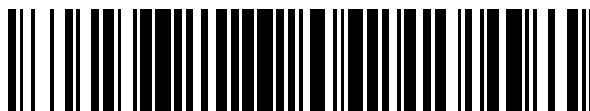


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 853**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/10** (2006.01)  
**A61P 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05738284 .8**  
96 Fecha de presentación: **04.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1755637**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Métodos para prevenir o tratar trastornos óseos**

30 Prioridad:  
**04.05.2004 AU 2004902388**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.11.2012**

73 Titular/es:  
**METABOLIC PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)**  
**2/320 Lorimer St**  
**Port Melbourne, VIC 3207, AU**

72 Inventor/es:  
**VOS, EVERT**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 391 853 T3

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).

**DESCRIPCIÓN**

Métodos para prevenir o tratar trastornos óseos

- 5 La presente invención se refiere a métodos para la prevención o el tratamiento de trastornos óseos y a compuestos para su uso en tales métodos. En particular, la invención se refiere a métodos para prevenir o tratar trastornos óseos que están caracterizados por un metabolismo óseo alterado, incluyendo osteoporosis, osteoporosis postmenopáusica, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis osteolíticas en pacientes con cáncer, osteodistrofia en enfermedades hepáticas y el metabolismo óseo alterado causado por insuficiencia renal o hemodiálisis, fractura ósea, cirugía ósea, envejecimiento, embarazo y malnutrición.

**Antecedentes de la invención**

- 15 Todas las referencias, incluyendo cualquiera de las patentes o solicitudes de patente, citadas en esta memoria descriptiva, no deben considerarse como que constituyen una admisión de que ninguno de estos documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica, ni Australia o en ningún otro país. El análisis de las referencias pone de manifiesto las afirmaciones de sus autores y los solicitantes se reservan el derecho de cambiar la veracidad e incumbencia de los documentos citados.

- 20 El hueso es un tejido vivo que está en constante renovación. Contiene células y fibras de colágeno especializadas incrustadas con un mineral cristalino. Juntos, los minerales, células y fibras forman una matriz orgánica u "osteide".

- 25 El hueso está sometido constantemente a formación ósea por osteoblastos y a reabsorción ósea por osteoclastos. Si los niveles de calcio en sangre disminuyen, la reabsorción del hueso aumenta para suplir las necesidades de calcio en cualquier parte del cuerpo.

El metabolismo alterado puede caracterizarse por un desequilibrio entre la formación ósea y la reabsorción ósea.

- 30 Esto puede suceder en relación a diversos tipos de trastornos. Son ejemplos la osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis osteolíticas en pacientes con cáncer, osteodistrofia en enfermedades hepáticas y el metabolismo óseo alterado causado por insuficiencia renal o hemodiálisis, fractura ósea, cirugía ósea, envejecimiento, embarazo y malnutrición.

- 35 La pérdida ósea se acelera con el envejecimiento. La enfermedad ósea más importante en la población de edad avanzada es la osteoporosis. Esta enfermedad se caracteriza por una enorme pérdida ósea que conduce a un aumento de la fragilidad ósea y existe mayor riesgo de que se produzcan fracturas. Produce un dolor considerable, discapacidad, deformidad y pérdida de independencia y supone un coste y una carga para los servicios sanitarios. A nivel internacional, como resultado de la osteoporosis, cada año se producen más de 1,5 millones de fracturas.

- 40 Existen dos tipos de osteoporosis reconocidos. El primero se produce típicamente entre los años 50 y 75 y afecta seis veces más a la mujer (osteoporosis postmenopáusica) que al hombre. El segundo tipo se denomina osteoporosis senil y afecta tanto a hombres como a mujeres de una edad de aproximadamente 75 años y no implica una pérdida ósea mayor de lo normal. En ambos tipos de osteoporosis, los factores de riesgo son, elevada ingesta de caféina, consumo de alcohol, bajo peso corporal y baja ingesta de calcio.

- 45 La causa más destacable y bien documentada de la osteoporosis postmenopáusica es la insuficiencia de estrógenos. Después de la menopausia, los ovarios dejan de producir esta hormona, que directamente se relaciona con pérdida de contenido mineral óseo. Un tratamiento conocido para los síntomas posmenopáusicos, incluyendo la osteoporosis, es la terapia de reemplazo hormonal (TRH), y este reemplazo de estrógenos previene eficazmente el desarrollo de la osteoporosis. Sin embargo el uso de la TRH puede tener efectos secundarios graves, por ejemplo, estimulación del crecimiento del tejido mamario, y se requiere un tratamiento alternativo para la osteoporosis postmenopáusica.

- 50 Las causas principales de otros tipos de trastornos óseos deben aún determinarse y se requiere un tratamiento para dichos trastornos.

- 55 El documento PCT/AU98/00724 describe el tratamiento de la obesidad usando análogos de la secuencia carboxi-terminal de una hormona de crecimiento, particularmente un análogo de la secuencia de carboxi-terminal de la hormona de crecimiento humano que contiene los restos de aminoácidos 177-191.

- 60 Giustina, A. et al., (1995) J. Clinical Endoc. and Metab. vol. 80, N° 1, páginas 122-129 describen que la hormona del crecimiento humano estimula la síntesis de proteínas y la actividad de osteoblastos y aumenta la síntesis ósea. Se sugiere que la hormona del crecimiento es útil en la prevención de la osteoporosis inducida por glucocorticoides pero puede tener posibles efectos secundarios de resistencia a insulina e hiperinsulinemia que conducen a intolerancia a los hidratos de carbono.

- 65

Un objetivo de una realización preferida de la presente invención es proporcionar un péptido para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de trastornos óseos y composiciones para su uso en dichos métodos.

## Resumen

5 En un primer aspecto, de acuerdo con la presente invención, en un mamífero se proporciona un péptido para su uso en un método de prevención o tratamiento de trastornos óseos, teniendo el péptido capacidad de modular el metabolismo de lípidos sin tener ningún efecto apreciable sobre el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1), comprendiendo el péptido un fragmento C terminal de la hormona del crecimiento. Este péptido se expone en la reivindicación 1.

10 En la patente australiana N° 693478 de la Universidad de Monash, para el control de la obesidad, se describe el uso de un péptido derivado de la secuencia carboxilo-terminal de la hormona del crecimiento humano, o de regiones correspondientes de la hormona del crecimiento de otras especies de mamíferos. Esta región de la hormona del crecimiento tiene la capacidad de modular el metabolismo de lípidos. En particular, se descubrió un péptido sintético correspondiente a los restos de aminoácidos 177-191 de la secuencia de la hormona del crecimiento humano (a partir de ahora, en lo sucesivo en el presente documento, denominado, hGH 177-191) que reducía el aumento de peso corporal y la masa de tejido adiposo en un sistema de modelo para la obesidad, el ratón C57B1/6J (Ob/Ob). Una solicitud posterior; PCT/AU98/00724 de Methabolic Pharmaceuticals Ltd, describe análogos del péptido hGH177-191 que comparten esta actividad.

La solicitud de los autores de la presente invención, PCT/AU00/01362 (WO01/33977), describe la sorprendente actividad oral de dichos péptidos.

25 Actualmente se han realizado estudios del AOD9604 (Tyr-hgH 177-191) sobre el esqueleto en un modelo de rata envejecida para la osteoporosis postmenopáusica. Como los péptidos que corresponden a fragmentos C terminal de la hormona del crecimiento humano, descritos en las solicitudes anteriores de los autores de la presente invención, no tienen ninguno de los efectos del crecimiento normal de la hormona del crecimiento de longitud completa normal y no tienen efecto sobre el IGF-1 (que media los efectos del crecimiento de la hormona de crecimiento humano), se esperaba no encontrar ningún efecto sobre el metabolismo óseo. Sorprendentemente, los autores encontraron, en dos estudios, que el AOD9604 tiene efectos sobre el crecimiento óseo y de hecho se encontró que el efecto sobre la prevención de la pérdida ósea era mejor que el del estrógeno.

35 Por lo tanto, el autor de la presente invención, ha reconocido que un péptido, correspondiente a un fragmento C-terminal de la hormona del crecimiento humano (AOD9604), tiene un efecto sobre el metabolismo óseo. Por lo tanto el autor de la presente invención propone que todos los fragmentos C-terminal de la hormona del crecimiento humano, que previamente hayan mostrado tener capacidad de modular el metabolismo de lípidos, tendrá un efecto similar al AOD9604 sobre el metabolismo óseo. Por consiguiente, los autores de la presente invención proponen que todos los péptidos, que previamente hayan mostrado tener capacidad de modular el metabolismo de lípidos sin tener ningún efecto sobre el IGF-1, puedan usarse para tratar o prevenir trastornos óseos.

45 De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de un péptido que tiene capacidad de modular el metabolismo de lípidos sin tener ningún efecto apreciable sobre el IGF-1 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos óseos, en el que el péptido comprende un fragmento C terminal de la hormona del crecimiento. Este uso del péptido se expone en la reivindicación 16.

Adicionalmente, el medicamento puede comprender uno o más agentes para el tratamiento o prevención de trastornos óseos.

50 Los trastornos óseos que el péptido del primer aspecto o el medicamento del segundo aspecto pueden tratar, incluyen aquellos trastornos que se caracterizan por un metabolismo óseo alterado.

El trastorno óseo puede ser, entre otros, osteoporosis, incluyendo osteoporosis postmenopáusica, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis osteolíticas en pacientes con cáncer, osteodistrofia en enfermedades hepáticas el y metabolismo óseo alterado causado por insuficiencia renal o hemodiálisis, fractura ósea, cirugía ósea, envejecimiento, embarazo y malnutrición.

La invención puede ser particularmente adecuada para el tratamiento o prevención de osteoporosis postmenopáusica.

## Breve descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama de barras de la concentración de AOD9604 frente a la cantidad de incorporación de timidina en cultivos de osteoblastos primarios en un ensayo de proliferación de osteoblastos.

Figura 2: Resumen y cronograma del diseño experimental para el Ejemplo 2.

Figura 3: Densidad Mineral Ósea (DMO) de todos los grupos de tratamiento 12 semanas después del Tratamiento de acuerdo con el Ejemplo 2 a) Vértebras Lumbares (L4+L5) b) Fémur.

Figura 4: Densidad Mineral Ósea de un modelo de ovariectomía que estudia a) vértebras lumbares (L4+L5) y b) fémur. \*\* se asignó significación a un valor de  $p < 0,05$ , \*\*\* se asignó tendencia a un valor de  $p < 0,1$ .

Figura 5: DMO de a) vértebras lumbares (L4+L5) (OVX frente a LAOD de 0,075, 0,05 y b) fémur (0,1, 0,01), que compara el control OVX con grupos de tratamiento con fármacos (\*se asignó significación a un valor de  $p < 0,01$ , \*\* se asignó significación a un valor de  $< 0,05$ , \*\*\* se asignó tendencia a un valor de  $p < 0,1$ ).

Figura 6: Resultados de flexión a tres puntos para el fémur derecho en comparación con todos los grupos de tratamiento A) tensión máxima B) presión a rotura (\*se indicó significación a un valor de  $p < 0,01$ . \*\* se indicó significación a un valor de  $p < 0,05$ ).

Figura 7: Resultados de flexión a tres puntos para el fémur derecho en comparación con todos los grupos de tratamiento A) Energía a Rotura Normalizada B) Módulo Elástico (\*se indicó significación a un valor de  $p < 0,01$ . \*\* se indicó significación a un valor de  $p < 0,05$ ).

Figura 8: Compresión vertebral de L5 en comparación con todos los grupos de tratamiento A) Energía a rotura Normalizada B) Módulo Elástico (\*\*se indicó significación a un valor de  $p < 0,05$ ).

Figura 9: Propiedades Mecánicas del Cuello Femoral A) Carga máxima (N) B) Deformación a rotura (mm).

\* representa significación a un valor de  $p < 0,01$ . \*\* representa significación a un valor de  $p < 0,05$ , \*\*\* representa tendencia a un valor de  $p < 0,1$ .

Figura 10: Propiedades Mecánicas del Cuello Femoral A) Energía a rotura (mJ) B) Rigidez (MPa) \* representa significación a un valor de  $p < 0,01$ , \*\* representa significación a un valor de  $p < 0,05$ , \*\*\* representa tendencia a un valor de  $p < 0,1$ .

### Descripción detallada

Con la secuencia de aminoácidos C-terminal de la hormona del crecimiento se corresponde especialmente un péptido que tiene la capacidad de modular el metabolismo de lípidos sin tener ningún efecto apreciable sobre el IGF-1. Tal péptido se denomina "fragmento C-terminal de la hormona del crecimiento". Para los fines de la presente memoria descriptiva, la expresión "fragmento C-terminal de la hormona del crecimiento" debe entenderse que significa un fragmento peptídico de la región carboxilo terminal de la secuencia de aminoácidos de una hormona de crecimiento de mamíferos que es capaz de reducir la actividad lipogénica; y, o estimular la lipólisis.

Como se usa en el presente documento, el término "péptido" significa cualquier cadena de aminoácidos con una longitud de 2 a 50 restos de aminoácidos, preferentemente de 2 a 20, más preferentemente una longitud de aproximadamente 15 restos de aminoácidos. Por consiguiente, el término péptido, como se usa en el presente documento, también incluye polipéptidos y puede usarse indistintamente con estos. El péptido para su uso de acuerdo con al presente invención no tiene la secuencia de longitud completa de la hormona del crecimiento humana o un análogo de la misma de otra especie. La hormona del crecimiento de longitud completa es capaz de modular el metabolismo de lípidos pero también modula el IGF-1. Por consiguiente, la hormona del crecimiento de longitud completa no se incluye dentro del ámbito de los péptidos para su uso de acuerdo con la presente invención.

Preferentemente, el péptido usado de acuerdo con la presente invención comprende al menos el bucle de una hormona del crecimiento de mamífero unido por disulfuro.

