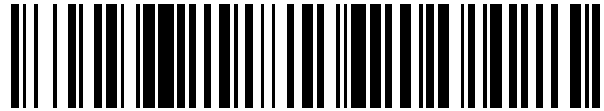


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 582**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2007 E 07712743 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 1984744**

54 Título: **Métodos y kits para diagnosticar la deficiencia de hormona del crecimiento**

30 Prioridad:

18.02.2006 GB 0603295

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.05.2013

73 Titular/es:

**AETERNA ZENTARIS GMBH (100.0%)
Weismüllerstrasse 50
60314 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

LARSEN, FINN

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 404 582 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 y kits para diagnosticar la deficiencia de hormona del crecimiento

[0001] La presente invención se refiere a métodos y kits para utilizar en relación al diagnóstico de deficiencia de hormona del crecimiento en un sujeto humano o animal.

5 **[0002]** Se estima que 1 de cada 4000 niños escolares está afectado por deficiencia de hormonas de crecimiento (GHD), siendo la causa más común los hipopituitarismos idiopáticos.

10 **[0003]** Se reconoce en niños con GHD que la pequeña estatura puede ser la única característica presente. La Sociedad de Investigación de Hormona del Crecimiento sugiere que si ciertos criterios están presentes, entonces debería iniciarse una investigación inmediata, estos incluyen: 1) muy baja estatura, definida como una altura de más de 3 desviaciones estándar (SD) por debajo de la media; 2) altura de más de 1.5 SD por debajo de la altura media-parental; 3) altura de más de 2 SD por debajo de la media y una velocidad de altura durante un año más de 1 SD por debajo de la media para edad cronológica, o una disminución en SD de altura de más de 0.5 durante 1 año en niños de más de 2 años de edad; 4) en ausencia de pequeña estatura, una velocidad de altura de más de 2 SD por debajo de la media durante 1 año o más de 1.5 SD mantenida durante 2 años; 5) indicios indicativos de una lesión intracraneal; 6) indicios de trastornos múltiples de hormonas pituitarias (MPHD); y 7) síntomas neonatales e indicios de GHD (Sociedad de Investigación de la Hormona del Crecimiento, J. Clin. Endocrinol. Metab. (2000), 85(11), p 3990-3993).

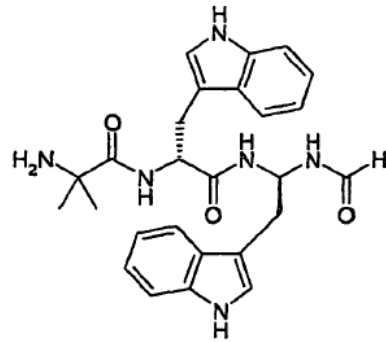
20 **[0004]** Sin embargo, la GHD no se considera ya que sea simplemente una afección pediátrica asociada con pobre velocidad de crecimiento. Los adultos todavía necesitan niveles adecuados de GH para mantener una composición y metabolismo corporal sanos. Adultos con GHD tienen grasa abdominal aumentada, función cardíaca deteriorada, niveles elevados de colesterol, y reducida capacidad de ejercicio, pobre masa corporal y contenido mineral óseo (Sociedad de Investigación de Hormona del Crecimiento, J. Clin. Endocrinol. Metab. (1998), 83(2), p 379-381). Un ensayo que provoca que la pituitaria libere GH se utiliza para diagnosticar GHD tanto en adultos como en niños. Existe una variedad de agentes que provocan la liberación de hormona de crecimiento, incluyendo levodopa, clonidina, arginina, insulina, hormona de liberación de hormona de crecimiento (GHRH) y diversos análogos de GHRH han sido utilizados, bien individualmente o en combinación, para valorar la capacidad secretora de la GH en niños de pequeña estatura y adultos con una variedad de afecciones asociadas con GHD, (ver Greenspan, F. and Baxter, J.D., Chapter 3, Basic & Clinical Endocrinology, 4th Ed. (1994) Prentice Hall, USA; WO 94/11396; y WO 94/11397).

30 **[0005]** Aparte de la insulina y la combinación de GHRH más arginina, los agentes anteriores bien sufren de una baja sensibilidad ("sensibilidad" es la proporción de sujetos que son diagnosticados correctamente con GHD) o una baja especificidad ("especificidad" es la proporción de sujetos que son valorados correctamente como que no tienen GHD), esto se debe principalmente a la considerable variabilidad en la respuesta de la GH entre sujetos y también un alto índice de resultados positivos falsos. Un resumen de las sensibilidades y especificidades se incluye en la **Table 1** abajo; idealmente, un agente provocador debería tener tanto sensibilidad como especificidad $\geq 95\%$ (ver Biller, B. M. K. et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2002), 87(5), p2067-2079).

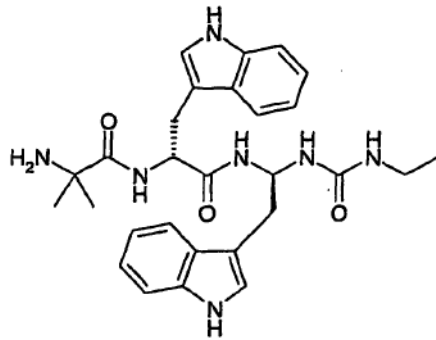
| Ensayo | Sensibilidad | Especificidad |
|------------------|--------------|---------------|
| ITT (i.v.) | 96% | 92% |
| ARG-GHRH (i.v.) | 95% | 91% |
| ARG-L-DOPA (p.o) | 97% | 79% |
| ARG (i.v.) | 87% | 91% |
| L-Dopa (p.o.) | 100% | 62% |

40 **[0006]** El ensayo intravenoso de intolerancia a la insulina (ITT) es considerado el mejor método de detección para el diagnóstico de GHD (Mahajan et al. J. Clin. Endocrin. & Metab. (2000), p1473-1476). Sin embargo, este ensayo tiene el riesgo de causar al sujeto serios daños (por ejemplo provocando un coma diabético debido a hipoglucemia) y en consecuencia el sujeto deba ser continuamente observado durante un periodo prolongado de tiempo en una unidad de investigación apropiadamente provista de personal. Esto hace muy costosa la ITT como procedimiento de control detección fuera de centros muy especializados.

