl 1N, y también los niveles de creatinina y los marcadores de estrés oxidativo. Las determinaciones bioquímicas se llevaron a cabo calculando el contenido en proteína total mediante el método de Bradford.

Tabla 9. Número de animales por grupo en cada nivel de gravedad del compromiso fibrótico. Escala de gradación del proceso fibrótico en los riñones: Grado (0) - Nula, Grado (1) - Moderada, interesa el intersticio sin deformar ni encapsular los túbulos ni los glomérulos, Grado (2) - Intensa, interesa todo el intersticio, deforma los túbulos, obliterando su luz y encapsulando el glomérulo externamente, Grado (3) - Muy intensa, encapsula y colapsa los túbulos y la luz, y encapsula externamente los glomérulos. Comprende también depósitos a nivel mesangial.

Grupo Experimental (N=20)	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Placebo	0	1	4	15*
Dosis I	6	9	5	0
Dosis II	5	15*	0	0

*p<0,001. Prueba de Chi cuadrado.

Tabla 10. Evaluación de los niveles de hidroxiprolina en los riñones al final del tratamiento.

Grupo experimental (20 animales por grupo)	Contenido OH-P (µg/g de proteínas totales-9
Placebo	65,21 ± 22,16**
Dosis I	46,15 ± 2,73*
Dosis II	8,66 ± 1,02

** p=0,0001. Placebo vs. Tratados. *p=0,05 Dosis I vs. Dosis II. Prueba de t-de student de dos colas.

Tabla 11. Niveles séricos de GOT y GPT en todos los grupos al concluir el tratamiento. Integridad del parénquima hepático.

Grupo experimental	GOT (UI/l)	GPT (UI/l)
Placebo	124,12 ± 28,3**	188,77 ± 16,98**
Dosis I	64,82 ± 23,71 *	81,0 ± 10,25*
Dosis II	26,22 ± 4,1	28,25 ± 5,66

** p=0,0005. Placebo vs. Tratados. *p=0,042 Dosis I vs. Dosis I Prueba de t-de student de dos colas.

Tabla 12. Niveles de marcadores de estrés oxidativo en las muestras de tejido renal al final de la cuarta semana de tratamiento.

Grupo experimental	SODt	Catalasa	HPT	MDA
Grupo placebo-solución salina	199,7 ± 6,81**	356,2 ± 18,15**	287,11 ± 20,02**	0,981±1,1**
Grupo de Dosis I	665,08 ± 28,42*	126,02 ± 12,23*	73,2 ± 6,92	0,56 ± 2,23 *
Grupo de Dosis II	1287,64± 112,63	45,38 ± 8,27	16,14 ± 3,67	0,087 ± 0,02

** p=0,0002. Placebo vs. Tratados: Dosis I y II y animales intactos.
 *p=0,0005 Dosis I vs. Dosis II. Placebo y animales intactos. No se observaron diferencias entre animales intactos y animales tratados con la Dosis II. Prueba de t-de student de dos colas.