La expresión "fragmento de la hormona del crecimiento" también incluye los péptidos:

Ref. Nº	ESTRUCTURA
9502	Leu Arg Ile Val Gln Pen Arg Ser Val Glu Gly Ser Pen Gly Phe SEC ID Nº 1
9405	CH <sub>3</sub> CO- Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 2
9410	H - Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 3
9404	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe - CONH <sub>2</sub> SEC ID Nº 4
9407	Leu Arg Ile Val Gln Cys Lys Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 5
9408	Leu Arg Ile Val Gln Cys <u>Lys Ser Val Glu</u> Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 6 (enlace amida)
9604	Tyr Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 7
9605	Lys Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 8
9618	Lys Lys Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 9
9607	Ala Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 10
9606	Leu Lys Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 11
9608	Leu Arg Ala Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 12
9403	Leu Arg Lys Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 13
9609	Leu Arg Ile Ala Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 14
9610	Leu Arg Ile Val Ala Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 15
9612	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ala Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 16
9613	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Ala Glu Gly Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 17
9615	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Ala Ser Cys Gly Phe SEC ID Nº 18
9616	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ala Cys Gly Phe SEC ID Nº 19

9602 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Ala Phe SEC ID N° 20  
 9501 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu D-Ala Ser Cys D-Ala Phe SEC ID N° 21  
 9601 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Ala SEC ID N° 22

en el que las abreviaturas de los restos de aminoácidos usadas son de acuerdo con la nomenclatura de péptidos convencional:

- 5 Gly = Glicina; Ile = Isoleucina;  
 Glu = Ácido Glutámico; Phe = Fenilalanina;  
 Cys = Cisteína; Arg = Arginina; Gln = Glutamina;  
 Leu = Leucina; Ser = Serina; Val = Valina;  
 Lys = Lisina; Ala = Alanina;  
 10 Asp = Ácido Aspártico; His = Histidina;  
 Orn = Ornitina; Tyr = Tirosina;  
 Pen = Penicilamina(p, p'-Dimetil-Cisteína).

15 Todos los aminoácidos, excepto la glicina, tienen configuración L-absoluta, salvo que se indiquen como configuración D-absoluta. Todos los péptidos indicados anteriormente, tienen un enlace disulfuro cíclico entre Cys(182) y Cys(189) o Pen(182) y Pen(189), según sea apropiado. Estos péptidos son análogos funcionales de las secuencias carboxilo-terminal naturales de las hormonas del crecimiento de mamíferos, ya que el péptido análogo es capaz de modular el metabolismo de lípidos sin tener ningún efecto apreciable sobre el IGF-1. Los péptidos pueden derivar de fuentes naturales, producirse por tecnología de ADN recombinante o sintetizarse usando métodos sintéticos de péptidos convencionales. Debe entenderse que, dichos métodos sintéticos de péptidos incluyen métodos combinatorios. Preferentemente dichos análogos incluyen un enlace disulfuro que confiere al péptido una configuración cíclica.

25 Preferentemente, el péptido comprende los aminoácidos 182-189 (hGH 182-189), más preferentemente los aminoácidos 177-191 de la hormona del crecimiento humano (hGH 177-191). Incluso más preferentemente, el péptido es el análogo de la hormona de crecimiento humano, AOD9604 (Tyr-hGH 177-191). Sin embargo, se entenderá claramente que la invención es también aplicable a péptidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos de las hormonas del crecimiento de otras especies de mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, las de mamíferos domésticos tales como vacas, ovejas, cerdos y caballos, animales de compañía tales como gatos y perros, y animales de zoológico incluyendo félidos, cánidos y primates no humanos. Entre especies, hay una fuerte conservación de la secuencia de esta región de la hormona del crecimiento, como se expone en el documento PCT/AU98/00724 y en referencias citadas en el mismo.

35 El péptido también puede conjugarse con un compañero de fusión para permitir una biosíntesis y/o un transporte más fácil. Puede incorporarse en una composición farmacéutica convencional, o puede estar presente en un alimento modificado genéticamente, tal como se describe en el documento WO 01/33997.

40 Para la administración, el péptido puede administrarse en una composición farmacéutica junto con un transportador farmacéuticamente aceptable.

45 El péptido puede administrarse mediante cualquier vía adecuada, y el experto en la materia podrá determinar fácilmente la vía y la dosis más adecuada para la afección que vaya a tratarse. El péptido puede administrarse por vía oral, sublingual, bucal, intranasal, por inhalación, por vía transdérmica, tópica o parenteral en formulaciones unitarias de dosificación que contengan transportadores, adyuvantes y vehículos no tóxicos, convencionales, farmacéuticamente aceptables. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal, intracraneal.

50 La dosificación será realizará según el criterio del médico o veterinario tratante y dependerá de la naturaleza y de la patología que vaya a tratarse, de la edad y del estado de salud general del sujeto que vaya a tratarse, de la vía de administración y de cualquier tratamiento previo que pueda haberse administrado. El intervalo de dosificación puede ser de una vez por semana, de una vez al día o puede ser una liberación temporizada continua.

55 Preferentemente, el mamífero padece un trastorno óseo caracterizado por metabolismo óseo alterado, tal como osteoporosis, incluyendo osteoporosis post-menopáusica, osteopenia, enfermedad de Page, metástasis osteolíticas en pacientes con cáncer, osteodistrofia en enfermedades hepáticas y el metabolismo óseo alterado causado por insuficiencia renal y hemodiálisis, fractura ósea, cirugía ósea, envejecimiento, embarazo y malnutrición. El mamífero también puede carecer de hormona de crecimiento.

60 El mamífero puede ser un ser humano, o puede ser un animal doméstico o de compañía. Aunque particularmente se contempla que la presente invención se usa para el tratamiento médico de seres humanos, también es aplicable al tratamiento veterinario, incluyendo el tratamiento de animales de compañía, tales como perros y gatos, y animales domésticos, tales como caballos, vacas y ovejas o animales de zoológico tales como primates no humanos, félidos, cánidos, bóvidos y ungulados.

Preferentemente, el mamífero es un ser humano. El ser humano puede ser un niño o un adulto.

En la técnica se conocen bien métodos y transportadores farmacéuticos para la preparación de composiciones farmacéuticas, como se expone en libros de texto tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, Edición 20, Williams and Williams, Pennsylvania, USA (2000).

Como se usa en el presente documento, un "transportador farmacéuticamente aceptable" es un disolvente, agente de suspensión, excipiente o vehículo, farmacéuticamente aceptable, para administrar al sujeto el fragmento de la hormona del crecimiento y/o el agente farmacéuticamente activo. El transportador o diluyente, y otros excipientes, dependerán de la vía de administración, y de nuevo el experto en la materia podrá determinar fácilmente la formulación más adecuada para cada caso en particular.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "funcionalmente activo" y "actividad funcional" en referencia a un análogo significa que el análogo es capaz de (o tiene capacidad de) modular el metabolismo de lípidos sin tener ningún efecto apreciable sobre el IGF-1.

La capacidad de los péptidos usados de acuerdo con la presente invención para prevenir o tratar enfermedades óseas puede ponerse de manifiesto por la actividad de la formación de osteoblastos, como se describe en los ejemplos.

Particularmente, un ensayo para determinar si una variante es funcionalmente activa es aquel en el que la variante estimula la incorporación de timidina en osteoblastos de rata fetales primarios a un nivel estadísticamente significativo (para detalles adicionales, véase el Ejemplo 1).

Si dichas sustituciones no dan como resultado un cambio en la actividad funcional, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, indicados en la Tabla 1 como sustituciones ejemplares, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y el fragmento de la hormona del crecimiento variante resultante puede analizarse para determinar la actividad funcional.

Un experto en la materia, mediante métodos de conocimiento generales comunes, podrá determinar si un péptido tiene la capacidad de modular el metabolismo de lípidos pero sin tener efecto apreciable sobre el IGF-1.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sin efecto apreciable" significa que el efecto sobre el IGF-1 no es estadísticamente significativo y que si en un ensayo se registrase cualquier efecto de un péptido, este puede considerarse insignificante.

Una forma en la que un experto puede determinar si un péptido es capaz de modular el metabolismo de lípidos es realizando un ensayo de lipólisis, como se describe en el Ejemplo A. Resumiendo, las ratas se tratan y se sacrifican, se obtiene tejido adiposo de las ratas tratadas y de control, se coloca en viales y se añade terbutalina. Los viales se incuban a 37 °C durante 1 hora, se gasean con carbono y se someten a ensayo en un ensayo convencional con glicerol, usando, por ejemplo, un kit de ensayo tal como Sigma GPO-337.

El ensayo de lipogénesis descrito en el Ejemplo B es otro método mediante el cual un experto en la materia puede determinar si un péptido es capaz de modular el metabolismo de lípidos.

Para determinar si un péptido tiene un efecto apreciable sobre el IGF-1, un experto en la materia puede realizar un ensayo para el IGF-1 en una muestra de sangre (por ejemplo procedente de un ratón). Un kit de ensayo adecuado se encuentra disponible en R & D Systems, Inc., con el número de catálogo DY791. Este es un ensayo ELISA de tipo sándwich que usa, como anticuerpo de captura, anti-IGF-1 de ratón de hámster, y como anticuerpo de detección, anti-IGF-1 de ratón de cabra. En el Ejemplo C se proporcionan detalles más completos del ensayo.

Tabla 1

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	Gln
Asp (D)	glu	Glu
Cys (C)	ser	Ser
Gln (Q)	asn	Asn
Glu (E)	asp	Asp
Gly (G)	pro	Pro
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala	leu
Pro (P)	gly	gly
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Como se usa en el presente documento, las expresiones “cantidad terapéuticamente eficaz” y “cantidad terapéutica” son sinónimas y significan una cantidad de un péptido de la presente invención que es eficaz para producir una respuesta terapéutica deseada.

5 La cantidad terapéuticamente eficaz específica variará obviamente con factores tales como la afección particular que vaya a tratarse, el tipo de mamífero que vaya a tratarse, el estado físico y la historia clínica del mamífero, la duración del tratamiento, la naturaleza de terapias simultáneas (si hubiese), las formulaciones específicas empleadas y la estructura del péptido.

10 Generalmente, los términos “tratando”, “tratamiento” y similares, se usan en el presente documento, con el significado de afectar a un sujeto, tejido o célula, para obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a prevenir completa o parcialmente la pérdida ósea y/o puede ser terapéutico en cuanto a aumentar la formación ósea y/o de deposición de osteoblastos.

15 El término “tratamiento”, como se usa en el presente documento, incluye cualquier método de tratamiento de, o prevención de, una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero al cual aún no se le ha diagnosticado que tenga la enfermedad; inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o aliviar o mejorar los efectos de la enfermedad, es decir, ocasionar el retroceso de los efectos de la enfermedad.

20 El tercer aspecto de la invención incluye diversas composiciones farmacéuticas útiles para mejorar los trastornos óseos. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con una realización de la invención se preparan poniendo en contacto un péptido, correspondiente a un fragmento C-terminal de la hormona del crecimiento, variante o sus sales, de acuerdo con la reivindicación 1 y uno o más agentes activos contra trastornos óseos, juntos en una forma para administración adecuada para un sujeto usando transportadores, excipientes y aditivos o auxiliares.

25 Los agentes adicionales, activos contra trastornos óseos, incluyen calcio, minerales óseos, tales como magnesio y boro, ácido gamma linolénico, vitaminas, tales como vitamina D y vitamina K, estrógenos o uno o más compuestos que simulan estrógenos, usados en Terapia de Reemplazo de Estrógenos, bifosfonatos e isoflavonas.

30 El calcio puede añadirse para aumentar la deposición de calcio en los huesos. La fuente de calcio puede ser cualquier compuesto inorgánico u orgánico adecuado que contenga calcio. Son ejemplos de sales de calcio inorgánicas, por ejemplo, el cloruro de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, óxido de calcio, hidróxido de calcio o carbonato de calcio. Son ejemplos de compuestos de calcio orgánicos, la leche en polvo o el caseinato de calcio, citrato de calcio, malato de calcio, citrato malato de calcio o lactato de calcio. La cantidad de calcio es preferentemente de 200 a 1.500 mg por dosis diaria.

35 Los minerales óseos pueden añadirse para aumentar la fuerza de los huesos. Preferentemente, la preparación contiene de 100 mg a 500 mg de magnesio y de 2 mg a 6 mg de boro por dosis diaria.

El ácido gamma linolénico puede usarse para regular el metabolismo del calcio, preferentemente en una cantidad de 25 mg a 100 mg por dosis diaria.

40 Como cofactores pueden añadirse vitaminas para un metabolismo óseo óptimo. Preferentemente, la dosis diaria de vitamina K debe ser de 25 pg a 5 mg de vitamina K. La vitamina D se usa para aumentar la absorción del calcio desde el intestino. Preferentemente, en la preparación está presente una dosis diaria de 200 UI a 800 UI.

45 En la formulación también puede incluirse estrógenos, o uno o más compuestos que simulan estrógenos, usados en la Terapia de Reemplazo de Estrógenos. Son ejemplos de compuestos que simulan estrógenos, los fitoestrógenos, tales como genisteína, lignanos o coumeranos o preparaciones farmacéuticas tales como 17p-estradiol, estrógenos esterificados, sulfato de estrona, estrógeno equino conjugado y etinilestradiol. Para los fitoestrógenos la cantidad de estos compuestos es de 5-100 mug por dosis diaria. Para las preparaciones farmacéuticas, la cantidad activa se define en las instrucciones de los fabricantes.

50 Para inhibir la reabsorción ósea osteoclástica pueden usarse uno o más bifosfonatos. Son ejemplos de estos compuestos el alendronato y el risedronato. Preferentemente, la cantidad de estos compuestos es de 5 mg a 50 mg

por dosis diaria.

Las isoflavonas pueden obtenerse (aisladas) de la soja o del cohosh negro (hierba cinífuga) o pueden ser isoflavonas sintéticas. Las isoflavonas pueden añadirse en una cantidad de 10 a 75 mg por dosis diaria.

5 Las formulaciones de acuerdo con el tercer aspecto de la invención pueden contener adicionalmente otras fuentes de energía, tales como grasas e hidratos de carbono, proteínas, vitaminas, minerales, fibras, aromatizantes, conservantes, colorantes, edulcorantes, etc.

10 Cualquier combinación, químicamente compatible de agentes farmacéuticamente activos, se encuentra dentro del ámbito de la invención, siempre que la combinación no elimine la actividad del fragmento de la hormona del crecimiento de la presente invención.

15 Las composiciones farmacéuticas se preparan y administran preferentemente en unidades de dosificación. Las unidades de dosificación sólidas incluyen comprimidos, cápsulas y supositorios. Para el tratamiento de un sujeto, dependiendo de la actividad del compuesto, de la forma de administración, de la naturaleza y gravedad del trastorno, de la edad y del peso corporal del sujeto, pueden usarse diferentes dosis diarias. Sin embargo, en determinadas circunstancias, pueden ser apropiadas dosis diarias más altas o más bajas. La administración de la dosis diaria puede realizarse por administración sencilla en forma de una unidad de dosis individual o incluso unidades de 20 diversas dosis más pequeñas y también por administración múltiple de dosis subdivididas a intervalos específicos.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía local o sistémica en una dosis terapéuticamente eficaz. Las cantidades eficaces para este uso dependerán, por supuesto, de la gravedad de la enfermedad y del peso y estado general del sujeto. Típicamente, las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proporcionar una orientación útil en cuanto a las cantidades útiles para la administración *in situ* de la composición farmacéutica y pueden usarse modelos animales para determinar dosificaciones eficaces para el tratamiento de los efectos secundarios citotóxicos.