- [0007]** El ensayo de la GHRH más L-arginina se considera ahora que es casi tan predictivo como el ensayo ITT. Sin embargo, puede provocar una variedad de efectos secundarios que incluye vasodilatación o soplado, parestesias, náuseas y sensación anormal del gusto (Biller, B. M. K. et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2002), 87(5), p2067-2079).
- 5 **[0008]** En todos los ensayos anteriores, deben tomarse múltiples muestras durante un periodo de horas a fin de establecer un diagnóstico. Adicionalmente, los otros ensayos mencionados antes producen efectos secundarios que incluyen náuseas, vómito, parestesias, mareo, astenia y dolores de cabeza (*ibid*).
- 10 **[0009]** En los últimos pocos años, diversos investigadores han demostrado que la secreción de GH puede estimularse por oligopéptidos sintéticos denominados péptidos de liberación de GH (GHRP) tales como hexarelina y diversos análogos de hexarelina (Ghigo et al., Revista Europea de Endocrinología, 136, 445-460, 1997). Estos compuestos actúan mediante un mecanismo que es distinto del de la GHRH (C.Y. Bowers, en "Secretagogos de Hormona del Crecimiento Xenobióticos ", Eds. B.Bercu y R.F. Walker, Pg. 9-28, Springer-Verlag, New York 1996) y por interacción con receptores específicos localizados en el hipotálamo y glándula pituitaria ((a) G. Muccioli et al., Revista de Endocrinología, 157, 99-106, 1998; (b) G. Muccioli, "Distribución de Tejido de Receptores de GHRP en Humanos", Resúmenes IV Congreso Europeo de Endocrinología, Sevilla, España, 1998). Recientemente se demostró que los receptores de GHRP están presentes no solamente en el sistema pituitario-hipotálamo sino también en diversos tejidos humanos asociados con la liberación de GH (G. Muccioli et al., ver arriba (a)).
- 20 **[0010]** GHRPs y sus antagonistas se describen, por ejemplo, en las siguientes publicaciones: C.Y. Bowers, *supra*, R. Deghenghi, "Péptidos de Liberación de Hormona del Crecimiento ", *ibid*, 1996, pg. 85-102; R. Deghenghi et al., "Pequeños Péptidos como Potentes Liberadores de Hormona del Crecimiento ", J. Ped. End. Metab., 8, pg. 311-313, 1996; R. Deghenghi, "El Desarrollo de Péptidos Impermeables como Secretagogos de la Hormona del crecimiento Secretagogues", Acta Paediatr. Suppl., 423, pg. 85-87, 1997; K. Veeraraganavan et al., "Péptidos Liberadores de la Hormona del Crecimiento (GHRP) que se Unen a Pituitaria Porcina Anterior y Membranas Hipotalámicas ", Life Sci., 50, Pg. 1149-1155, 1992; y T.C. Somers et al., "Secretagogos de la Hormona del Crecimiento de Peptidomiméticos de Bajo Peso Molecular ", WO 96/15148 (May 23, 1996), WO 95/14666, WO 01/96300, WO 91/18016, WO 96/10040, WO 97/22620, WO 99/62539, US 5,646,301, US 5,955,421, US 5,872,100, US 5,668,254, UD 5,635,379, US 6,025,471.
- 25 **[0011]** El péptido de liberación de la hormona del crecimiento 6 (GHRP-6) se ha usado como un agente provocador para el diagnóstico de GHD conjuntamente con la GHRH (US 5,811,074). Este método se apoya en la administración intravenosa de GHRP-6 y GHRH e implica un periodo prolongado de prueba con múltiples muestras necesarias para llegar a un diagnóstico.
- 30 **[0012]** El péptido de liberación de la hormona del crecimiento 2 (GHRP-2) ha mostrado que tiene alguna utilidad en el diagnóstico de GHD cuando se administra a un sujeto mediante inyección intravenosa o administración intranasal (Pihoker et al. J. Clin. Endocrin. & Metab. (1995), p2987-2992). También se observó que cuando GHRP-2 se combinaba con la GHRH, mediante administración intravenosa, se producía un efecto sinérgico, produciéndose resultados más exactos. Sin embargo, la metodología descrita requiere un periodo de horas y múltiples muestras del sujeto antes de que pueda hacerse un diagnóstico.
- 35 **[0013]** En un refinamiento del ensayo anterior (Mahajan et al. J. Clin. Endocrin. & Metab. (2000), p1473-1476), la GHRP-2 y la GHRH se administran juntas intravenosamente y se toma una sola muestra de sangre para proporcionar un diagnóstico. Ninguna sugerencia se ha hecho en el documento de que la administración oral sería efectiva para el tratamiento de combinación.
- 40 **[0014]** La compañía farmacéutica Kaken ha hecho disponible recientemente un kit de diagnóstico para GHD en el mercado Japonés, utilizando GHRP-2, que está aprobado para administración intravenosa.
- 45 **[0015]** WO 96/29002 revela un método de diagnóstico de deficiencia pituitaria de la hormona del crecimiento.
- [0016]** Bowers, C. Y. et al., J. Clin. Endocr. Metab., 74(2), 292-298 (1992) trata la actividad liberadora de la hormona del crecimiento de un hexapéptido sintético.
- [0017]** Mealy, N. E. et al., Fármacos del Futuro, 29(11), 1140 (2004) se refiere a estudios que implican EP 1572.
- 50 **[0018]** Los inventores han hallado ahora que la administración oral de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS) EP 1572 puede ser eficaz y fiablemente utilizada para diagnosticar el GHD.
- [0019]** EP 1572 (Fórmula I) o EP 1573 (Fórmula II) son GHSs (ver la WO 01/96300, Ejemplo 1 y Ejemplo 58 queson EP 1572 y EP 1573, respectivamente) que pueden ser dados oralmente.