Ejemplo 4. Control de la fibrosis pulmonar

El presente experimento se realizó para evaluar el efecto de la composición farmacéutica que contiene GHRP-6 en la reversión de la fibrosis renal en ratas. En este caso, el proceso se indujo mediante administración sostenida del agente antineoplásico Bleomicina (Ble) a una dosis de 2,5 U/kg dos veces a la semana durante 4 semanas. La fibrosis se demostró en los pulmones del 25 % de los animales intoxicados con Ble mediante análisis histopatológico. A partir de este punto se suspendió la administración de Ble y se inició el tratamiento con la composición farmacéutica que contiene GHRP-6. El tratamiento se aplicó una vez al día a 100 y 400 µg/kg en un volumen de 1 ml por vía intraperitoneal durante 4 semanas. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales de 15 ratas cada uno: (1) Grupo control de placebo que recibe solución fisiológica salina, (2) Grupo que recibe el GHRP-6 a una dosis de 100 µg/kg y (3) Grupo que recibe GHRP-6 a una dosis de 400 µg/kg. Cuando concluyeron los tratamientos se sacrificó a los animales mediante sobredosis de anestesia y se extrajeron los pulmones y el suero sanguíneo. Los fragmentos de tejido se fijaron en formalina neutra y se procesaron mediante tinción con hematoxilina/eosina o con tinción tricrómica de Masson para evaluar los daños generales y la gravedad de las induraciones fibróticas. Otros fragmentos de tejidos pulmonares se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento para determinar el contenido de hidroxiprolina mediante hidrólisis ácida en HCl 1N, y también los niveles intrahepáticos de los marcadores del metabolismo redox. Las determinaciones bioquímicas se llevaron a cabo calculando el contenido en proteína total mediante el método de Bradford. La evaluación histológica de la reacción fibroproliferativa en los pulmones incluye el proceso de fibrosis perivascular, peribronquial y septal. El grado global de la fibrosis pulmonar se estableció de acuerdo con la extensión y la intensidad del proceso en estos tres fragmentos para determinar el porcentaje de animales afectados o no afectados al final del tratamiento con GHRP-6. El número de animales en cada grupo con pulmones fibróticos de acuerdo con la gravedad de la fibrosis son:

- Grado 0- no evidencia de fibrosis o presencia de solo fibras finas y difusas o focos de fibras o material aerolar sin compromiso respiratorio.
 Grado 1- Fibrosis predominantemente vascular en más del 75 % de las arteriolas y los capilares.
 Grado 2- Fibrosis predominantemente vascular en más del 75 % de las arteriolas y los capilares, con compromiso peribronquial adicional.
 Grado 3- Fibrosis predominantemente vascular en más del 75 % de las arteriolas y los capilares, con compromiso peribronquial adicional. También se detecta material fibrótico en el tabique interalveolar.

Tabla 13. Animales clasificados de acuerdo con la gravedad de la fibrosis pulmonar en cada grupo.

Grupo experimental (N= 15)	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Placebo	0	0	5	10*
Dosis I	3	10	2	0
Dosis II	8	7	0	0

* p<0,05. Prueba exacta de Fisher.

Como puede observarse, no existen animales en el grupo placebo incluidos en las escalas Grados 0 y 1. La mayoría de estos se clasificaron como de Grado 3 de gravedad. Por el contrario, la Dosis II demostró un potente efecto protector, con más del 50% de los animales se clasifica en la escala de Grado 0.

Tabla 14. Evaluación de los niveles de hidroxiprolina en los pulmones al final del tratamiento con solución salina o GHRP-6.

Grupo Experimental (15 animales por grupo)	Contenido de OH-P ($\mu\text{g/g}$ de proteínas totales)
Placebo	$178,53 \pm 42,77^{**}$
Dosis I	$91,24 \pm 16,84^*$
Dosis II	$12,75 \pm 3,61$

El efecto en la eliminación o reversión de la fibrosis pulmonar generada por Ble también se pone de manifiesto mediante el contenido de hidroxiprolina en muestras secas de tejido pulmonar, lo que coincide con los resultados histológicos ya descritos en lo que antecede.

Hasta ahora se han mostrado pruebas que avalan el potente efecto anti-fibrótico de la composición farmacéutica que contiene GHRP-6 en cuatro experimentos independientes, incluidos: dos estudios de fibrosis hepática, uno de fibrosis renal y uno pulmonar, respectivamente. Sus resultados son repetibles y reproducibles, lo que indica la eficacia del tratamiento en el control de estos procesos en más de un órgano interno, con independencia de su origen etiopatogénico.

Ejemplo 5. Efecto de la composición farmacéutica que contiene GHRP- 6 en el control y eliminación de la acumulación de proteína beta-amiloide en el cerebro.

Este estudio se realizó para evaluar la influencia de la administración a largo plazo (8 semanas) de GHRP-6 sobre marcadores bioquímicos y morfológicos en el cerebro de ratones transgénicos que expresan la proteína precursora beta-amiloide, marcadores que también indican la progresión del daño en el sistema nervioso central.