30 Una cantidad eficaz del fragmento de la hormona del crecimiento a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, de la vía de administración y de la afección del sujeto. Por consiguiente, será necesario que el terapeuta valore la dosificación y modifique la vía de administración según sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a hasta 100 mg/kg o más, dependiendo del modo de administración.

35 Los niveles de dosificación del fragmento de la hormona del crecimiento normalmente serán del orden de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal, variando una dosificación preferida entre aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal al día (de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 3 g por paciente al día). La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales transportadores para producir una dosificación sencilla variará, dependiendo del 40 hospedador que vaya a tratarse y del modo de administración particular. Por ejemplo, una formulación destinada para administración oral en seres humanos, puede contener de aproximadamente 5 mg a 1 g de un compuesto activo con una cantidad apropiada y conveniente de material transportador, que puede variar aproximadamente del 5 al 90% de la composición total. Las formas unitarias de dosificación generalmente contendrán entre 45 aproximadamente 5 mg a 500 mg de ingrediente activo.

50 Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción, combinación farmacológica y gravedad de la enfermedad particular que se está sometiendo a la terapia.

Para los propósitos de esta memoria descriptiva se entenderá claramente que la expresión "que comprende" significa "que incluye, aunque no necesariamente, limitado a", y que la palabra "comprende" tiene un significado correspondiente.

55 A continuación, la invención se describirá a modo de referencia únicamente en relación a los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplos

#### 60 PROTOCOLO DE TRATAMIENTO EN RATAS

Ratas: 16 ratas *Wistar* Macho.

65 Durante 29 días se alimentó a ratas *Wistar* magras con una dieta con alto contenido en grasas. Las ratas se pesaron semanalmente (incluyendo el día 0 de la administración del fármaco). Las ratas se mantuvieron con una dieta con alto contenido en grasas durante la administración del fármaco o la solución salina.



Se trataron 8 ratas (magras) *Wistar* macho (adultas) con fármaco (en solución salina) administrado mediante una vía de administración eficaz. También se trataron diariamente durante 29 días, 8 ratas (magras) *Wistar* macho (adultas) con solución salina (volumen equivalente).

5 El peso corporal se midió los días 0, y después semanalmente. La administración a los animales debe ser diaria, al mismo tiempo (8:30-9:30 am).

El día 28, se extraen muestras de sangre de todas las ratas y se conservan apropiadamente.

10 El día 29, después de la administración, antes del sacrificio, a los animales no se les priva de alimento ni de agua y se les permite libre acceso a los mismos.

Después de la última administración se deja a las ratas durante 2 horas (con libre acceso a agua y alimento). Durante este periodo, se preparan los tampones, las reservas de fármaco (terbutalina-HCl de Sigma) y se prepara el equipo de disección y el área de trabajo.

15 A cada vial (x6 para cada dilución por rata) se añaden 1,8 ml de tampón KRB (véase el anexo 3) (que contiene BSA al 2% y glucosa 1 mM), se tapa y se deja hasta realizar la disección tisular. Las soluciones de reserva de terbutalina se concentrarán 10X y posteriormente se añade el tejido a los viales, deberán añadirse 200 µl a cada dial justo antes de la incubación. Esto proporcionará concentraciones finales de terbutalina de 0 µmol/l, 0,1 g/mol y 0,5 µmol/l. Tapar y dejar la terbutalina en el refrigerador hasta antes de la incubación (¡¡sensible a la luz!!).

25 Dos horas después de la última administración se sacrifica a las ratas por decapitación inmediata. Inmediatamente se extirpa el tejido adiposo del epidídimo y se aclara meticulosamente en solución salina (a temperatura ambiente).

#### **EJEMPLO A - ENSAYO DE LIPÓLISIS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE UN PÉPTIDO PARA MODULAR EL METABOLISMO DE LÍPIDOS**

30 Se disecciona una almohadilla de tejido adiposo en 18 piezas homogéneas (8 copias por tratamiento con terbutalina) y cada pieza se coloca inmediatamente en el tampón KRB 1,8 ml. Se registran los pesos y la variación del tiempo de incubación se minimiza cortando todas las piezas primero y después colocándolas en los viales.

35 Se añaden 200 µl de solución de terbutalina a cada vial que contiene tejido y se colocan inmediatamente en la incubadora.

Se incuba durante 60 minutos a 37°C gaseando con carbógeno.

40 Después de la incubación, se extraen 100 µl de solución de incubación y se ponen en tubos de tipo *ependorf*. Se toman 10 µl de esta solución y se usan en el kit de ensayo de glicerol convencional (Sigma GPO-337). Se congelan los 90 µl restantes de la mezcla a -80°C.

#### **EJEMPLO B - ENSAYO DE LIPOGÉNESIS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE UN PÉPTIDO PARA MODULAR EL METABOLISMO DE LÍPIDOS**

45 Se toma la segunda almohadilla de tejido adiposo de cada rata. Se corta el tejido en piezas de peso similar (200 mg). Se cogen 6 piezas de tejido de cada rata.

50 Cada pieza de tejido se coloca en matraces cónicos de 10 ml que contienen 2 ml de tampón KRB / BSA al 2%, se combina la [<sup>12</sup>C]-glucosa con la [<sup>14</sup>C]-glucosa (actividad específica final de 0,05 µCi/µmol) e insulina humana (100 µU/ml). Se incuba durante 60 minutos en un baño de agua a 37 °C con agitación constante a 100 rpm y se gasea con O<sub>2</sub> al 95%/CO<sub>2</sub> al 5%.

55 Extraer los tejidos y aclarar 3 veces en NaCl al 0,9%, secar adsorbiendo con papel secante y colocar en tubos de vidrio (o Falcon) tapados a rosca que contienen una solución de 5 ml de cloroformo:metanol (2:1 v/v) y enfriar a 4 °C durante una noche.

60 El tejido se extrae (solución de conservación) y se coloca en un tubo de centrifuga de 10 ml con una solución de 2 ml de cloroformo:metanol (2:1 v/v), se somete a agitación vorticial y se enfría durante 30 minutos. La solución extracto de esta etapa se agrupa con el extracto de la etapa 4. El tejido se presiona con un rodillo de vidrio para extraer cualquier lípido restante.

Después, el tejido se mezcla con 2 ml de solución de metanol:MgCl<sub>2</sub> al 0,1% (1:1 v/v) durante 15 minutos a 4°C.

65 Los extractos agrupados de la etapa 5 y 6 se centrifugan a 10°C a 6.000xg durante 10 min.

La capa superior se extrae y se desecha. Cinco ml de la solución inferior se transfieren a un vial de recuento y se dejan evaporar con un vapor de aire caliente durante una noche.

El material seco se re-suspende en 1 ml de cloroformo al cual se añaden 10 ml de centelleante.

5

La radioactividad se mide durante 60 segundos y se expresa como dpm/mg de tejido.

### **EJEMPLO C - ENSAYO PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE EL IGF-1**

10 Para ensayar el efecto sobre el IGF-1 puede usarse el kit de desarrollo ELISA DuoSet proporcionado por R & D Research Systems, Inc. con número de catálogo DY791. Cada kit contiene los componentes básicos necesarios para el desarrollo de los ensayos ELISA de tipo sándwich para medir el IGF-1 en sobrenadantes de cultivo celular y en suero. Las instrucciones para el uso del kit DY791 para determinar el efecto sobre el IGF-1 se reproducen en el Anexo 1.

15

### **EJEMPLO 1**

#### **Materiales**

20 Péptido usado: AOD 9604, con una pureza del 95%  
 Proporcionado por: Metabolic Pharmaceutical Ltd  
 Conservación: -20°C  
 Solubilidad: se aconseja disolver a 1 mg/ml en solución salina; sin embargo, esto produce una solución turbia, centrifugar para eliminar el sobrenadante y someter a ensayo para proteína. La solución aún  
 25 contiene > 1 mg/ml, por lo tanto se supone que el precipitado no es proteína.

#### **Métodos**

#### *Ensayo de Proliferación de Osteoblastos Primarios*

30

El péptido AOD 9604 se sometió a ensayo en el sistema de cultivo de osteoblastos de rata fetales primarios, como se detalla más adelante. Las células de osteoblastos de rata primarios derivan de digestiones secuenciales con colagenasa de bóvedas craneales de rata de fetos de 21 días. Las digestiones 3-4 se agrupan y se cultivan en matraces T-75 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene Suero Bovino Fetal (FBS) al 10%.  
 35 Las células se cultivan hasta confluencia y después se someten a digestión con tripsina y se siembran en placas de 24 pocillos en medio esencial mínimo (MEM) que contiene FBS al 5% y se incuban durante 24 horas. Después, las células se privan de suero en MEM/BSA al 0,1% durante 24 horas. Se sustituye el medio; se añaden sustancias de cultivo y las células se incuban durante 24 horas más. Se añade <sup>3</sup>H-timidina 4 horas antes del final de este periodo de incubación. Las células se lavan y se añade TCA al 10% a los pocillos y las placas se dejan durante una noche a  
 40 4°C. Después, las placas se procesan para determinar la incorporación de timidina.

### **Resultados**

*El péptido AOD tiene un efecto anabólico sobre los osteoblastos primarios*

45

El péptido AOD estimuló significativamente la incorporación de timidina a concentraciones de  $10^{-10}$  M y  $10^{-9}$  M en osteoblastos de rata fetales primarios (Figura 1a). La significación se evaluó usando el ensayo de la t de Student.

### **Conclusiones**

50 El péptido AOD fue significativamente mitogénico en cultivos de osteoblastos primarios. Por lo tanto, tiene el perfil de un anabólico óseo, y puede tener potencial como un compuesto terapéutico en el área ósea.

### **EJEMPLO 2**

55 Este estudio investiga el efecto del péptido AOD 9604, en el esqueleto en un modelo de rata envejecida para detectar osteoporosis post-menopáusica. Se esperaba que el AOD no impidiese los cambios óseos que se producen como resultado de la ovariectomía en la rata.

#### **Materiales y Métodos**

60

#### *(a) Cuidado y Alojamiento de los Animales*

Este estudio incluyó un total de 96 ratas (*Rattus norvegicus*), Sprague-Dawley, hembra envejecidas, de aproximadamente 9 meses de vida, obtenidas en Harlan (Harlan Farms, Indiana). Las ratas se dividieron al azar en  
 65 8 grupos. Para la duración del estudio de 12 semanas, se alojaron en una instalación para animales de la *Division of Comparative Medicine* en la Universidad de Toronto. Las ratas se guardaron en pares en jaulas de plástico

transparente con un lecho de harina de maíz y un tubo de plástico para el alojamiento. Todas las ratas disponían libremente de agua corriente y pienso de laboratorio. La sala se controló diariamente para tener una temperatura constante de 20,5°C y a una humedad del 60%.

#### 5 (b) Preparación y Administración del Fármaco

Durante 12 semanas, 5 días por semana, las ratas en los grupos de tratamiento con GH y AOD, recibieron la administración por inyección. Todos los tratamientos se administraron por inyección subcutánea. El grupo de tratamiento con GH se trató con GH humana recombinante (BresaGen, Adelaide, Australia). Esta se reconstituyó siguiendo las instrucciones del fabricante y se separó en alícuotas diarias y se congeló a -70°C durante hasta 10 periodos de 4 semanas. Los grupos de tratamiento con AOD se trataron con AOD 9406 (Formatech Inc., Andover MA, U.S.A), que se conservó liofilizado a 4°C. El péptido se preparó de acuerdo con el protocolo de la compañía farmacéutica. Este se completó diariamente y se usó a las 4 horas de la preparación. La concentración del fármaco se recalculó después de 4, 8 y 10 semanas con el peso de las ratas para garantizar una dosificación constante a lo 15 largo del experimento.

#### Diseño Experimental

Noventa y seis ratas Sprague-Dawley envejecidas se asignaron al azar a uno de los ocho grupos. Los dos primeros grupos se operaron de manera simulada. El Grupo 1 se conservó como un control, Simulado y el Grupo 2 se trató con 2,5 mg/kg/día de GH humana recombinante (rhGH) (BresaGen). Los seis grupos restantes procedentes de Harlan, se ovariectomizaron (OVX). Esta cirugía se realizó aproximadamente 8 días antes de comenzar el tratamiento. El Grupo 3 se dejó como un control para el modelo OVX. Al Grupo 4 se le administró un tratamiento de 2,5 mg/kg/día de rhGH. El Grupo 5 se trató con una dosis baja de péptido AOD (LAOD, por las siglas *Low Dose* AOD) de 0,75 mg/kg/día y el Grupo 6 se trató con una alta dosis de péptido AOD (HAOD, *High Dose* AOD) de 2,0 mg/kg/día. Los dos grupos finales del modelo OVX recibieron un gránulo de administración lenta de estrógeno 17B (0,01mg/día, 17B-estradiol, Innovative Research of America, Sarasota FL, U.S.A), que se implantó por vía subcutánea en la parte posterior del cuello. El Grupo 7 se dejó como un control de estrógeno y al Grupo 8 se le proporcionó un tratamiento de dosis altas de péptido AOD (HAOD) de 2,0 mg/kg/día, Formatech Inc. A continuación se proporciona un resumen de los grupos y tratamientos. 20 25 30

Grupo	Número de Ratas	Modelo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)
1	12	Simulado	----	----
2	12	Simulado	RhGH	2,5
3	12	OVX	----	----
4	12	OVX	RhGH	2,5
5	12	OVX	Dosis baja de AOD	0,75
6	12	OVX	Dosis alta de AOD	2,0
7	12	OVX	Estrógeno (E)	0,01 mg/día
8	12	OVX	E+ HAOD	0,01 mg/día 2,0

Antes de comenzar los tratamientos, las ratas se pesaron y se extrajo 1 ml de muestra de sangre. Después de 4, 8 y 12 semanas se volvieron a extraer muestras de sangre. Las muestras de sangre se centrifugaron en tubos separadores de suero durante 10 minutos a 100 x g. El suero se retiró y se separó en cuatro partes alícuotas para análisis posterior. Las alícuotas se conservaron a -20°C. Todas las ratas recibieron una inyección intraperitoneal de oxitetraciclina 30 mg/ml (Tetraject LP, Bimeda - MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canadá) los días 13 y 3 35 antes del sacrificio. Si se requiere realizar cualquier dilución se hace usando solución salina estéril.