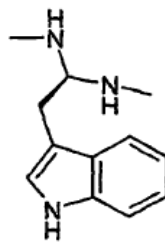
Formula I



Formula II

5

[0020] EP 1572 y EP 1573 pueden también ser definidos como H-Aib-D-Trp-D-gTrp-CHO y H-Aib-D-Trp-D-gTrp-C(O)NHCH₂CH₃. Donde H es hidrógeno, Aib es aminoisobutil, D es el isómero dextro, Trp es triptófano y gTrp es un grupo de la Fórmula III:



Formula III

10

[0021] Un primer aspecto de la invención proporciona un método de valorar la deficiencia de hormona del crecimiento (GHD) en un sujeto humano o animal, el método comprendiendo administración EP 1572 oralmente al sujeto, obtener al menos una muestra procedente del sujeto tras la administración, determinar el nivel de hormona del crecimiento (GH) en la muestra o muestras y determinar si el nivel de GH en la muestra o muestras es indicativo de GHD en el sujeto.

15

[0022] Normalmente, el nivel de GH en la al menos una muestra post-administración es comparado con el nivel que puede ser encontrado en una muestra equivalente post-administración procedente de un sujeto que se sabe que no tiene GHD y/o el nivel que puede encontrarse en una muestra equivalente post-administración procedente de un sujeto que se sabe que tiene GHD. Convenientemente, la concentración máxima de GH liberada en el sujeto a ser tratado tras la administración de EP 1572 puede ser comparada con la concentración

20

máxima que puede encontrarse en un sujeto que se sabe que tiene GHD y/o la concentración máxima que puede hallarse en un sujeto que se sabe que tiene GHD, en ambos casos tras la administración de EP 1572.

5 **[0023]** Preferiblemente, la cantidad de EP1572 administrada a un sujeto es entre 18 y 75 mg. Normalmente la cantidad administrada es 0,5 mg/kg, pero puede ser de 0,1 mg/kg a 1,0 mg/kg o una cantidad especificada por el médico. Puede ser necesario utilizar una dosis mayor en sujetos que son obesos. Se apreciará que, normalmente, la cantidad de EP 1572 dada al sujeto sea una cantidad que provoque la liberación máxima de GH posible en este sujeto. Normalmente, la cantidad dada al sujeto es de entre una y tres veces la cantidad mínima que provoca la liberación máxima de GH en el sujeto.

10 **[0024]** En cualquier caso, el médico, o la persona experta, será capaz de determinar la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual, que puede variar con la especie, edad, peso, sexo, función renal, función hepática y respuesta del particular sujeto a ser tratado con EP 1572. Las dosificaciones antes mencionadas son a modo de ejemplo del caso promedio; puede haber por supuesto casos de individuos donde interesen intervalos de dosificaciones superiores o inferiores, y éstas están dentro del ámbito de la invención.

15 **[0025]** Preferiblemente, se toma al menos una muestra pre-administración antes de la administración de EP 1572 y se toman una o más muestras post-administración en intervalos adecuados de tiempo tras la administración. El intervalo de tiempo entre cada muestra puede ser de entre 15 y 30 minutos y pueden tomarse muestras hasta 3 horas post administración. Más preferiblemente, se toman muestras en -30 y/o -15, 0, 15, 30, 20 60, 90 y 120 minutos respecto al momento de administración oral de EP 1572. Normalmente, se toman una o dos muestras antes de la administración oral de EP 1572, y normalmente se toman dos o tres, o cuatro o cinco muestras en momentos diversos tras la administración oral de EP 1572 .

25 **[0026]** Se apreciará que la invención incluya un método de diagnóstico si un sujeto humano o animal sufriese de GHD, el método comprendiendo administrar EP 1572 oralmente al sujeto y obtener una muestra procedente del sujeto humano o animal, determinar el nivel de GH en la muestra y valorar si el nivel es indicativo de GHD en el sujeto. Se apreciará que esta valoración pueda ayudar al diagnóstico, y pueda utilizarse en asociación con otros ensayos, u observaciones por el médico, para lograr un diagnóstico.

[0027] La invención incluye la administración oral de EP 1572 a un sujeto, obtener una muestra post-administración del sujeto, determinar el nivel de hormona del crecimiento (GH) en la muestra y valorar si el nivel de GH en la muestra es indicativo de GHD en el sujeto.

30 **[0028]** Un segundo aspecto de la invención proporciona un método de valoración de GHD en un sujeto humano o animal, el método comprendiendo proporcionar al menos una muestra post-administración de un sujeto a quien se ha administrado EP 1572 oralmente, determinar el nivel de hormona del crecimiento (GH) en la muestra o muestras y valorar si el nivel de GH en la muestra o muestras es indicativo de deficiencia de hormona del crecimiento en el sujeto.

35 **[0029]** El sujeto humano o animal en cualquier aspecto puede ser un niño o un adulto. El sujeto animal puede ser cualquier sujeto mamífero pero normalmente se selecciona del grupo compuesto de caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, gatos y perros.

40 **[0030]** Preferiblemente, se proporciona una muestra del sujeto que se tomó antes de la administración de EP 1572 (es decir muestra pre-administración) y se proporcionan una o más muestras que pueden tomarse del sujeto tras un intervalo adecuado de tiempo (es decir muestra post-administración). El tiempo de intervalo entre cada muestra puede ser de entre 15 y 30 minutos. Más preferiblemente, las muestras provistas se tomaron del sujeto en -30 y/o -15, 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos respecto al momento de la administración oral de EP 1572. Normalmente, se tomaron una o dos muestras provistas antes de la administración de EP 1572, y normalmente se tomaron dos o tres o cuatro o cinco muestras provistas en momentos diversos tras la administración de EP 1572.