Para el presente estudio se adquirieron ratones transgénicos APP macho de 20-25 g de peso que expresaban la proteína precursora beta-amiloide. Los animales (N=30) se distribuyeron aleatoriamente en:

Grupo de placebo- Solución fisiológica salina al 0,9 %.

Grupo de Dosis I- GHRP-6 a 50 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal en solución salina.

Grupo de Dosis II- SHRP-6 a 100 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal en solución salina.

Los tratamientos se aplicaron por vía intraperitoneal en un volumen de 1 ml, cinco días a la semana durante 8 semanas, de tal forma los animales recibieron 40 administraciones de GHRP-6. A partir de estudios piloto exploratorios previos los autores sabían que este periodo de tiempo era suficiente para mejorar las habilidades cognitivas y motoras de los animales en condiciones de estrés.

Concluidas las 8 semanas de tratamiento, se sacrificó a los ratones mediante sobredosis de anestesia y se les perfundió solución salina *in situ*. Se extrajeron los encéfalos, un encéfalo se congeló en hielo seco y el otro se fijó en paraformaldehído al 4 % neutro.

Las muestras se criolaminaron a 10 μm y las secciones se tiñeron con hematoxilina/eosina, rojo Congo o se incubaron con un anticuerpo específico para la proteína beta-amiloide. Los procedimientos morfométricos se realizaron mediante captura de imagen microscópica con una cámara acoplada al microscopio y las imágenes se analizaron con el software DIGIPAT.

Marcadores estudiados

Número de depósitos fibrilares de la proteína beta-amiloide positivos a la tinción de rojo Congo.

El número de focos inmunorreactivos al anticuerpo que reconoce la proteína beta-amiloide.

El tamaño de las placas de beta-amiloide en el cerebro, reconocido a aumentos de 200X y 400X (μm^2).

La concentración cerebral de mioinositol como indicador de envejecimiento y deterioro del metabolismo cerebral ($\mu\text{mol/g}$ de tejido).

Tabla 15. Efecto del tratamiento con el GHRP-6 sobre la eliminación de depósitos amiloides en el cerebro.

Grupo experimental	Nº de depósitos positivos al rojo Congo	Nº de depósitos positivos al beta-amiloide	Tamaño de las placas de amiloide	Concentración de mioinositol en el cerebro
Placebo	35,64 ± 11,33**	31,27 ± 8,9**	48,5 ± 2,03**	61,28 ± 16,33**
Dosis I. GHRP6	21,78 ± 6,57*	15,11 ± 3,27	15,51 ± 6,44	49,35 ± 10*
Dosis II. GHRP6	14,52 ± 4,18	13,58 ± 4,61	10,88 ± 4,1	27,45 ± 8,61
** p=0,0001. *p=0,0023. Prueba U de Mann Whitney.				

En la tabla 15 se muestran todos los resultados correspondientes a los parámetros estudiados de modo que se caracteriza el efecto del tratamiento a largo plazo de la composición farmacéutica que contiene GHRP-6. Obsérvese que los resultados se refieren al recuento de imágenes digitales de un encéfalo. Para superar esta limitación, los recuentos se llevaron a cabo a ciegas por tres individuos independientes y los resultados mostrados corresponden a 5 observaciones de portaobjetos. La tabla 15 muestra el efecto de la composición farmacéutica que contiene GHRP-6 en el control de la acumulación de proteína beta-amiloide y la bioquímica cerebral. Como puede observarse, tras 8 semanas de tratamiento con la composición farmacéutica que contiene GHRP-6 tiene un impacto positivo en el control de la acumulación de beta-amiloide en sus formas diferentes y también en la corrección del metabolismo de este órgano. Existe un marcado efecto caracterizado por la reducción de la acumulación de las pruebas de mioinositol, la corrección de las vías bioquímicas de mayor energía de asimilación y nutrición de las neuronas. Esto podría tener un impacto clínico favorable sobre el control del proceso de envejecimiento cerebral.