Al final del periodo de tratamiento de 12 semanas, las ratas se anestesiaron y se pesaron. Aún bajo la anestesia, las ratas se sacrificaron por desangrado. Los fémures, tibias y columna vertebral se extrajeron y se colocaron en tubos previamente marcados. Los huesos se colocaron inmediatamente en hielo seco y posteriormente se conservaron a -70°C. La Figura 2 muestra el resumen y el cronograma del experimento. 40

#### 45 Absorciometría de rayos X de energía doble (DEXA)

La absorciometría de rayos X de energía doble (DEXA) se usa para medir el contenido mineral óseo (CMO) y calcular la densidad mineral ósea (DMO). El DEXA se realizó usando un densitómetro PIXImus (Lunar GE Corp., Madison, WI, U.S.A), diseñado específicamente para la medición de animales pequeños. Las mediciones se toman exponiendo una muestra a un haz de forma cónica de rayos X de alta y baja energía. El haz de baja energía pasa a través del tejido blando pero no del hueso, mientras que el haz de alta energía pasa a través de todo el material. La densidad ósea se calcula en base a la energía absorbida por el hueso a partir de los haces de alta y baja energía. El aparato se calibra antes de cada uso usando un espectro de aluminio/lucite colocado a una distancia de un centímetro desde la parte posterior del área de exploración PIXImus. 50

55

Se exploraron el fémur y las vértebras lumbares 4 y 5 extraídos y limpios. Las muestras se colocaron individualmente, se semi-congelaron en una placa especializada fabricada de poliestireno para simular el grosor equivalente del tejido blando sobre el hueso. Para cada medición, todas las muestras se colocaron en la misma orientación. La DMO de las vértebras lumbares L4 y L5 se añadieron junto con los análisis globales.

5 Para calcular la DMO, a partir del CMO y el área, se usó un programa informático proporcionado por el fabricante,  $[DMO(g/cm^2) = CMO (g)/\text{área} (cm^2)]$ . El área se definió manualmente midiendo un recuadro alrededor de la muestra denominada, región de interés (RDI).

## 10 **Análisis estadístico**

Todos los datos se presentaron como media, +/- error típico de la media (ETM). El análisis estadístico se realizó usando el programa informático estadístico, SPSS (versión 10.0).

15 Las comparaciones que implicaban dos grupos se analizaron mediante un ensayo independiente de la t de Student. Para comparaciones múltiples, se realizó el ensayo de homogeneidad de varianzas de Levene como un ensayo para determinar la misma varianza. Si los datos tenían la misma varianza, se analizaban comparaciones múltiples mediante análisis ANOVA de una vía usando el ensayo protegido de Fisher de correlación coincidente (*post hoc*) de la mínima diferencia significativa (LSD). A un valor de  $p < 0,05$  se le asignó significación y a un valor de  $p < 0,1$  se le asignó tendencia.

## 20 **Absorciometría de rayos X de energía doble (DEXA)**

25 Para calcular la densidad mineral ósea (DMO) se usó DEXA. La DMO de las vértebras lumbares se usó principalmente para determinar cambios en la masa ósea trabecular, mientras que los fémures extraídos se usaron principalmente para determinar cambios en la masa ósea cortical.

### *Efecto de la ovariectomía*

30 Se estudió el efecto de la ovariectomía sobre la densidad mineral ósea para confirmar el modelo de falta de estrógenos para la osteoporosis postmenopáusicas. El análisis del ensayo t reveló que hubo una disminución significativa en la DMO de las vértebras lumbares en el grupo OVX en comparación con la DMO del grupo simulado de control ( $p = 0,02$ ), mostrado en la Figura 4a. Este efecto también se produjo en el fémur, como se muestra en la Figura 4b, en donde de nuevo hubo una disminución significativa en la DMO del grupo OVX en comparación con el simulado ( $p = 0,046$ ). Esto confirma que el modelo OVX es funcional en este estudio.

### *Efecto del tratamiento con el péptido AOD*

40 El cambio de la DMO en respuesta al péptido AOD difiere entre las vértebras lumbares y el fémur. En el análisis ANOVA de las vértebras lumbares se indica que tanto una dosis alta ( $p = 0,05$ ) como una dosis baja ( $p = 0,076$ ) de AOD aumentó significativamente la DMO en comparación con el control OVX, como se muestra en la Figura 5a. La DMO regresó a la de los niveles de control simulado.

45 Hubo una tendencia para la DMO femoral a aumentar con la dosis baja de AOD ( $p = 0,107$ ) pero, como se muestra en la Figura 5b, este efecto no se observó con la dosis alta de AOD. La dosis alta de AOD no produjo ningún aumento en la DMO y tuvo una DMO similar a la del grupo de control OVX. La DMO del grupo de dosis alta de AOD fue significativamente inferior que la del grupo de dosis baja de AOD ( $p = 0,013$ ).

50 En total, con tratamiento de AOD, hubo un aumento en la DMO en las vértebras lumbares y fémur, pero hubo un aumento más significativo en las vértebras lumbares.

## **EJEMPLO 3**

### **Métodos de ensayos mecánicos**

55 Para determinar las propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular se efectuaron tres ensayos. Para examinar las propiedades mecánicas y materiales del hueso cortical se realizaron ensayos de torsión y de flexión a tres puntos. Para investigar las propiedades mecánicas y materiales del hueso trabecular se realizó un ensayo de compresión vertebral.

### **Análisis estadístico**

65 Todos los datos se presentaron como media, +/- error típico de la media (ETM). El análisis estadístico se realizó usando el programa informático estadístico, SPSS (versión 10.0). Las comparaciones que implicaban dos grupos se analizaron mediante un ensayo independiente de la t de Student. Las comparaciones múltiples, se analizaron mediante análisis ANOVA de una vía usando el ensayo protegido de Fisher de correlación coincidente (*post hoc*) de

la mínima diferencia significativa (LSD). A un valor de  $p < 0,05$  se le asignó significación y a un valor de  $p < 0,1$  se le asignó tendencia.

### Flexión a tres puntos

5 Para el ensayo de flexión a tres puntos se usó el fémur derecho. Dos días antes del ensayo, los huesos a ensayar se transfirieron a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  desde un congelador a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La noche antes del ensayo, las muestras se sacaron del congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se envolvieron individualmente en una gasa empapada en solución salina. Después, estas muestras se colocaron a una temperatura de aproximadamente  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante una noche para garantizar que las muestras estuviesen completamente descongeladas. Antes del ensayo, se midieron los huesos para determinar la colocación de la muestra sobre el dispositivo de sujeción. En primer lugar, se midió la longitud del hueso con calibradores digitales. Desde el extremo distal del fémur, se puso una marca sobre el hueso al 25% de la longitud total. Desde el primer punto, se puso una segunda marca a 15,6 mm, la longitud de referencia, y finalmente se puso una marca en el central de la longitud de referencia.

15 El ensayo se realizó en un aparato de ensayo mecánico (Instron 4465, Instron Canada Inc., Toronto, ON, Canadá) usando una célula de carga de 1000 Newton. La célula de carga se ajustó y se equilibró después de instalar el dispositivo de sujeción de flexión a tres puntos. El dispositivo de sujeción de acero inoxidable para el ensayo consistía en una base con dos soportes y en un indentador que se acopló a la cruceta del Instron. Todas las muestras se colocaron en la misma orientación, con el lado anterior mirando hacia arriba, permaneciendo naturalmente sobre los soportes en su posición más estable. Las marcas de la longitud de referencia se alinearon con los 2 soportes del dispositivo de sujeción y el indentador se alineó con el punto central de la longitud de referencia. Los huesos se precargaron con aproximadamente 1,0 N. El ensayo se ejecutó a una velocidad de 1 mm/min hasta la rotura. Los datos de carga frente a tiempo se adquirieron desde el Instron por un programa informático de adquisición de datos de LabView (National Instruments Corp.; Austin, TX). Se tomaron imágenes digitales de la sección transversal del fémur en el punto de inflexión (Nikon 8500, Nikon Canada). Se usó un programa informático de análisis de imágenes (ImageJ 1.28u, Nacional Institute of Health) para determinar los tamaños de los huesos así como para calcular el momento de inercia. Se midieron los diámetros en las direcciones medio-lateral (M/L) y anterior/posterior(A/P) así como el grosor.

20 Los datos en función del tiempo se convirtieron en datos de deformación para construir una curva de deformación bajo carga usando un programa informático de hojas de cálculo (Excel2000, Microsoft). A partir de esta curva se determinaron las propiedades mecánicas no normalizadas; incluyendo la carga máxima, el punto de deformación a rotura, la energía a rotura (área bajo la curva) y rigidez (pendiente de región lineal).

25 El diámetro y el momento de inercia se usaron para convertir la curva de deformación bajo carga en una curva de tensión-presión. Las propiedades mecánicas normalizadas extraídas de la curva de tensión/presión incluyeron tensión máxima, presión de rotura, energía a rotura normalizada, un módulo elástico.

### 40 Compresión vertebral

Para el ensayo de compresión se usó la 5ª vértebra lumbar (L5). En todos los procesos las vértebras se trituraron, dejando solo el cuerpo vertebral para el ensayo. Al menos un día antes del ensayo, los huesos objeto de ensayo se sacaron del congelador que estaba a una temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se pusieron en un congelador a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al menos dos horas antes del ensayo las muestras se sacaron del congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para garantizar que los huesos estaban completamente descongelados. Las vértebras se envolvieron individualmente en una gasa empapada en solución salina durante la descongelación.

50 Se tomaron imágenes digitales y se usó un programa informático de análisis de imágenes (ImageJ 1.28u, NIH) para determinar la altura y el área de sección transversal del cuerpo vertebral. El ensayo de compresión se realizó en un aparato de ensayo mecánico (Instron 4465, Instron Canadá) usando una célula de carga de 1000N. Los cuerpos vertebrales se colocaron en el pocillo superficial del dispositivo de sujeción con la parte caudal o lado plano hacia abajo. Las muestras se sujetaron con 3 tornillos y después se rodearon con PMMA. Las vértebras se cubrieron con una gasa empapada en solución salina mientras que el PMMA se ajustaba durante al menos 10 minutos. Se usó una cantidad pequeña de PMMA para compensar la superficie de carga de las vértebras. Las muestras se precargaron aproximadamente con 1,0 N y se dejaron durante aproximadamente 3 minutos para que se estableciese el PMMA. Mientras se precargaban las muestras, se midió la distancia entre las platinas usando calibradores digitales. La longitud de referencia se determinó después restando la altura del dispositivo de sujeción a la distancia entre las platinas. El hueso se cargó a 1,0 mm/min hasta la rotura. La rotura para la compresión vertebral se definió como un descenso obvio de la fuerza o, en casos menos definidos, como un descenso de la fuerza del 10%.

60 Los datos de carga frente a tiempo se adquirieron a partir del Instron por el programa informático de adquisición de datos LabView. Se tomaron imágenes digitales para determinar la altura y el área de sección transversal usando un programa informático de análisis de imágenes (ImageJ, NIH).

65

Para construir una curva de deformación a carga, el tiempo se convirtió en datos de deformación. A partir de esta curva se determinaron las propiedades mecánicas no normalizadas incluyendo, la carga máxima, el punto de deformación a rotura, la energía a rotura (área bajo la curva) y la rigidez (pendiente de regresión lineal). El área de sección transversal tomada a partir de la imagen digital y la longitud de referencia se usaron para convertir la curva de deformación a carga en una curva de tensión-presión. Las propiedades normalizadas extraídas de la curva de tensión-presión incluyeron, tensión máxima, presión a rotura, energía a rotura normalizada (área bajo la curva) y módulo elástico (pendiente)

### Fractura del cuello femoral

10 Para ensayar la fractura del cuello femoral se usó el fémur proximal derecho. Antes del ensayo, se tomaron rayos X del fémur proximal, para garantizar que la cabeza femoral estaba aplastada contra la película. Los huesos a ensayar se sacaron de un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se envolvieron individualmente en una gasa empapada con solución salina. Después, las muestras se dejaron a temperatura ambiente, a aproximadamente  $21^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas para garantizar que las muestras estaban completamente descongeladas. Antes del ensayo se eliminó cualquier tejido conectivo que rodeaba el cuello femoral.

15 El ensayo se realizó en el Instron 4464. Las muestras se sujetaron al dispositivo de sujeción usando 4 tornillos de extremos planos. La muestra se alineó visualmente de manera que el eje longitudinal fuese perpendicular al pocillo del dispositivo de sujeción y tuviese una longitud de referencia (desde el extremo del hueso a la parte superior del pocillo del dispositivo de sujeción) de aproximadamente 11 mm. El pocillo del dispositivo de sujeción se llenó después con PMMA y se dejó establecer durante 10 minutos. Mientras se establecía, la muestra se cubrió con una gasa empapada con solución salina. Antes del ensayo, se usaron calibradores digitales para medir la longitud de referencia exacta y el diámetro del cuello femoral en dirección medial/lateral y en dirección anterior/posterior. Una vez establecida la muestra y tomadas las medidas, esta se cargó en la máquina Instron y el cuello femoral se alineó con el borde del taladro en la placa inferior. Se aplicó una precarga de aproximadamente 1,0 N. El ensayo se procesó a 2,5 mm/min hasta la rotura.

20 Para construir una curva de deformación a carga, el tiempo se convirtió en datos de deformación. A partir de esta curva se determinaron las propiedades mecánicas no normalizadas incluyendo, la carga máxima, el punto de deformación a rotura, la energía a rotura (área bajo la curva) y la rigidez (pendiente de regresión lineal). Estas propiedades mecánicas se compararon directamente sin ninguna normalización debido a la geometría compleja del cuello femoral y a la combinación de cargas diferentes (fuerza compresiva, fuerza de cizalla y fuerza de flexión) aplicadas a la muestra.

### 35 Resultados de los ensayos mecánicos

Las propiedades mecánicas no normalizadas se tomaron a partir de la curva de desplazamiento de carga generada en los ensayos de flexión a tres puntos, torsión y compresión vertebral. Estos datos se normalizaron usando parámetros geométricos. Los parámetros normalizados se compararon para diferencias significativas. Si durante el ensayo de los huesos se producían problemas, estos ensayos se excluían de los análisis. Una muestra del grupo HAOD tuvo un callo anómalo en el fémur derecho y no se sometió a ensayo. Los datos aislados descubiertos con ensayo estadístico se excluyeron de los análisis posteriores.

### 45 Flexión a tres puntos

El ensayo de flexión a tres puntos se realizó en el fémur y representa propiedades mecánicas del hueso cortical. Los gráficos que muestran datos de los grupos para tensión máxima, presión a rotura, energía a rotura y módulo elástico pueden observarse en las Figuras 6 y 7.