45 **[0031]** Se apreciará que la invención incluye un método para diagnosticar si un sujeto está sufriendo GHD, el método comprendiendo proporcionar al menos una muestra post-administración de un sujeto a quien se ha administrado EP 1572 oralmente, determinar el nivel de hormona del crecimiento (GH) en la muestra o muestras y valorar si el nivel de GH en la muestra o muestras es indicativo de deficiencia de hormona del crecimiento en el sujeto.

50 **[0032]** La invención incluye la administración oral de EP 1572 a un sujeto, proporcionar una muestra post-administración del sujeto, determinar el nivel de hormona del crecimiento (GH) en la muestra y valorar si el nivel de GH en la muestra es indicativo de GHD en el sujeto.

55 **[0033]** Normalmente, el nivel de GH en la al menos una muestra post-administración se compara con el nivel que puede encontrarse en una muestra equivalente post-administración de un sujeto que se sabe que no tiene GHD y/o el nivel que puede encontrarse en una muestra post-administración equivalente de un sujeto que se sabe que

tiene GHD. Convenientemente, la concentración máxima de GH liberada en el sujeto a ser tratado tras la administración de EP 1572 puede compararse con la concentración máxima que puede encontrarse en un sujeto que se sabe que no tiene GHD y/o la concentración máxima que puede encontrarse en un sujeto que se sabe que tiene GHD, en ambos casos tras la administración de EP 1572.

5 **[0034]** Se reconocerá que la invención puede utilizarse para la valoración diagnóstica de niños de pequeña estatura o de niños de los que podría sospecharse que tengan GHD, por ejemplo, un niño que ha superado cáncer (por ejemplo: leucemia), se ha sometido a cirugía cerebral y/o cirugía pituitaria y/o quimioterapia y/o radioterapia y/o daño cerebral.

10 **[0035]** Se reconocerá también que la invención puede utilizarse para la valoración diagnóstica de adultos que se diagnosticaron con GHD en la niñez, o en adultos de los que podría sospecharse que tengan GHD, por ejemplo, un adulto que haya superado cáncer, se haya sometido a cirugía cerebral y/o cirugía pituitaria y/o quimioterapia y/o radioterapia y/o daño cerebral y/o un adulto que tiene, o que haya tenido tratamiento para un adenoma pituitario.

15 **[0036]** Además, se considerará que ciertas poblaciones de sujetos que se ensayarían normalmente para GHD pueden beneficiarse de esta valoración diagnóstica, por ejemplo sujetos con VIH.

[0037] Preferiblemente, el sujeto habrá estado en ayunas durante la noche antes de la administración de EP 1572. Adicionalmente, si se sabe que el sujeto sufre de otros trastorno(s) hormonales, puede estar en un régimen adecuado de tratamiento para estabilizar este trastorno antes de ser sometido al diagnóstico de GHD (por ejemplo tratamiento de hipotiroidismo con levotiroxina).

20 **[0038]** La muestra pre-administración quiere decir una muestra que se toma del sujeto previa a la administración oral de EP 1572.

[0039] La muestra post-administración quiere decir una muestra que se toma del sujeto tras la administración oral de EP 1572.

25 **[0040]** La muestra del sujeto humano o animal puede ser cualquier muestra adecuada. En particulares realizaciones de la invención, una muestra adecuada se obtiene del sujeto humano o animal que tiene que valorarse (por ejemplo diagnosticarse), y esta muestra se proporciona para el análisis del nivel de GH. Convenientemente, la muestra es una muestra fluida y puede ser sangre, suero o plasma. Es particularmente conveniente si la muestra es una muestra de sangre tomada de o provista por el sujeto donde el nivel de hormona del crecimiento en la muestra se mide utilizando cualquier medio adecuado para determinar el nivel de GH en una muestra.

30 **[0041]** Ejemplos de medios adecuados para la determinación del nivel de GH en una muestra son, pero no están limitados a, los que hacen uso de agentes que se unen selectivamente a GH, como anticuerpos o moléculas tipo anticuerpo, para determinar GH (por ejemplo inmunoensayos). Estos incluyen un ensayo inmunoradiométrico basado en anticuerpos policlonales (p-IRMA), un IRMA basado en anticuerpos monoclonales (m-IRMA), un ensayo inmunofluorométrico de resolución temporal basado en anticuerpos monoclonales (trIFMA), un ensayo de radio receptor, un bioensayo y un ensayo inmunofuncional (IFA) (ver Ranke, M.B. (ed): Diagnósticos de Función Endocrina en Niños y adolescentes, Basel, Karger, 2003, pp107-128 y Chatarine Jansson, et al., Clin. Chem. (1997) 43(6), pp 950-956). Ejemplos de los anteriores ensayos incluyen: kit de ensayo de inmunoensayo de la hormona del crecimiento humana Microwell ELISA de Diagnostic Automation INC., Calabasas, California 91302 USA (número de catálogo 1901); Inmunoensayo para la determinación cuantitativa de GH humana de Nichols Diagnostic Institute, San Juan Capistrano, California, US (número de catálogo 62-7056); y kit IRMA para GH humana, Institute of Isotopes Co. Ltd., Budapest, Hungría.

35 **[0042]** El nivel de GH en la muestra o muestras post-administración y/o la cinética de producción de GH determinados midiendo el nivel de GH en las muestras post-administración puede utilizarse para valorar si el sujeto humano o animal tiene GHD. Niveles de GH, o cinética de producción de GH, que son indicativos de deficiencia de GH se determinan fácilmente y se utilizan parámetros que dan buena especificidad y sensibilidad. Como se trató antes, los niveles medidos pueden compararse con los niveles que pueden hallarse en sujetos conocidos con GHD o sujetos normales (sin GHD) que se han sometido al mismo régimen de ensayo. En una realización de la invención un nivel de corte de GH hallado después de provocaciones máximas utilizando EP 40 1572 puede utilizarse para determinar GHD. Los niveles adecuados de corte para dosis particulares de EP 1572 se determinan fácilmente.