En la tabla 16 siguiente se demuestra el efecto favorable de la composición farmacéutica que contiene GHRP-6 sobre el control de la peroxidación lipídica en el cerebro de ratones transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. De nuevo, estas pruebas sugieren el efecto favorable de esta composición farmacéutica para controlar uno de los procesos responsables del deterioro del tejido nervioso en la enfermedad y el envejecimiento.

Tabla 16. Marcadores del estrés oxidativo en tejidos cerebrales.

Grupo experimental	SODt	Catalasa	HPT	MDA
Grupo salina -placebo	475,9 ± 60,32**	118,6 ± 26,33**	105,6 ± 22,1**	1,232 ± 1,14 **
Grupo Dosis I	611,17 ± 44,79*	81,6 ± 15,25	54,3 ± 11,87*	0,77 ± 1,56 *
Grupo Dosis II	863,22 ± 50,3	60,18 ± 13,67	21,25 ± 5,44	0,4 ± 0,02
** p=0,00014. Placebo vs. Tratados: Dosis I y II. *p=0,025 Dosis I vs. Dosis II. Prueba U de Mann Whitney.				

Ejemplo 6. Efecto de la composición farmacéutica basada en GHRP- 6 y otros péptidos sobre el control de la demencia de origen vertical. Eliminación del material osmófilo en la corteza cerebral. Prevención y control del proceso de envejecimiento cerebral.

Este experimento se realizó para evaluar la eficacia de composiciones farmacéuticas que contienen indistintamente uno de los péptidos GHRP-6, GHRP-2, hexarelina o ghrelina sobre el proceso de involución neurofuncional central en ratones transgénicos que sobreexpresan una forma mutada del gen NOTCH 3 en las células de músculo liso de los vasos sanguíneos. Estos animales desarrollan en meses una arteriopatía similar a la de la enfermedad CASADIL, con respecto a la memoria descriptiva, y se produce como una de las causas principales de la demencia vascular. En estos animales, las lesiones vasculares también incluyen vasculopatías retinocerebrales, cerebrales y cocleares. El material beta amiloide presente en el cerebro y los vasos sanguíneos, el depósito de material granular osmófilo en el cerebro y las paredes de la arteria meníngea y la reducción de sus luces son histopatológicamente relevantes, En el cerebro y en sus principales troncos nerviosos aparecen zonas de color blanco, de microinfarto y de focos hemorrágicos-

Se usaron ratones macho de dieciocho a veinte meses de edad cuando mostraron los síntomas de la enfermedad. Los animales fueron asignados de forma aleatoria a los siguientes grupos de tratamiento experimental:

- A. - Grupo de placebo que recibe solución fisiológica salina.
- B- Grupo que recibe GHRP-6 a una dosis de 100 µ/kg.
- C.- Grupo que recibe GHRP-2 a una dosis de 100 µ/kg.
- D- Grupo que recibe ghrelina a una dosis de 100 µ/kg.
- E- Grupo que recibe hexarelina a una dosis de 100 µ/kg.

Los tratamientos se aplicaron dos veces a la semana durante 16 semanas por vía intraperitoneal. Cuando concluyeron los tratamientos se realizaron estudios de autopsia con independencia de la mejora clínica manifestada en un gran número de animales tratados. Se obtuvieron muestras de tejido cerebral que incluyen tejidos meníngeos para determinaciones bioquímicas e histopatológicas. Los animales recibieron sobredosis de anestesia y se les sometió a perfusión intracardíaca con solución salina fisiológica fría para lavar la sangre presente en el encéfalo. Se extrajeron los encéfalos y un encéfalo se congeló en hielo seco y el otro se fijó en paraformaldehído al 4 % neutro. Las muestras se criolaminaron a 10 µm y los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina/eosina, rojo Congo o se incubaron con un anticuerpo específico para la proteína beta-amiloide. Los procedimientos morfométricos se realizaron mediante captura de imagen microscópica con una cámara acoplada al microscopio y las imágenes se analizaron con el software DIGIPAT.

Marcadores estudiados

Número de depósitos fibrilares de beta-amiloide en vasos sanguíneos.