### 50 Efecto del tratamiento con AOD

El tratamiento con AOD, tanto a dosis bajas (LAOD) como a dosis altas (HAOD), no mostró diferencias significativas en la tensión máxima, aunque se observaron tendencias que indicaban que los grupos LAOD y HAOD tenían una tensión máxima más alta en comparación con el grupo de control OVX ( $p = 0,062$ ,  $p = 0,076$ ). El grupo HAOD y OVX tuvieron presiones y módulo elástico similares, pero el grupo LAOD tuvo un módulo elástico más alto ( $p = 0,014$ ) y una presión a rotura más baja ( $p = 0,005$ ). Véase la Figura 6 y la Figura 7.

### Sumario

60 El modelo OVX mostró ser funcional por la disminución de la fuerza de hueso cortical y rigidez en comparación con el simulado. Se observó un efecto diferencial entre la dosis baja y la dosis alta del tratamiento con el fármaco AOD. Ambas dosis aumentaron la fuerza en comparación con OVX pero la dosis más baja fue más eficaz y también aumentó la rigidez.

### 65 Compresión vertebral

Se realizó un ensayo de compresión vertebral en la 5ª vertebral lumbar y representó las propiedades mecánicas del hueso trabecular. Unas pocas vértebras que se habían cortado demasiado cerca del cuerpo vertebral tuvieron carcasas corticales comprometidas y por lo tanto se excluyeron de los análisis.

#### 5 *Efecto del tratamiento con AOD*

El grupo tratado con LAOD tuvo un módulo elástico superior que el control OVX ( $p = 0,05$ ). Véase la Figura 8.

#### 10 **Sumario**

10 El tratamiento con la dosis baja de AOD mostró una tendencia de rigidez aumentada en comparación con OVX representado por un aumento en el módulo elástico. El tratamiento con estrógenos no impidió una disminución en la fuerza y rigidez causada por OVX aunque los valores de tensión y módulo elástico fueron superiores. Globalmente  
15 al igual que la GH intacta, el AOD tiene un efecto similar sobre el esqueleto. Se sabe que la GH aumenta la formación de hueso cortical en la superficie periosteal.

#### **Fractura de cuello femoral**

#### 20 *Efecto del AOD*

El AOD ejerce influencia sobre la deformación y rigidez del cuello femoral. Las ratas OVX tuvieron una deformación significativamente superior que la de los grupos tratados con una dosis baja de AOD y los tratados con una dosis alta de AOD (0,017, 0,009). Ambos grupos tratados con AOD tuvieron una mayor rigidez en comparación con la del  
25 grupo OVX ( $p = 0,092$ ,  $p = 0,023$ ) pero solo hubo una diferencia significativa con el grupo HAOD. El grupo OVX tuvo una energía a rotura significativamente superior debido a la mayor ductilidad ( $p = 0,013$ ,  $p = 0,008$ ). En los grupos tratados con AOD hubo un aumento en cuanto a la rigidez, lo que puede indicar que la disminución en cuanto a la calidad del hueso, que se produce en las ratas OVX, puede haberse evitado. Véanse las Figuras 9 y 10.

#### 30 **Sumario**

La ovariectomía produjo una disminución en la fuerza y rigidez del cuello femoral. Esto se debe principalmente a una pérdida de hueso trabecular en el cuello femoral. Esto reafirma de nuevo que el modelo OVX es funcional. El  
35 tratamiento con la dosis baja y con la dosis alta de AOD mostró una tendencia de rigidez aumentada en comparación con OVX pero no mostró diferencias en cuanto a la fuerza. Esto podría deberse a cambios materiales tales como cambios en el mineral o en el colágeno.

#### **Discusión**

40 Los autores de la invención formularon la hipótesis de que el AOD podría no prevenir los cambios esqueléticos resultantes de una ovariectomía y por lo tanto no tuviese ningún efecto sobre el metabolismo óseo. Los resultados de este estudio sugieren que la hipótesis era incorrecta y que el AOD tiene un efecto sobre el esqueleto. Durante el estudio se observó la prevención de muchos cambios esqueléticos que se producen con la ovariectomía. Se pensó  
45 que el péptido AOD 9604 sólo contenido en el dominio podría estimular la lipólisis pero no el metabolismo óseo. Los autores de la invención piensan que dado que la GH intacta tiene diferentes células diana dentro del organismo, es plausible que el AOD interaccione con células óseas.

El AOD tuvo efectos tanto en el hueso trabecular como en el hueso cortical, pero afectó principalmente al hueso cortical. Se pensó que el AOD tenía efectos similares en el esqueleto, al igual que la molécula de GH intacta. El  
50 AOD también previene la disminución de la DMO cortical y el ensayo mecánico mostró que la dosis baja de AOD prevenía el debilitamiento óseo cortical. En el hueso trabecular el AOD tuvo poco efecto.

#### ANEXO 1

#### 55 **IGF-I de ratón**

Número de catálogo: DY791

60 El kit de desarrollo ELISA DuoSet contenía los componentes básicos necesarios para el desarrollo de los ensayos ELISA de tipo sándwich para medir el factor de crecimiento insulínico (IGF-1) recombinante y natural de ratón en sobrenadantes de cultivo celular y en suero.<sup>1</sup> Cada kit contenía materiales suficientes para procesar los ensayos ELISA aproximadamente en cincuenta placas de 96 pocillos, siempre que se cumpliesen las siguientes condiciones:<sup>2</sup>

- Procesar el ensayo como se resume en el protocolo del ensayo ELISA General.
- Utilizar las microplacas, tampones, diluyentes, sustratos y soluciones recomendadas.

65

Antes de utilizar este producto han de leerse todas las instrucciones.

## MATERIALES PROPORCIONADOS

### 5 Antes del uso llevar todos los reactivos a temperatura ambiente.

**Anticuerpo de captura (parte 841413, 1 vial)** - 720 µg/ml de anti-IGF-I de ratón de hámster se reconstituyeron con 1,0 ml de PBS. Después de la reconstitución, se conservó a una temperatura de 2 - 8°C durante hasta 60 días o se dividió en partes alícuotas y se conservó a una temperatura de -20°C a -70°C en un congelador manual durante hasta 6 meses.<sup>3</sup> Se diluyó a una concentración de trabajo de 4,0 µg/ml en PBS,<sup>4</sup> sin proteína transportadora.

**Anticuerpo de detección (parte 841414, 1 vial)** - 36 µg/ml de anti-IGF-I de ratón de cabra biotinilado se reconstituyeron con 1,0 ml de diluyente reactivo (véase la sección Soluciones Necesarias). Después de la reconstitución, se conservó a una temperatura de 2 - 8°C durante hasta 60 días o se dividió en partes alícuotas y se conservó a una temperatura de -20°C a -70°C en un congelador manual durante hasta 6 meses.<sup>3</sup> Se diluyó a una concentración de trabajo de 200 ng/ml en diluyente reactivo.<sup>4</sup>

**Patrón (parte 841415, 1 vial)** - 100 ng/ml de IGF-I recombinante de ratón se reconstituyeron con 0,5 ml de diluyente reactivo (véase la sección Soluciones Necesarias). Antes de preparar las diluciones, se dejó reposar durante un mínimo de 15 minutos con agitación suave. El patrón reconstituido se conservó a una temperatura de 2 - 8°C durante hasta 60 días o se dividió en partes alícuotas y se conservó a una temperatura de -70°C durante hasta 6 meses. Se recomienda una curva patrón de siete puntos usando diluciones en serie con factor de dilución 2 en el diluyente reactivo y un patrón alto de 2000 pg/ml.

**Estreptavidina-HRP (parte 890803, 1 vial)** - 1,0 ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. Después del uso inicial se conservó a una temperatura de 2-8°C durante hasta 6 meses.<sup>3</sup> **SIN CONGELACIÓN.** Se diluyó la concentración de trabajo especificada en la etiqueta del vial usando diluyente reactivo (véase la sección Soluciones Necesarias).<sup>4</sup>

### 30 SOLUCIONES NECESARIAS

**PBS** - NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,2 - 7,4, 0,2 µm filtrado.

**Tampón de lavado** - Tween<sup>®</sup> 20 al 0,05% en PBS, pH 7,2 - 7,4 (R&D Systems N° de catálogo WA126).

**Tampón de bloqueo** - Tween 20 al 5% en PBS con NaN<sub>3</sub> al 0,05%.

**Diluyente reactivo**<sup>1</sup> - Tween 20 al 5% en PBS, pH 7,2 - 7,4, 0,2 µm filtrado.

**Solución de sustrato** - mezcla 1:1 de reactivo A colorante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y reactivo B colorante (tetrametilbenzidina) (R&D Systems catálogo N° DY999).

**Solución de detención** - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (R&D Systems catálogo N° DY994).

### 45 PROTOCOLO DE ENSAYO ELISA GENERAL

#### Preparación de placas

1. Diluir el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo en PBS sin proteína transportadora. Inmediatamente revestir una microplaca<sup>5</sup> de 96 pocillos con 100 µl por pocillo del anticuerpo de captura diluido. Sellar la placa e incubar durante una noche a temperatura ambiente.

2. Aspirar cada pocillo y lavar con tampón de lavado, repetir el proceso dos veces durante un total de tres lavados. Lavar llenando cada pocillo con tampón de lavado (400 µl) usando un frasco con chorro, un dispensador colector o un autolavador. Para un buen resultado es esencial que en cada etapa se elimine por completo el líquido. Después del último lavado, eliminar cualquier resto de tampón de lavado aspirando o invirtiendo la placa y secándola por adsorción con toallitas de papel de limpieza.

3. Bloquear las placas añadiendo, a cada pocillo, 300 µl de tampón de bloqueo. Incubar a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora.

4. Repetir la aspiración/lavado como se indica en la etapa 2. Ahora las placas están listas para la adición de la muestra.



**Procedimiento de ensayo**

1. Añadir 100 µl de muestra o patrones en diluyente reactivo, o un diluyente apropiado, por pocillo. Cubrir con una tira adhesiva e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 5 2. Repetir la aspiración/lavado como se indica en la etapa 2 de Preparación de Placas.
3. Añadir a cada pocillo 100 µl del anticuerpo de detección, diluido en diluyente reactivo. Cubrir con una tira adhesiva nueva e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 10 4. Repetir la aspiración/lavado como se indica en la etapa 2 de Preparación de Placas.
5. Añadir a cada pocillo 100 µl de la dilución de trabajo de estreptavidina-HRP. Cubrir la placa e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar colocar la placa bajo la luz directa.
- 15 6. Repetir la aspiración/lavado como se indica en la etapa 2.
7. Añadir a cada pocillo 100 µl de solución de sustrato. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar colocar la placa bajo la luz directa.
- 20 8. Añadir a cada pocillo 50 µl de solución de detención. Golpear suavemente la placa para asegurar una mezcla minuciosa.
- 25 9. Inmediatamente, determinar la densidad óptica de cada pocillo, usando un lector de microplaca ajustado a 450 nm. Si se dispone de corrección de longitud de onda, ajustar a 540 nm o a 570 nm. Si no se dispone de corrección de longitud de onda, restar las lecturas a 540 nm o a 570 nm de las lecturas a 450 nm. Esta resta corregirá imperfecciones ópticas en la placa. Las lecturas realizadas directamente a 450 nm sin corrección pueden ser más altas y menos precisas.

**SUGERENCIAS Y LIMITACIONES TÉCNICAS**

- 30 • El DuoSet no debe usarse por encima de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Es importante que los diluyentes seleccionados para la reconstitución y para la dilución del patrón reflejen el entorno de las muestras que vayan a medirse. El diluyente sugerido en este protocolo debe ser adecuado para la mayor parte de las muestras de sobrenadante de cultivo celular. Antes del uso validar los diluyentes para tipos de muestras específicas.
- 35 • El tipo de enzima y sustrato y las concentraciones de los anticuerpos de captura/detección usados pueden variar para crear un inmunoensayo con una sensibilidad e intervalo dinámico diferentes. Se requiere un conocimiento básico acerca del desarrollo de inmunoensayos para el uso correcto de estos reactivos en los inmunoensayos.
- 40 • Es esencial una técnica de lavado cuidadosa y coherente para la realización correcta de los ensayos. El tampón de lavado debe dispensarse enérgicamente y eliminarse completamente de los pocillos por aspiración o decantación. Eliminar cualquier resto de tampón de lavado invirtiendo la placa y secándola por adsorción con toallitas de papel de limpieza.
- En cada etapa debe usarse una reserva de reactivo recién preparado y puntas de pipetas limpias.
- Se recomienda ensayar por duplicado todos los patrones y muestras.
- 45 • Evitar la contaminación microbiana de reactivos y tampones. Esto podría interferir con la sensibilidad del ensayo. Los tampones que contengan una gran cantidad de proteínas deben prepararse en condiciones estériles y conservarse a una temperatura de 2 - 8°C o prepararse todos los días.

**PRECAUCIONES**

50 La solución de detención sugerida para su uso con este kit es una solución ácida. Cuando se usa este material debe llevarse ropa de protección para ojos, manos y rostro.

**CÁLCULO DE RESULTADOS**

55 Para cada patrón, control y muestra se establece el promedio de las lecturas por duplicado y se resta el promedio cero de la densidad óptica patrón.

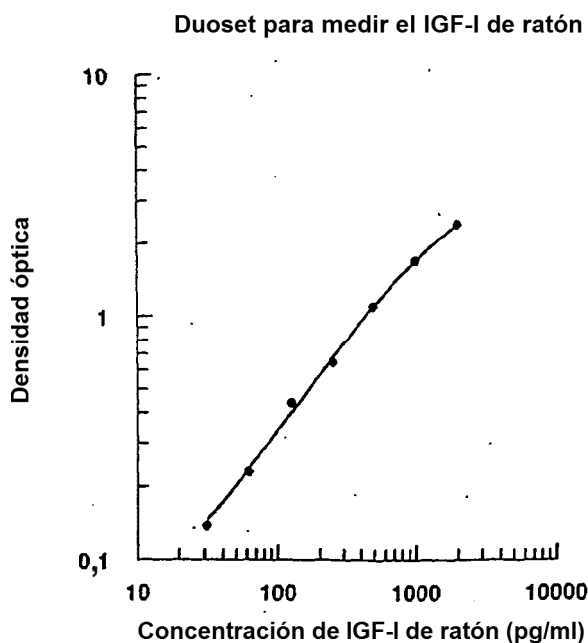
60 Reduciendo los datos, usando un programa informático por ordenador capaz de generar un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (4-PL), se crea una curva patrón. Como una alternativa, se construye una curva patrón trazando la absorbancia media para cada patrón en el eje y frente a la concentración en el eje x, y a través de los puntos sobre el gráfico, se dibuja una curva de mejor ajuste. Los datos pueden linealizarse trazando el logaritmo de las concentraciones de IGF-I frente al logaritmo de la D.O. y la línea de mejor ajuste puede determinarse por análisis de regresión. Este procedimiento producirá un ajuste de los datos adecuado pero menos preciso. Si las muestras se  
65 han diluido, la lectura de la concentración de la curva patrón debe multiplicarse por el factor de dilución.