45 **[0043]** Aunque no según la presente invención podría utilizarse EP 1572 en un kit para determinar deficiencia de hormona del crecimiento en un sujeto humano o animal. Normalmente, el kit se utiliza para diagnosticar GHD en un sujeto humano o animal.

55 **[0044]** Aunque no según la presente invención podría utilizarse EP 1572 en un kit para determinar deficiencia de

hormona del crecimiento en un sujeto humano o animal, donde EP 1572 se administra oralmente. Normalmente, el kit se utiliza para diagnosticar GHD en un sujeto humano o animal.

[0045] Aunque no según la presente invención podría utilizarse EP 1572 en la fabricación de una composición para administración oral para determinar deficiencia de hormona del crecimiento en un sujeto humano o animal.

5 **[0046]** Preferiblemente, la composición contiene una cantidad adecuada de EP 1572 en una dosis oral sencilla. Normalmente, la valoración de GHD en el sujeto humano o animal se hace midiendo los niveles de GH en la muestra(s) tomada tras la administración de EP 1572 (muestra(s) post-administración). Normalmente, al menos se toma una muestra antes de la administración de EP 1572 (muestra pre-administración).

10 **[0047]** Aunque no según la presente invención podría utilizarse EP 1572 en la fabricación de una composición para administración oral para determinar deficiencia de hormona del crecimiento en un sujeto humano o animal.

[0048] Aunque no de acuerdo con la presente invención un kit de partes que constituye un kit diagnóstico podría comprender:

(a) EP 1572 formulada para administración oral; y

15 (b) medios para determinar el nivel de hormona del crecimiento en una muestra.

[0049] Preferiblemente, la composición contiene una cantidad adecuada de EP 1572 en una sola dosis oral. Normalmente, la valoración de GHD en el sujeto humano o animal se hace midiendo los niveles de GH en muestra(s) tomada tras administración de EP 1572 (muestra post-administración). Normalmente, una muestra se toma antes de la administración de EP 1572 (muestra pre-administración) y se determina el nivel máximo de GH en la muestra post-administración. Preferiblemente, los medios para determinar el nivel de GH sin como se define anteriormente. Más preferiblemente los medios para determinar el nivel de GH en una muestra son, pero no están limitados a, los que hacen uso de agentes que se unen selectivamente a la GH, como anticuerpos o moléculas tipo anticuerpo para determinar GH (por ejemplo inmuno ensayos) tal como un ensayo inmunoradiométrico basado en anticuerpos policlonales (p-IRMA), un IRMA basado en anticuerpos monoclonales (m-IRMA), un ensayo inmunofluorométrico de resolución temporal basado en anticuerpos monoclonales (trIFMA), un ensayo radio receptor, un bioensayo o un ensayo inmunofuncional (IFA).

[0050] Aunque no según la presente invención el kit de partes puede comprender además un juego de instrucciones sobre el uso del kit diagnóstico, exponiendo los pasos que se necesitan para llegar al diagnóstico. Preferiblemente el medio para determinar el nivel de hormona del crecimiento en una muestra es un inmunoensayo.

[0051] Aunque no según la presente invención el kit de partes puede también considerarse que es un sistema para la valoración de GHD. Normalmente, el sistema contiene EP 1572 en una formulación oral y un inmunoensayo para GH.

[0052] Adicionalmente, aunque EP 1572 son útiles en sí mismas para valorar GHD en un sujeto humano o animal, puede que exista un beneficio de utilizar EP 1572 en combinación con uno o más agentes provocadores, tales como levodopa, clonidina, arginina, insulina, hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH), diversos análogos de GHRH, GHRP(s) para valorar GHD en un sujeto humano o animal. Alternativamente, EP 1572 puede utilizarse en combinación con o como un adyuvante a otro ensayo para GHD, como los ensayos que se definen en las guías de la Sociedad de Hormona del Crecimiento (J. Clin. Endocrinol. Metab. (2000), 85(11), p 3990-3993) y J. Clin. Endocrinol. Metab. (1998), 83(2), p 379-381).

[0053] Por ello, en los métodos del primer y segundo aspecto de la invención, puede administrarse al sujeto humano o animal uno o más agentes provocadores así como EP 1572. De igual modo, aunque no según la presente invención un kit puede contener también uno o más agentes provocadores así como EP 1572. Aunque no según la presente invención una composición puede comprender adicionalmente uno o más agentes provocadores, o puede administrarse al sujeto humano o animal uno o más agentes provocadores.

[0054] Se apreciará que el sujeto humano o animal pueda haberse separada e independientemente valorado para GHD utilizando uno o más agentes provocadores.

[0055] Los métodos de la invención pueden también tener la ventaja de que pueden ser más eficaces que, ser menos tóxicos que, producir menos efectos secundarios que, y/o tener un mejor perfil farmacocinético que, y/o tener otras propiedades farmacológicas que métodos y kits conocidos en la técnica anterior, sea para uso en las indicaciones anteriormente expuestas o en otras.

[0056] El listado o tratamiento de un documento publicado previamente en esta especificación no debería

necesariamente tomarse como un reconocimiento de que el documento sea parte del estado de la técnica o sea de conomiento general.

[0057] La invención se describirá ahora en más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos y figuras no limitativos en las que:

5 La Figura 1 muestra concentraciones en plasma de EP 1572 (mediss ± EEM) tras la administración oral de distintas dosis de EP 1572 en sujetos machos sanos.

La Figura 2 muestra concentraciones en plasma de hormona del crecimiento liberada tras administración de distintas dosis de EP 1572 en sujetos machos sanos.

10 La Figura 3 muestra la respuesta a dosis de distintas dosis de EP 1572 oral a la secreción total de GH sobre la línea base en sujetos machos sanos.

Ejemplo 1: Biodisponibilidad oral de EP 1572 e inducción de GH tras la administración oral.