Número de infartos subcorticales.

Número de hemorragias subcorticales.

La concentración cerebral de mioinositol como indicador de envejecimiento y deterioro del metabolismo cerebral (µmol/g de tejido).

Marcadores de estrés oxidativo cerebral.

Tabla 17. Resultados de las determinaciones morfométricas en tejidos cerebrales.

Grupo experimental	Nº de vasos sanguíneos positivos a rojo Congo	Nº de vasos sanguíneos positivos a Nissl No	Nº de infartos subcorticales	Nº de focos hemorrágicos
Placebo	35,64 ± 11,33**	31,27 ± 8,9**	48,5 ± 2,03**	41,28 ± 16,33**
GHRP-6	16,31 ± 5,33	14,22 ± 8,15	26,79 ± 4,19	19,05 ± 5,14
GHRP-2	18,26 ± 4,57	13,8 ± 6,76	30,13 ± 5,72	11,79 ± 4,25
Ghrelin	17,67 ± 2,26	11,27 ± 4,61	26,9 ± 4,27	13,06 ± 2,77
Hexarelin	15,24 ± 1,24	11,36 ± 6,4	27,11 ± 3,55	14,61 ± 3,31
** p<0,0002 entre el placebo y el resto de los grupos tratados con cada una de las composiciones farmacéuticas que contienen cada una de las sustancias en estudio.				

Como se puede apreciar, el tratamiento con cada uno de los péptidos secretagogos reduce significativamente el número de arterias, arteriolas y capilares positivos para depósitos fibrilares [amiloide] (Rojo Congo) y granulares de material osmófilo (tinción de Nissl). En consecuencia, la presencia de infarto subcortical asociado con leucoencefalopatía y focos hemorrágicos disminuyó significativamente en cada uno de los grupos tratados con composiciones farmacéuticas.

Tabla 18. Marcadores del estrés oxidativo en el cerebro.

Grupo experimental	SODt	Cabalasa	HPT	MDA	Mioinositol cerebral
Grupo de solución salina	360,9 ± 42,48**	274,6 ± 30,14**	265,4 ± 18,7** 0,984	± 0,04 **	44,2 ± 10,08**
GHRP-6	12327,31 ± 55,1	51,5 ± 16,01	101,7 ± 22,09	0,23 ± 0,05	12,36 ± 5,64
GHRP-2	11 065,49 ± 46,29	48,23 ± 14,25	117 ± 13,55	0,302 ± 0,01	14,65 ± 4,38
Ghrelin	12290,9 ± 60,32	44,67 ± 11,58	142,16 ± 10,01	0,261 ± 0,03	14,04 ± 3,85
Hexarelin	10814,68 ± 33,08	51,19 ± 7,84	54,3 ± 11,87	0,284 ± 0,01	11,88 ± 2,71
** Representa las diferencias de p<0,01 entre los animales del grupo de placebo que recibieron solución salina fisiológica y el resto de los grupos tratados con las composiciones farmacéuticas individuales que contienen los respectivos péptidos.					

El efecto de los péptidos se hace muy evidente también al estudiar el proceso de peroxidación de lípidos en el cerebro de los ratones transgénicos como modelo de la enfermedad humana CADASIL. Como se demuestra en la reducción de los daños vasculares e infartos, los péptidos secretagogos estudiados en el presente documento

muestran la capacidad para reducir o atenuar la neurotoxicidad asociada con el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno presentes en la enfermedad humana, este incremento de la producción también se demuestra en los animales que solo reciben solución salina. Este efecto extiende el concepto de neuroprotección general usando estas sustancias en contextos en los que el envejecimiento cerebral se debe a daños vasculares y una peroxidación lipídica excesiva.

Ejemplo 7. Efecto de los péptidos GHRP-6, GHRP-2, Hexarelina y/o Ghrelina en la eliminación de los depósitos patológicos de material fisiológico de la piel.