**DATOS TÍPICOS**

Esta curva patrón sólo tiene fines demostrativos.

Para cada conjunto de muestras ensayadas debe generarse una curva patrón.

- 5 El siguiente gráfico representa datos típicos generados cuando se usa este DuoSet para medir el IGF-I de ratón. La curva patrón se calculó usando un ajuste de curva 4 PL generado por ordenador.



10 **ESPECIFICIDAD**

Se ensayó una muestra que contenía 50 ng/ml de IGF-II recombinante de ratón y no mostró reactividad cruzada ni interferencia.

- 15 Una muestra que contiene 25 ng/ml de IGF-I humana recombinante se lee como 63 pg/ml (reactividad cruzada al 0,2%).

**CALIBRADO**

20 El DuoSet se calibra frente al IGF-I de ratón recombinante expresado en *E. coli*, muy purificado, producido en R&D Systems.

<sup>1</sup> Para el ensayo de muestras de suero, cada laboratorio debe desarrollar y validar su propio diluyente en suero. El diluyente en suero no debe usarse para diluir el anticuerpo de detección o la estreptavidina-HRP.

<sup>2</sup> Los resultados individuales pueden variar debido a diferencias en la técnica, al uso de productos plásticos y fuentes de agua.

- 25 <sup>3</sup> En el kit se proporciona la fecha de caducidad.

<sup>4</sup> Antes de la reconstitución inicial, permitir que todos los componentes se asienten durante un mínimo de 15 minutos con agitación suave. Las soluciones de trabajo deben prepararse y usarse inmediatamente.

<sup>5</sup> Se sugiere el uso de placas Costar EIA (catálogo N° 2592).

R&D Systems, Inc  
614 McKinley Place NE  
Minneapolis, MN 55413  
Estados Unidos de América  
1-800-343-7475  
Tel: (612) 379-2956  
Fax: (612) 656-4400

R&D Systems Europa, Ltd.  
19 Barton Lane  
Abingdon Science Park  
Abingdon, OX14 3NB  
Reino Unido  
Tel: +44 (0) 1235 529449  
Fax: +44 (0) 1235 533420

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Metabolic Pharmaceuticals Limited

5 <120> Métodos para prevenir o tratar trastornos óseos

<130> FP21647

<150> 2004902388

10 <151> 04-05-2004

<160> 22

<170> Patente versión 3.3

15

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> hGH 177-191 con penicilamina en 182 y 189; péptido cíclico

<220>

25

<221> Xaa

<222> (6) .. (6)

<223> Penicilamina

<220>

30

<221> DISULFURO

<222> (6) .. (13)

<220>

<221> Xaa

35

<222> (13) .. (13)

<223> Penicilamina

<400> 1

Leu Arg Ile Val Gln Xaa Arg Ser Val Glu Gly Ser Xaa Gly Phe  
1 5 10 15

40

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45

<223> hGH 177 - 191 con CH3CO reemplazando NH2; péptido cíclico

<220>

<221> MOD\_RES

50

<222> (1).. (1)

<223> CH3CO reemplaza a NH2

<220>

<221> DISULFURO

55

<222> (6) .. (13)

<400> 2

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
1 5 10 15

60

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 391 853 T3

<220>  
 < 223> hGH 177-191 con H reemplazando a NH2; péptido cíclico

5 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (1).. (1)  
 < 223> H reemplaza a NH2

10 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

<400> 3

15 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 1 5 10 15  
 <210> 4  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

20 <220>  
 < 223> hGH 177-191 con CONH2 reemplazando a COOH; péptido cíclico

25 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

30 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (15) .. (15)  
 < 223> CONH2 reemplaza a COOH

<400> 4

35 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 1 5 10 15  
 <210> 5  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

40 <220>  
 < 223> hGH 177-191 con lisina en 83; péptido cíclico

45 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

<400> 5

50 Leu Arg Ile Val Gln Cys Lys Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 1 5 10 15  
 <210> 6  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

55 <220>  
 < 223> hGH 177-191 con lisina en 183 y enlace amida entre 183 y 86; péptido cíclico

60 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

ES 2 391 853 T3

<220>  
 < 221> MISC FEATURE  
 < 222> (7) .. (10)  
 < 223> Enlace amida  
 5  
 <400> 6  
  
 Leu Arg Ile Val Gln Cys Lys Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 1 5 10 15  
 <210> 7  
 10 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial  
  
 <220>  
 15 < 223> Tirosina - hGH 177-191; péptido cíclico  
  
 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (7) ... (14)  
 20  
 <400> 7  
  
 Tyr Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 1 5 10 15  
 <210> 8  
 25 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial  
  
 <220>  
 30 < 223> Lisina - hGH 177-191; péptido cíclico  
  
 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (7) .. (14)  
 35  
 <400> 8  
  
 Lys Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 1 5 10 15  
 <210> 9  
 40 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial  
  
 <220>  
 45 < 223> Lisina - Lisina - hGH 177-191; péptido cíclico  
  
 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (8).. (15)  
 50  
 <400> 9  
  
 Lys Lys Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly  
 1 5 10 15  
 <210> 10  
 55 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial  
  
 <220>

ES 2 391 853 T3

< 223> hGH 177-191 con alanina en 177; péptido cíclico

<220>

< 221> DISULFURO

5 < 222> (6) .. (13)

<400> 10

Ala Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
1 5 . 10 15

10 <210> 11

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial

15 <220>

< 223> hGH 177-191 con lisina en 178; péptido cíclico

<220>

< 221> DISULFURO

20 < 222> (6) .. (13)

<400> 11

Leu Lys Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
1 5 10 15

25 <210> 12

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial

30 <220>

< 223> hGH 177-191 con alanina en 179; péptido cíclico

<220>

< 221> DISULFURO

35 < 222> (6) .. (13)

<400> 12

Leu Arg Ala Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
1 5 10 15

40 <210> 13

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial

45 <220>

< 223> hGH 177-191 con lisina en 179; péptido cíclico

<220>

< 221> DISULFURO

50 < 222> (6) .. (13)

<400> 13

Leu Arg Lys Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
1 5 10 15

55 <210> 14

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial

ES 2 391 853 T3

<220>  
 < 223> hGH 177-191 con alanina en 180; ácido cíclico

<220>  
 5 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

<400> 14

Leu Arg Ile Ala Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 10 1 5 10 15  
 <210> 15  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

15 <220>  
 < 223> hGH 177-191 con alanina en 181; péptido cíclico

<220>  
 20 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6)..(13)

<400> 15

Leu Arg Ile Val Ala Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 25 1 5 10 15  
 <210> 16  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

30 <220>  
 < 223> hGH 177-191 con alanina en 184; péptido cíclico

<220>  
 35 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6)..(13)

<400> 16

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ala Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 40 1 5 10 15  
 <210> 17  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

45 <220>  
 < 223> hGH 177-191 con alanina en 185; péptido cíclico

<220>  
 50 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

<400> 17

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Ala Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 55 1 5 10 15  
 <210> 18  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

<220>  
 60 < 223> hGH 177-191 con alanina en 187; péptido cíclico

ES 2 391 853 T3

<220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

5 <400> 18

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Ala Ser Cys Gly Phe  
 1 5 10 15

<210> 19  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

10 <220>  
 < 223> hGH 177-191 con alanina en 188; péptido cíclico

15 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

20 <400> 19

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ala Cys Gly Phe  
 1 5 10 15

<210> 20  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

25 <220>  
 < 223> hGH 177-191 con alanina en 190; péptido cíclico

30 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

35 <400> 20

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Ala Phe  
 1 5 10 15

<210> 21  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Artificial

40 <220>  
 < 223> hGH 177 - 191 con D-alanina en 187 y 190; péptido cíclico

45 <220>  
 < 221> DISULFURO  
 < 222> (6) .. (13)

50 <220>  
 < 221> Xaa  
 < 222> (11) .. (11)  
 < 223> D-Alanina

55 <220>  
 < 221> Xaa  
 < 222> (14) .. (14)  
 < 223> D-Alanina

60 <400> 21



ES 2 391 853 T3

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Xaa Ser Cys Xaa Phe  
1 5 10 15

<210> 22

< 211> 15

< 212> PRT

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> hGH 177 - 191 con alanina en 191; péptido cíclico

10 <220>

< 221> DISULFURO

< 222> (6) .. (13)

<400> 22

15

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Ala  
1 5 10 15

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido que tiene capacidad de modular el metabolismo de lípidos pero que no tiene efecto apreciable sobre IGF-1, para su uso en un método de prevención o tratamiento de un trastorno óseo o para aumentar la formación ósea y/o la deposición de osteoblastos en un mamífero, en el que el péptido es un fragmento C-terminal de la hormona del crecimiento desde los restos de aminoácidos 2 a 50 y comprende los aminoácidos 182-189 de la hormona del crecimiento humano (hGH 182-189) o una variante de secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias:

Ref. Nº	ESTRUCTURA
9502	<b>Leu Arg Ile Val Gln Pen Arg Ser Val Glu Gly Ser Pen Gly Phe</b>
9407	Leu Arg Ile Val Gln Cys Lys Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
408	<b>Leu Arg Ile Val Gln Cys <u>Lys Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe</u></b> (enlace amida)
9612	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ala Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9613	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Ala Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9615	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Ala Ser Cys Gly Phe
9616	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ala Cys Gly Phe
9501	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu D-Ala Ser Cys D-Ala Phe

- 10 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento comprende una de las secuencias:

Ref. Nº	ESTRUCTURA
9405	CH <sub>3</sub> CO- Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9410	H - Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9404	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe - CONH <sub>2</sub>
9604	Tyr Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9605	Lys Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9618	Lys Lys Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9607	Ala Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9606	Leu Lys Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9608	Leu Arg Ala Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9403	Leu Arg Lys Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9609	Leu Arg Ile Ala Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9610	Leu Arg Ile Val Ala Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9602	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Ala Phe
9601	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Ala

- 15 3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido comprende los restos de aminoácidos 177-191 de la secuencia de la hormona del crecimiento humano.

- 20 4. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido comprende al menos el bucle de una hormona del crecimiento de mamífero unido por disulfuro.

- 25 5. El péptido de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido es los aminoácidos 177-191 de la hormona del crecimiento humano (hGH 177-191).

6. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido es Tyr-hGH 177-191, y tiene la secuencia Tyr Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe.

- 30 7. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido se conjuga con un compañero de fusión.

- 35 8. El péptido de acuerdo con cualquiera reivindicación anterior para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con otro agente activo contra trastornos óseos.

9. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8 para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el otro agente activo es calcio, minerales óseos, ácido gamma linolénico, vitamina D, vitamina K, estrógenos, compuestos que imitan a estrógenos, bifosfatos o isoflavonas.

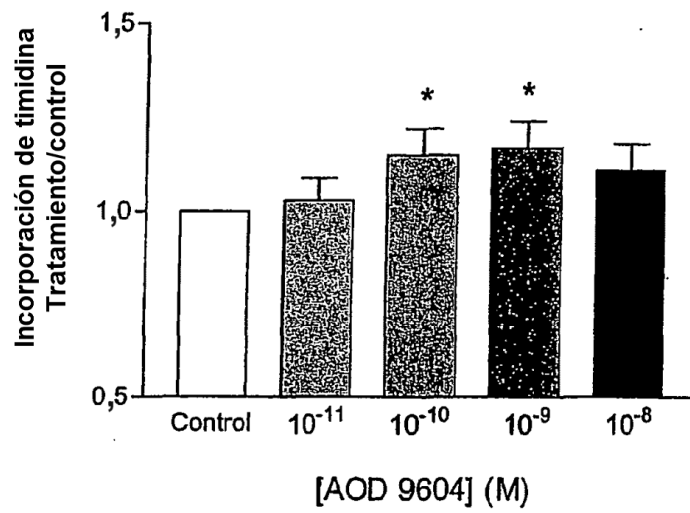
- 40 10. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8 o reivindicación 9 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en combinación con una fuente de energía.