[0058] Tras un ensayo provocador con EP 1572, se estableció el perfil farmacocinético de EP 1572 y el nivel de GH liberada en respuesta a su administración oral en 36 sujetos machos sanos a diversas dosis.

[0059] Las formulaciones para cada dosis utilizadas para un sujeto que pesa 70 kg se describen más adelante:

15 **[0060]** Para 0,005 mg/kg, 6 mg de EP 1572 se disolvieron en 40 mL de agua destilada. Una alícuota de 2,33 mL de esta solución se diluyó con 17,67 mL de agua para generar la formulación de dosis final como una solución de 20 mL .

20 **[0061]** Para 0.05 mg/kg, 15 mg de EP 1572 se disolvieron en 40 mL de agua destilada. Una alícuota de 9,33 mL de esta solución se diluyó con 10,67 mL de agua para generar la formulación de dosis final como una solución de 20 mL .

[0062] Para 0,125 mg/kg, 8.75 mg de EP 1572 se disolvieron en una solución conteniendo 20 mL de agua destilada y 40 µL de solución 1 molar de ácido clorhídrico.

[0063] Para 0,25 mg/kg, 17,5 mg de EP 1572 se disolvieron en una solución conteniendo 20 mL de agua destilada y 40 µL de solución 1 molar de ácido clorhídrico.

25 **[0064]** Para 0.5 mg/kg, 35 mg de EP 1572 se disolvieron en una solución conteniendo 20 mL de agua destilada y 40 µL de solución 1 molar de ácido clorhídrico.

30 **[0065]** Se tomó una muestra de sangre del sujeto a los 30 y 15 minutos antes de la administración de EP 1572. Se tomó una muestra de sangre del sujeto inmediatamente antes de que la formulación acuosa conteniendo 0,5 mg/kg de EP 1572 se administrara oralmente al sujeto. Se tomó sangre adicional del sujeto a los 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 y 300 minutos desde la administración y una porción de cada muestra se procesó conforme al protocolo de ensayo indicado más adelante. Se determinó el nivel de GH presente en cada muestra por el método de ensayo indicado más adelante y se determinó la concentración máxima (C_{max}) para el sujeto. El resto de la muestra fue utilizado para determinar el nivel de EP 1572 presente en la circulación sistémica (como se indicó antes).

35 Ensayo de nivel de GH

40 **[0066]** Los ensayos se realizaron utilizando el inmunoensayo de hormona del crecimiento humana de Nichols Advantage® utilizando el Nichols Advantage® Specialty System para la determinación cuantitativa de concentraciones de hormona humana del crecimiento en suero humano, utilizando las sustancias y métodos expuestos en los procedimientos estándar de funcionamiento del fabricante (Nichols Institute Diagnostics, 1311 Calle Batido, San Clemente, California 92673, EEUU).

Ensayo para determinar niveles de EP 1572 en sangre

45 **[0067]** Los componentes orgánicos en plasma humano se extrajeron utilizando un total de 500 mL de una mezcla de acetato de etilo/ isopropanol (82,5% y 17,5%, respectivamente). Tras el secado (utilizando sulfato de sodio) y la concentración de las fracciones orgánicas recogidas, se separó el analito por HPLC de fase inversa (Merck, gel de sílice de fase inversa, LiChroCART, 125x4 mm) utilizando una mezcla eluyente de metanol, agua y ácido fórmico (65%, 35% y 0,1%, respectivamente) y se detectó por un espectrómetro de masas (Finnigan TSQ 7000). La cuantificación se realizó con EP 1573 como estándar interno (evaluación de la proporción de area de pico).

50 **[0068]** Se llevaron a cabo estudios de dosificación adicionales en los que se administraron a los sujetos dosis de 0,005, 0,05, 0,25 y 0,125 mg/kg cada una, utilizando las formulaciones antes descritas.

[0069] Los resultados se indican en las Figuras 1 a 3 y Tabla 2 abajo.

Tabla 2: parámetros farmacocinéticos tras administración oral de EP 1572 (media ± EEM)

| Dosis (mg/kg) | AUC (0-300) | Cmáx (ng/mL) | Tmáx (min) |
|---------------|-----------------|--------------|---------------|
| 0,5 | 967,30 ± 149,90 | 7,59 ± 0,83 | 50,00 ± 9,35 |
| 0,25 | 520,03 ± 37,55 | 3,92 ± 0,57 | 55,00 ± 13,78 |
| 0,125 | 320,79 ± 48,63 | 2,33 ± 0,39 | 62,50 ± 14,71 |
| 0,05 | 104,19 ± 33,34 | 0,86 ± 0,24 | 75,00 ± 12,99 |

AUC = Área bajo la curva
 Cmax = Concentración máxima observada
 Tmax = Tiempo para alcanzar la concentración máxima observada

Ejemplo 2: Comparación de la Sensibilidad y especificidad de EP 1572 al ensayo de GHRH+Arg

5 [0070] Un sujeto (sea sano o del que se sospecha que haya tenido enfermedad hipotalámica-pituitaria de adulto o deficiencia múltiple de hormona pituitaria) se somete bien a ensayo de GHRH más L-arginina o a un ensayo utilizando EP 1572 oralmente administrada.

10 [0071] El ensayo de GHRH más L-arginina se lleva a cabo como se describe en Biller, B. M. K. et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2002), 87(5), p2067-2079, con una dosis de 1 µg/kg de GHRH administrada por bolo iv, seguido de una infusión de 30 minutos de 30 g de L-arginina. Se tomaron muestras de sangre del sujeto a los -30 o -15, 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos tras la administración.

[0072] El ensayo de EP 1572 se lleva a cabo como se describe antes utilizando una dosis de 0,5 mg/kg y se toman muestras de sangre del sujeto a los -30 o -15, 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos tras la administración.

15 [0073] Después de al menos siete días los sujetos sometidos al ensayo de GHRH más L-arginina se someten al ensayo de EP 1572 y *vice versa*.