Para estudiar el efecto de los péptidos GHRP-6, GHRP-2, Hexarelina y/o Ghrelina en la eliminación de los depósitos patológicos de material fisiológico en la piel, se realizaron xenotransplantes de fragmentos de queloides humanos en la región dorsal de ratones atímicos. Tras 72 horas de evolución, para corroborar los injertos y la viabilidad de los xenotransplantes, los animales (N=6) fueron distribuidos aleatoriamente a los siguientes grupos experimentales:

- A- Grupo control de solución salina (vehículo de los principios activos).
- B- Grupo que recibe GHRP-6.
- C- Grupo que recibe GHRP-2.
- D- Grupo que recibe Ghrelina.
- E- Grupo que recibe hexarelina.

Los tratamientos se aplicaron una vez cada 24 horas durante 7 días. Las sustancias se infiltraron en los bordes de los implantes, para biodisponibilidad local de los principios activos a dosis de 5 microgramos a 1 miligramo. Tras el periodo de tratamiento, se sacrificó a los animales y los implantes se extrajeron para evaluar la respuesta farmacológica a cada sustancia. Las muestras se pesaron y fragmentaron para estudios histológicos y determinaciones bioquímicas de colágeno. Los fragmentos para los estudios histológicos se fijaron en formalina al 10 % neutra y los fragmentos para los análisis bioquímicos se almacenaron a -70 °C.

Los parámetros estudiados fueron:

- a- Peso húmero del injerto recogido.
- b.- Contenido de hidroxiprolina en el tejido.
- c.- Número de campos microscópicos con tejido positivo a tinción con rojo picrosirio y tinción tricrómica de Masson. Se tomaron imágenes con aumentos de 4X y 10X, con promedio de datos para cada aumento.
- d.- Número de mastocitos por campo microscópico positivo para tinción con azul de anilina, con aumentos 20X.

Como se ilustra en la Tabla 19, todos los péptidos en estudio ejercieron un efecto antifibrótico significativo cuando se compararon con los animales que reciben el vehículo como control.

Tabla 19. Efecto anti-fibrótico de los tratamientos en la piel.

Grupo de tratamiento	Peso húmedo (en gramos)	Contenido en hidroxiprolina (µg/g)	Nº de campos positivos a tinción específica de colágeno	Nº de campos microscópicos con mastocitos (aumento 20).
Control solución salina	13,55 ± 2,31	258,61 ± 12,53	37,2 ± 22,44	25,31 ± 6,18
GHRP-6	6,71 ± 1,18 a	88,27 ± 4,61	11,45 ± 5,98	9,54±2,15
GHRP-2	7,14 ± 1,02 a	84,17 ± 7,75	18,12±6,75	11,17 ± 3,33
Hexarelina	6,25 ± 1,73 a	88,59 ± 6,58	12,35 ± 8,94	10,18±2,98
Ghrelina	6,67 ± 1,53 a	85,23 ± 4,11	11,27 ± 4,67	10,71 ±4,57
(a) Representa la diferencia significativa de p<0,01 entre los grupos que recibieron los péptidos y el grupo control de solución salina. Prueba t de Student de dos colas.				