- 5 11. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1 por administración por vía oral, sublingual, bucal, intranasal, por inhalación, transdérmica, tópica o parenteral, por técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal, intracraneal o en formulaciones de dosificación unitaria que contienen transportadores, adyuvantes y vehículos no tóxicos convencionales farmacéuticamente aceptables.
12. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, por administración por vía oral en forma de un alimento modificado genéticamente.
- 10 13. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno óseo se **caracteriza por** un metabolismo óseo alterado.
- 15 14. El péptido de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno óseo se selecciona de osteoporosis, incluyendo osteoporosis postmenopáusica, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis osteolíticas en pacientes con cáncer, osteodistrofia en enfermedades hepáticas y el metabolismo óseo alterado causado por insuficiencia renal, hemodiálisis, fractura ósea, cirugía ósea, envejecimiento, embarazo y malnutrición.
- 20 15. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mamífero también carece de hormona de crecimiento y/o es un ser humano.
- 25 16. El uso de un péptido que tiene capacidad de modular el metabolismo de lípidos pero que no tiene efecto apreciable sobre IGF-1, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno óseo para aumentar la formación ósea y/o la deposición de osteoblastos en un mamífero, en el que el péptido es un fragmento C-terminal de la hormona de crecimiento desde los restos de aminoácidos 2 a 50 y comprende los aminoácidos 182-189 de la hormona del crecimiento humano (hGH 182-189) o una variante de secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia:

Ref. Nº	ESTRUCTURA
9502	<b>Leu Arg Ile Val Gln Pen Arg Ser Val Glu Gly Ser Pen Gly Phe</b>
9407	Leu Arg Ile Val Gln Cys Lys Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9408	<b>Leu Arg Ile Val Gln Cys <u>Lys Ser Val Glu</u> Gly Ser Cys Gly Phe</b> (enlace amida)
9612	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ala Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9613	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Ala Glu Gly Ser Cys Gly Phe
9615	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Ala Ser Cys Gly Phe
9616	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ala Cys Gly Phe
9501	Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu D-Ala Ser Cys D-Ala Phe

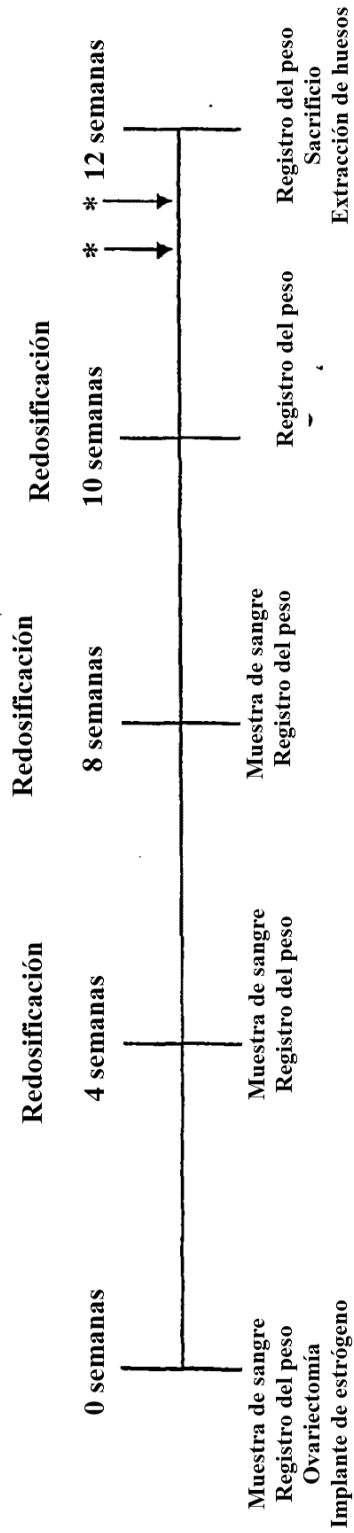
- 30 17. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que:
- (i) el péptido es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7;
- (ii) el medicamento comprende adicionalmente otro agente como se define en la reivindicación 8 ó 9 y opcionalmente también comprende una fuente de energía;
- 35 (iii) el medicamento es para la administración como se define en la reivindicación 11 ó 12;
- (iv) el trastorno óseo es como se define en la reivindicación 13 ó 14; o
- (v) el mamífero es como se define en la reivindicación 15 ó 16.
- 40 18. El péptido de la reivindicación 6 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de acuerdo con la reivindicación 16 (cuando el péptido es Tyr-hGH 177-191) para su uso en un método de aumentar la proliferación de osteoblastos.

Efectos de AOD9604 en un ensayo de proliferación de osteoblastos primarios en rata



\* P < 0,05

FIGURA 1



\* Inyección de tetraciclina, I.P. 13 y 3 días antes del sacrificio

FIGURA 2 Resumen y cronograma del experimento

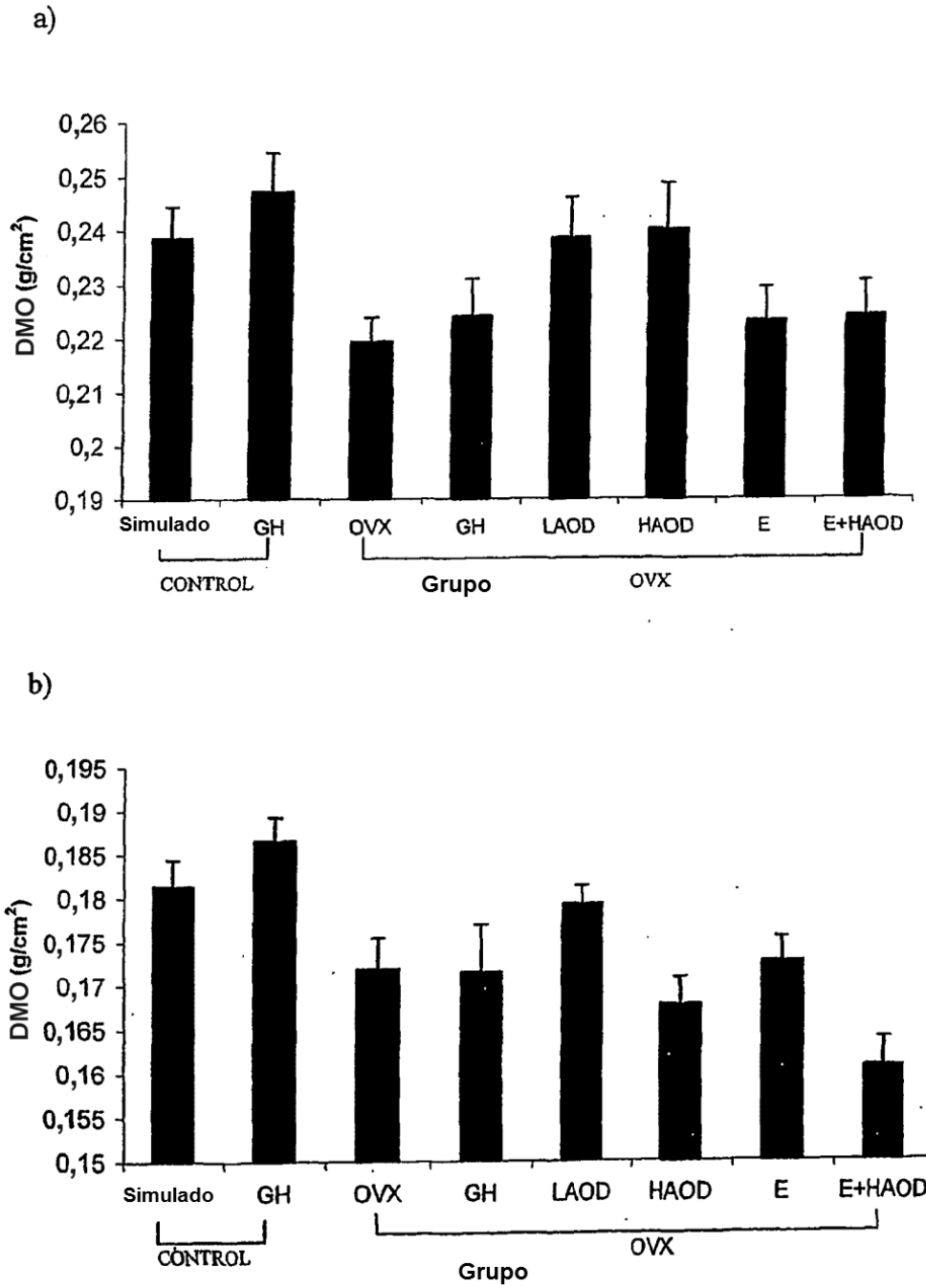
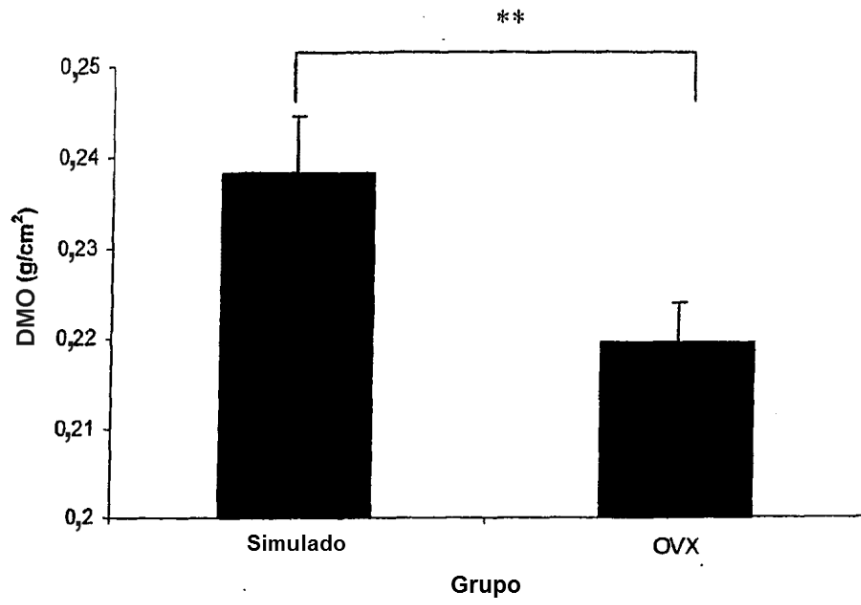


FIGURA 3

a)



b)

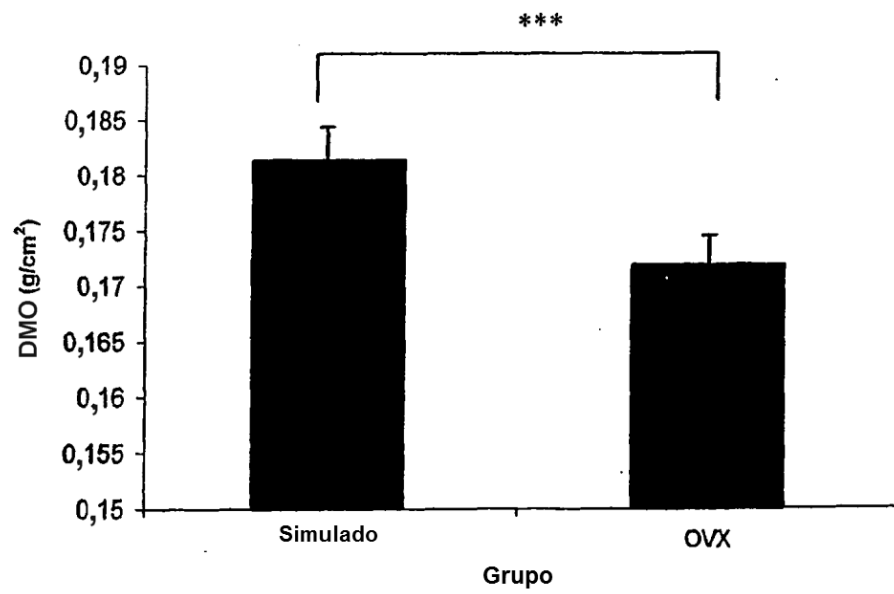
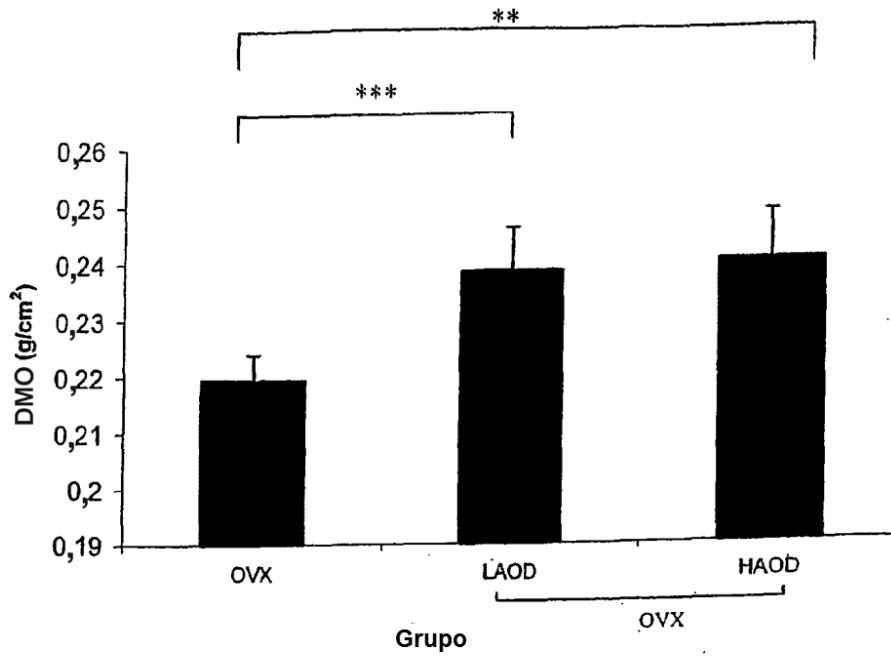


FIGURA 4



b)