[0074] Las muestras pueden entonces analizarse como se describe en el ensayo antes referido y los resultados usarse para determinar si un sujeto tiene GHD o no en base a los análisis estadísticos de los resultados (95% sensibilidad y 95% especificidad), como se describe en Biller, B. M. K. et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2002), 87(5), p2067-2079.

20 Ejemplo 3: Protocolo Estándar

[0075] Se disuelve una muestra de 50 mg de EP 1572, con agitación, en un frasco graduado de 250 mL por la adición poco a poco de 100 mL de agua purificada. Alternativamente, dos comprimidos dispersables cada uno conteniendo 25 mg de EP 1572 pueden disolverse de igual modo.

25 [0076] Se extrae una muestra de sangre del sujeto 15 minutos antes de la administración de EP 1572. Se toma una muestra de sangre del sujeto inmediatamente antes de que la solución acuosa de EP 1572 se administre oralmente al sujeto, bien en una dosis fija de 50 mg o en una dosis de 1 mL por kg de peso corporal. Se toman muestras adicionales de sangre del sujeto a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos desde la administración y el nivel de GH presente en cada muestra se determina por el método de ensayo antes descrito, cuyo nivel máximo se utiliza después para determinar si el sujeto sufre o no de GHD. La carencia de, o un incremento brusco en la concentración de GH indicaría GHD cuando se compara al de una persona normal.

30 Ejemplo 4: Una preparación de EP 1572 para uso clínico

[0077]

1. Inyectar con una jeringa de 50 ml y una aguja, 50 ml de agua para irrigación dentro de la botella de 100 ml que contiene EP 1572.
- 35 2. Agitar enérgicamente la botella hasta una completa disolución. Abrir la botella y verter la solución en un vaso de laboratorio/cilindro de medición.
3. Aclarar la botella de cristal de 100 ml con unos 50 ml extra de agua para irrigación y verter la solución en el

vaso de laboratorio de cristal/cilindro de medición para dar una concentración final de EP 1572 de aproximadamente 0,5 mg/ml.

4. Añadir el contenido entero del sobre de excipiente y disolverlo.

5. El volumen apropiado de solución se mide en un cilindro distinto de medición conforme al peso del sujeto para dar una dosis de 0,5 mg/kg de EP 1572 (es decir 1 ml de solución por kg de peso corporal).

6. Si el sujeto pesa >100 kg entonces los pasos 1-4 se repiten con un segundo conjunto de ingredientes.

7. La solución debería administrarse inmediatamente al sujeto.

Ejemplo 5: Una preparación de EP 1572 para uso clínico

10 **[0078]** El contenido entero de un sobre que contiene EP 1572 (50 mg) y excipientes se disuelve (ver Tabla 3 para contenidos potenciales del sobre), con agitación, en un vial por adición poco a poco de 100 mL de agua purificada. Se mide el volumen apropiado de solución en un cilindro distinto de medición conforme al peso del sujeto para dar una dosis de 0,5 mg/kg de EP 1572 (es decir 1 ml de solución por kg de peso corporal). Si el sujeto pesa >100 kg entonces se disuelve un sobre adicional en 100 mL de agua purificada. La solución debería administrarse inmediatamente al sujeto.

15

Tabla 3: posible sobre conteniendo 50 mg de EP 1572 y excipientes

| Materia Prima | Cantidad Unitaria (1 Sobre) | Porcentaje de Cantidad |
|--|------------------------------------|-------------------------------|
| EP 1572 | 0,0500g | 5,00% |
| Aerosil 200W (Dióxido de silicio coloidal) | 0,0010g | 0,10% |
| Kollidon CL (Crospovidona) | 0,0200g | 2,00% |
| Flowlac 100 (Monohidrato de lactosa) | 0,9190g | 91,90% |
| Pruv (Estearil Fumarato de sodio) | 0,0100g | 1,00% |
| Total | 1.0000g | 100% |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de valoración de deficiencia de hormona del crecimiento relacionada con la pituitaria en un sujeto humano o animal, el método comprendiéndolo proporcionar al menos una muestra post-administración de un sujeto al que se ha administrado oralmente HAib- D-Trp-D-gTrp-CHO (EP 1572), determinar el nivel de hormona del crecimiento en la muestra o muestras y valorar si el nivel de hormona del crecimiento es indicativo de deficiencia de hormona del crecimiento relacionada con la pituitaria en el sujeto comparando el nivel de hormona del crecimiento en al menos una muestra post-administración con el nivel que puede encontrarse en una muestra post-administración equivalente de un sujeto que se sabe que no tiene deficiencia de hormona del crecimiento y/o al nivel que puede hallarse en una muestra post-administración equivalente de un sujeto que se sabe que tiene deficiencia de hormona del crecimiento relacionada con la pituitaria, donde:
- 10 la muestra es una muestra de sangre, una muestra de suero o muestra de plasma;
- el nivel de hormona del crecimiento en la muestra se mide utilizando un inmunoensayo; se proporciona una o más muestra o muestras post-administración tomadas después de un intervalo de tiempo entre 15 y 120 minutos; y
- 15 la cantidad de EP 1572 administrada es de entre 18 y 75 mg.
2. Un método conforme a la reivindicación 1 donde se proporciona una muestra procedente del sujeto previa a la administración de EP 1572.
3. Un método conforme a la reivindicación 1 donde la una o más muestra o muestras post-administración se toman tras un intervalo de tiempo de entre 15 y 30 minutos.
- 20 4. Un método conforme a la reivindicación 1 donde se proporcionan muestras tomadas a los -30 o -15, 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos respecto al momento de administración oral de EP 1572.
5. Un método conforme a las reivindicaciones 1 a 4 donde se utiliza la valoración del nivel máximo de hormona del crecimiento liberada durante el marco de tiempo para indicar deficiencia de hormona del crecimiento relacionada con pituitaria en el sujeto.
- 25 6. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el sujeto humano o animal puede ser bien un niño o un adulto.
7. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el sujeto animal es un caballo, vaca, oveja, cerdo, cabra, gato o perro.