Como se ha puesto de manifiesto, todos los péptidos ejercieron a las dosis analizadas un potente efecto antifibrótico en el sistema experimental establecido que se caracterizó por una disminución rápida y aguda del material de colágeno y la matriz extracelular excesiva, la reducción de las células inductoras (mastocitos) y las células efectoras (fibroblastos y miofibroblastos). Cabe destacar que, dado que la tercera infiltración, todos los implantes que reciben cualquiera de los péptidos mostraron una marcada reducción del tamaño y adquirieron un color pálido y desvitalizado.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que contiene GHRP-6 para su uso en la prevención, control y eliminación de los depósitos patológicos de material fibrótico y el exceso de matriz extracelular de los órganos internos y la piel del organismo receptor.
- 5 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición elimina los depósitos intracelulares y extracelulares de materiales hialina y amiloides, formas granulares de material eosinófilo y/u osmófilo de órganos internos y externos y la red vascular.
3. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en la que dicha composición restaura la funcionalidad normal de cualquier órgano o tejido interno o externo afectado por los excesivos depósitos de material fibrótico, amiloide, osmófilo, eosinófilo o de hialina.
- 10 4. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición es para administrar a animales o pacientes por vía parenteral, incluidas las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal; o mediante infiltración en la piel, la mucosa, los epitelios o los órganos o, con mayor precisión, intralesional.
- 15 5. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición es para administrar a animales o pacientes por vía intrarectal.
6. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición es para administrar a animales o pacientes por vía tópica como formulaciones líquidas, comprimidas o sólidas o semisólidas.
- 20 7. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición es para administrar a animales o pacientes por cualquiera de las vías descritas en las reivindicaciones 5 y 6, y en la que dicha composición:
 - puede eliminar los depósitos de material fibrótico y el exceso de matriz extracelular en cualquier etiopatogenia hepática, como secuelas de hepatitis viral, alcoholismo, intoxicaciones, autoinmunitaria o idiopática, en general;
 - 25 -puede eliminar los depósitos de material fibrótico y el exceso de matriz extracelular de origen tóxico, profesional, relacionado con fármacos, radioactivo, autoinmunitarios, secuelas asmáticas, alérgicas o idiopático, en general en órganos como los pulmones;
 - puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibro-hialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular en órganos como los riñones, siendo la nefroesclerosis y/o la tubuloesclerosis de origen diabético, tóxico, profesional, relacionado con fármacos, autoinmunitarios o idiopático, en general, o secuelas de infecciones repetidas;
 - 30 -puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular de origen autoinmunitarios o idiopático, en general, en la piel;
 - puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular del páncreas y del tubo digestivo desde el esófago al recto;
 - 35 -puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular en la red vascular;
 - puede eliminar los depósitos de material fibrótico o amiloide y/u osmófilo o eosinófilo en el cerebro y las células cerebrales
 - puede reducir y/o eliminar el depósito de formas amiloides y/o hialina y/o granulares de material eosinófilo y/u osmófilo en la red vascular del cuerpo, incluido el sistema nervioso central y las meninges;
 - 40 - puede reducir y/o prevenir el depósito de formas fibróticas, amiloides y/o hialina y/o granulares de material eosinófilo y/u osmófilo en las paredes de vasos sanguíneos, en general;
 - puede reducir los depósitos de formas fibróticas, amiloides y/o hialina y/o granulares de material eosinófilo y/u osmófilo de nervios craneales, extracraneales, sensoriales, motores o mixtos y/o los del sistema neurovegetativo o
 - 45 - puede reducir y/o prevenir el depósito de formas fibróticas, amiloides y/o hialina y/o granulares de material eosinófilo y/u osmófilo en las paredes de vasos sanguíneos, en general.
8. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición es para administrar a animales o pacientes por cualquiera de las vías descritas en las reivindicaciones 4 y 6, y en la que dicha composición:
 - puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular de la piel, más exactamente queloides, cicatrices hipertróficas u otras formas de cicatrices exuberantes;
 - puede corregir el aspecto estético de la piel tras cirugía reconstructora, estética o similar, o
 - 55 -puede eliminar los depósitos de material fibrótico, fibrohialina o amiloide y el exceso de matriz extracelular de la piel, más exactamente secuelas fibróticas de cualquier forma de acné.
9. Uso de péptidos GHRP-6 o GHRP-2 o hexarelina para fabricar una composición farmacéutica para detener y controlar el proceso de depósito de formas fibróticas, amiloides y/o de hialina y/o formas granulares de material

eosinófilo y/u osmófilo en las células o el espacio extracelular tisular de los sistemas nerviosos central y periférico, y para administrar a animales o pacientes por cualquiera de las vías descritas en las reivindicaciones 4 y 5.

- 5 10. Uso de GHRP-6 para fabricar una composición farmacéutica para la prevención, el control y la eliminación de los depósitos patológicos de material fibrótico y el exceso de matriz extracelular de los órganos internos y la piel del organismo receptor.

Figura 1