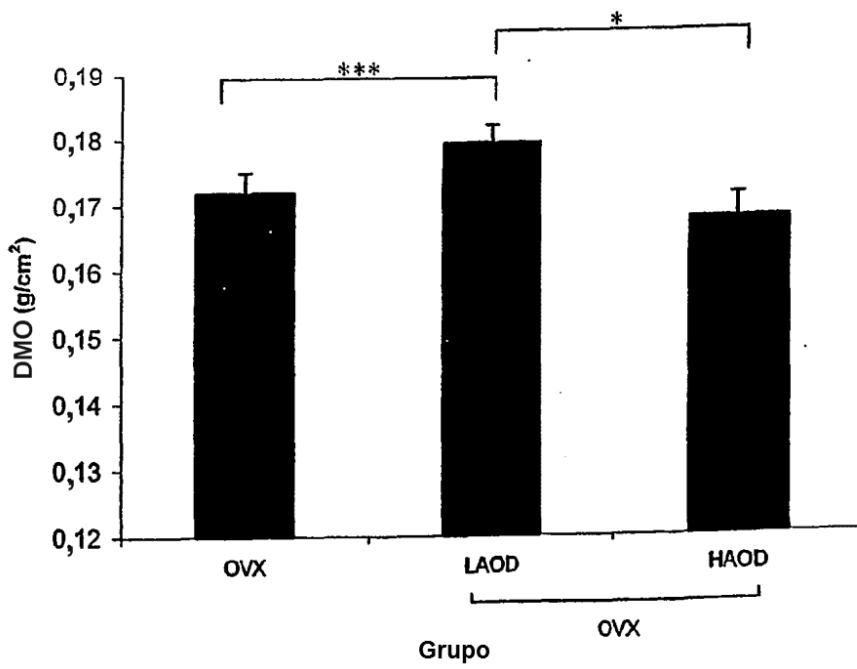


FIGURA 5



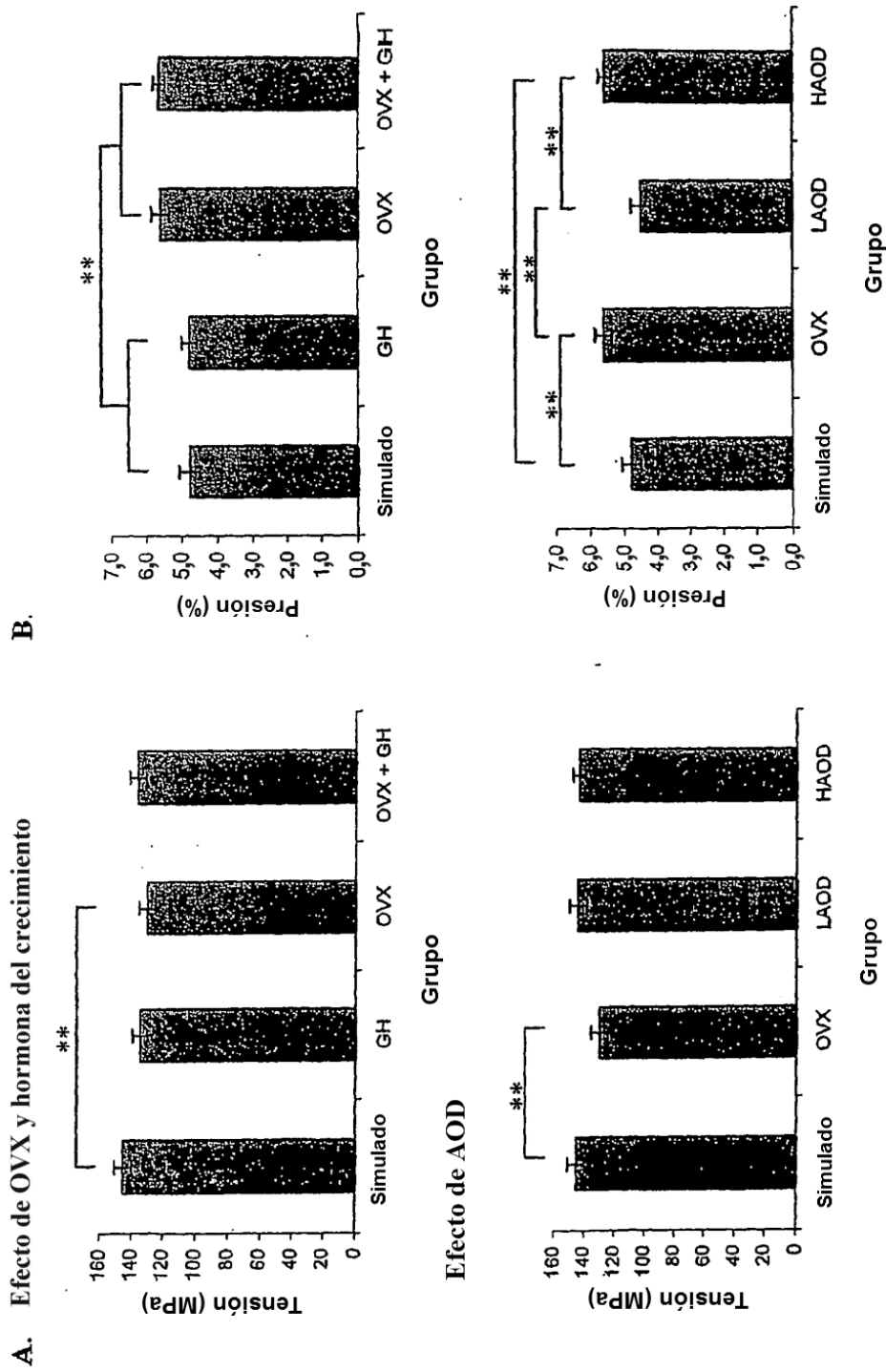


FIGURA 6

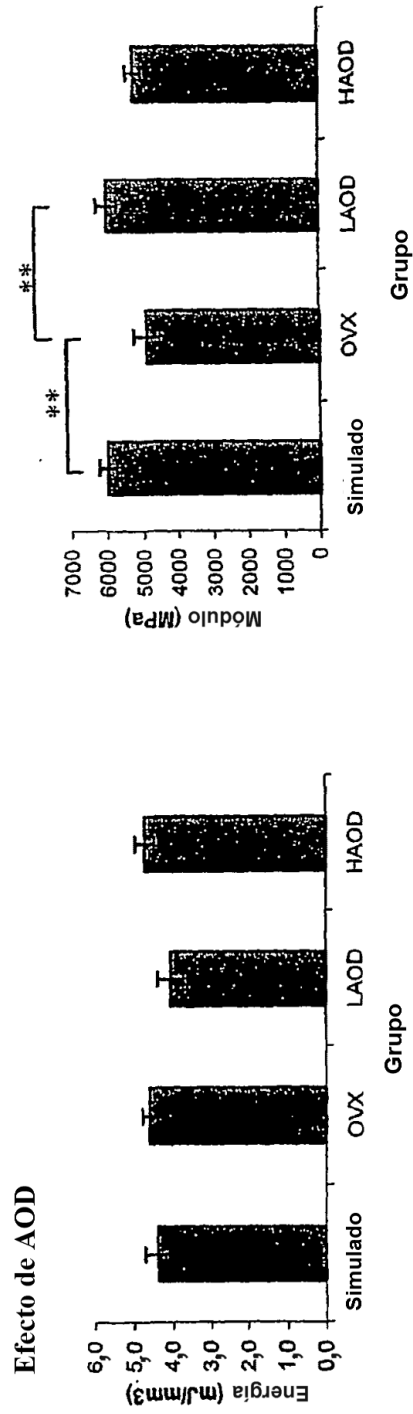


FIGURA 7

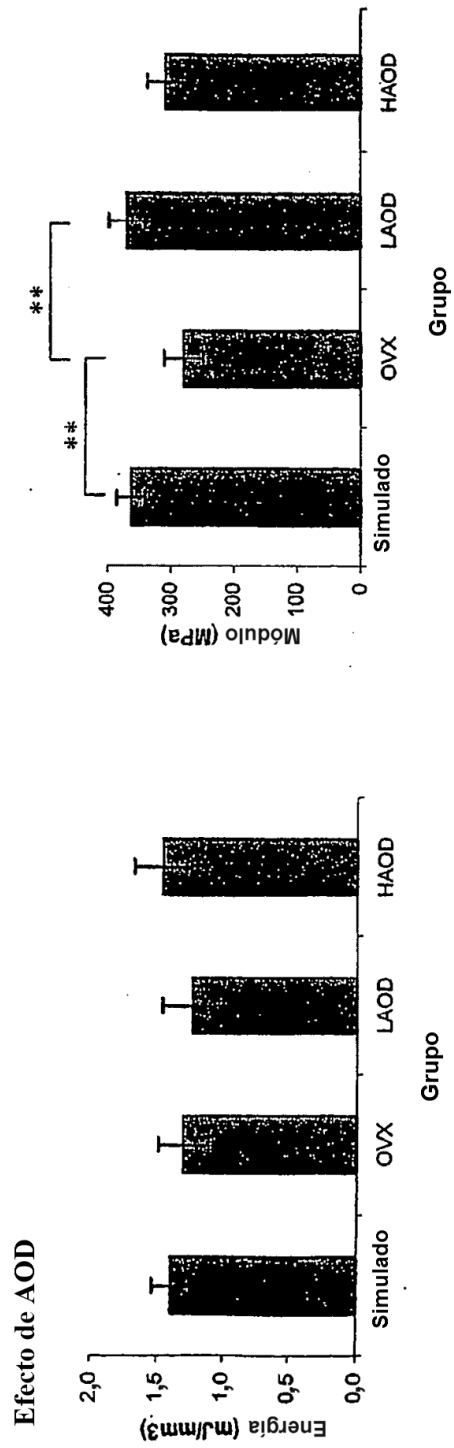


FIGURA 8

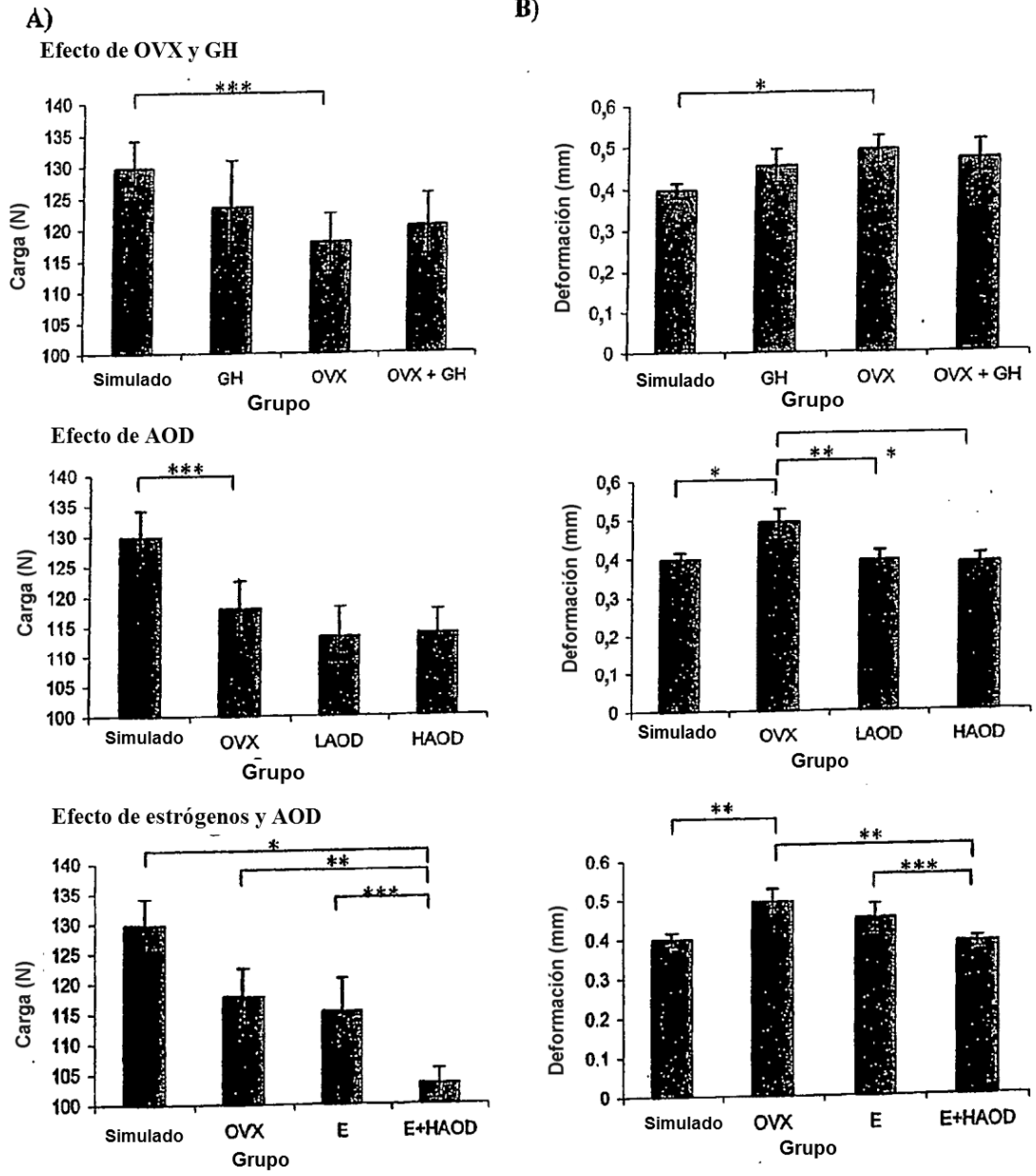


FIGURA 9

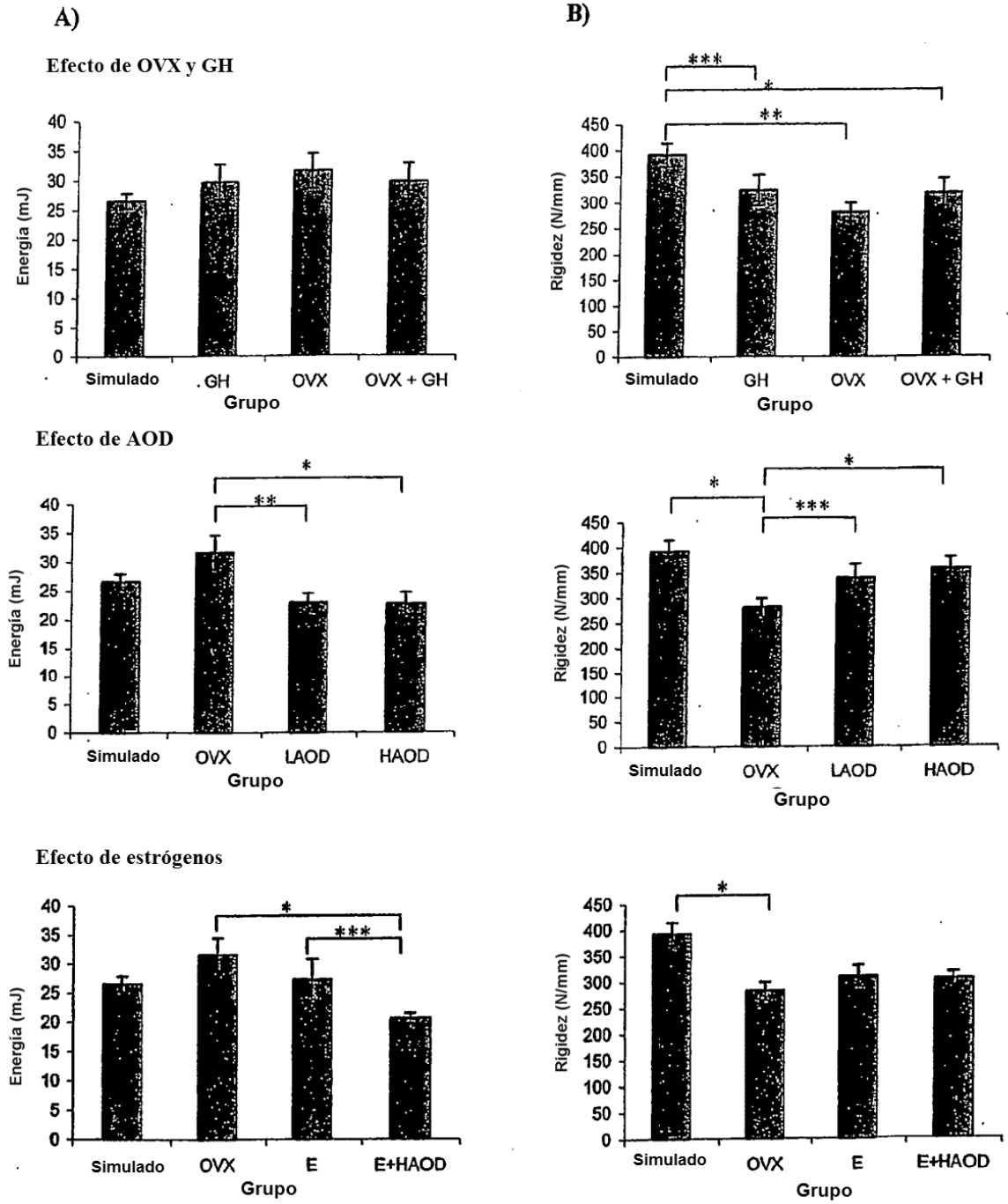


FIGURA 10