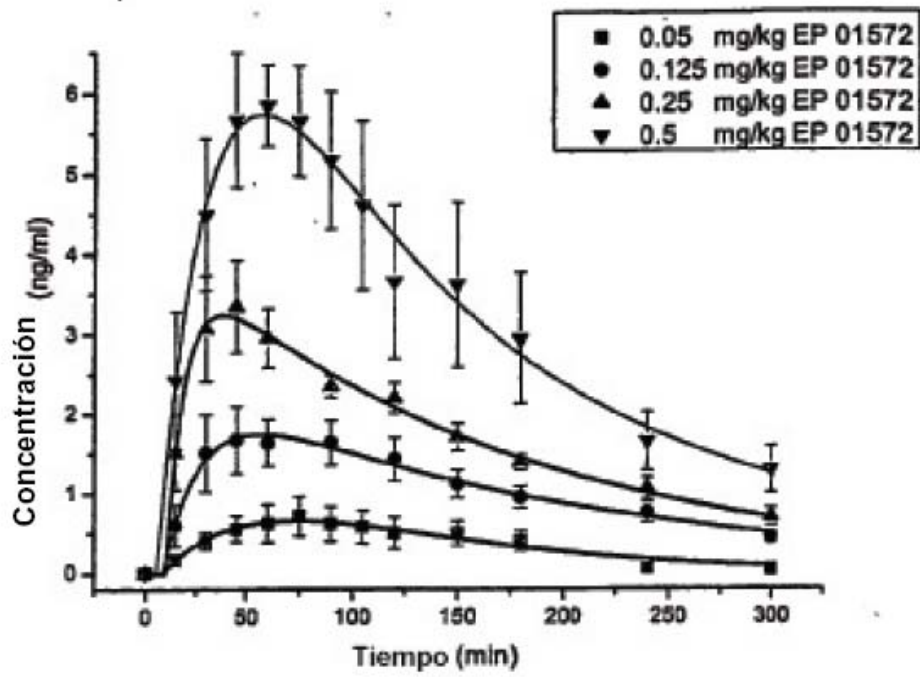


Figura 1

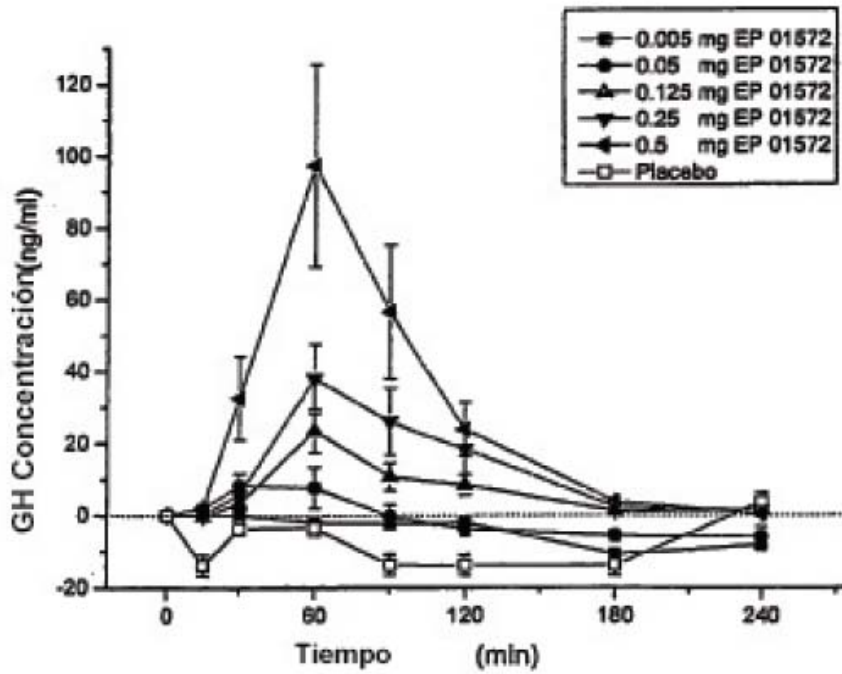


Figura 2

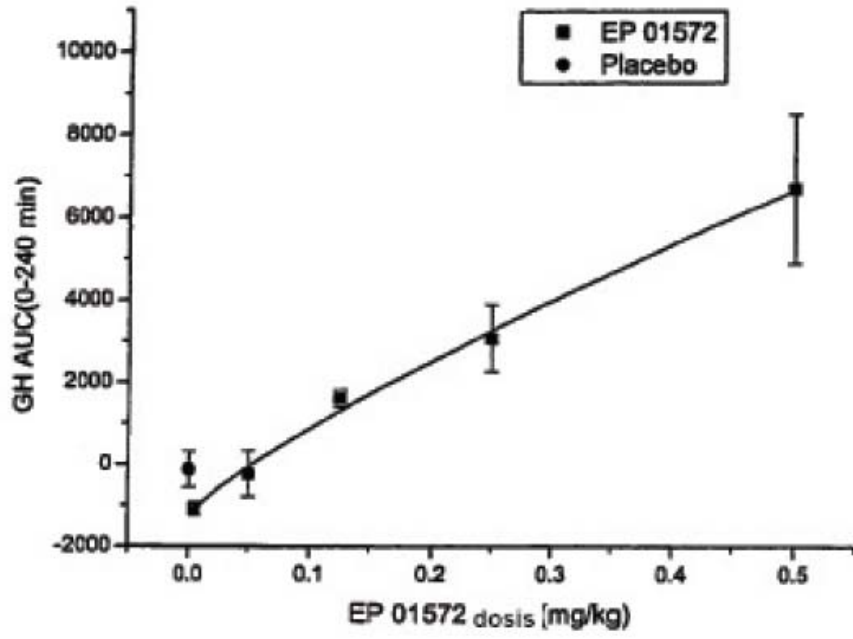


Figura 3