

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 970**

51 Int. Cl.:

A61K 38/25 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2007 E 07752724 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2012809**

54 Título: **Uso de un agonista de la grelina para mejorar los efectos catabólicos del tratamiento con glucocorticoides**

30 Prioridad:

10.03.2006 US 781172 P

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

10.10.2013

73 Titular/es:

**IPSEN PHARMA (100.0%)
65 QUAI GEORGES GORSE
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT, FR**

72 Inventor/es:

**TULIPANO, GIOVANNI;
GIUSTINA, ANDREA;
DONG, ZHENG XIN y
CULLER, MICHAEL DEWITT**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 424 970 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).

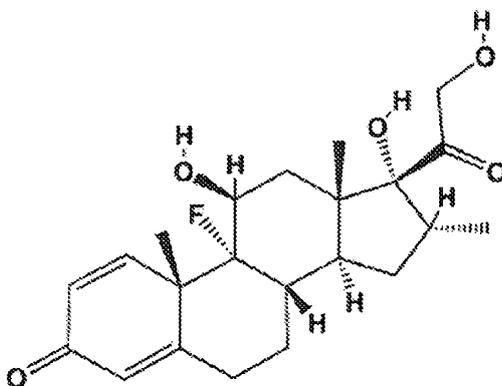
DESCRIPCIÓN

Uso de un agonista de la grelina para mejorar los efectos catabólicos del tratamiento con glucocorticoides

Antecedentes de la invención

5 Los glucocorticoides son una clase de hormonas esteroideas caracterizadas por tener la capacidad de fijarse al receptor del cortisol y desencadenar efectos parecidos. Los glucocorticoides tienen potentes propiedades antiinflamatorias e inmunodepresoras y como tales son la clase mejor conocida de ingredientes activos antiinflamatorios. Debido a su amplio abanico de usos y a su gran acción antiinflamatoria, las preparaciones de corticoides son agentes terapéuticos de primera elección en una amplia gama de enfermedades inflamatorias, tales como por ejemplo, las enfermedades reumáticas, alergias, enfermedades inflamatorias de los pulmones, corazón e intestinos, asma bronquial, enfermedades hiperproliferativas de la piel (psoriasis), eccemas, enfermedades autoinmunitarias o estado de choque.

La dexametasona, un miembro sintético de la clase de hormonas glucocorticoides que muestra propiedades antiinflamatorias e inmunodepresoras que son 40 veces más potentes que la hidrocortisona que se encuentra en la naturaleza y que tiene la siguiente estructura,



15 La 9-fluoro-11 β ,17,21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona se ha demostrado que aumenta el efecto antiemético de los antagonistas del receptor de la 5-HT₃. La dexametasona se utiliza para tratar muchas afecciones inflamatorias y autoinmunitarias, tales como la artritis reumatoide. También se da a los pacientes con cáncer que están recibiendo quimioterapia para contrarrestar determinados efectos secundarios.

20 Los glucocorticoides, en particular la dexametasona, se han utilizado durante años para tratar a los lactantes prematuros que tienen una enfermedad pulmonar crónica, o que corren el riesgo de tenerla (The, T. F. et al., «Early Postnatal Dexamethasone Therapy for the Prevention of Chronic Lung Disease in Preterm Infants with Respiratory Distress Syndrome: A Multicenter Clinical Trial», 1997, 100: 715-6). A menudo, estos fármacos tienen como beneficios a corto plazo la mejora del funcionamiento pulmonar y facilitar la pronta retirada de la ventilación mecánica. A los recién nacidos, con un muy poco peso al nacer (MPPN), tradicionalmente se les da muy pronto el tratamiento posnatal con dexametasona para tratar y/o prevenir el síndrome de dificultad respiratoria aguda y el posterior episodio de la enfermedad pulmonar crónica.

30 No obstante, los glucocorticoides suprimen la secreción de la hormona del crecimiento. La hormona del crecimiento de los humanos (que también puede denominarse «GH» en la presente memoria) es un polipéptido monocatenario que consiste en 191 aminoácidos (masa molecular de 21.500 Da). Los enlaces disulfuro conectan las posiciones 53 y 165 y las posiciones 182 y 189 (Niall, «Nature», *New Biology*, (1971), 230: 90). Los efectos de la hormona del crecimiento sobre los tejidos del cuerpo pueden describirse de forma general como anabólicos (constructores). Al igual que la mayor parte de las hormonas proteicas, la GH actúa mediante interacción con un receptor específico de la superficie de las células. El crecimiento en altura de la niñez es el efecto que mejor se conoce de la acción de la GH. La GH también estimula la producción del factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (también se puede denominar «IGF-1» en la presente memoria) que muestra efectos estimulantes del crecimiento sobre una amplia gama de tejidos. La GH también sirve para muchas otras funciones metabólicas tales como incrementar la retención de calcio y la mineralización de los huesos, incrementar la masa muscular mediante la inducción de la síntesis de proteínas, estimular el sistema inmunitario, reducir la captación de glucosa por el hígado, lo que contribuye así al mantenimiento y el funcionamiento de los islotes pancreáticos y a la mejora de la lipólisis, lo que da lugar a cierta reducción del tejido adiposo (grasa corporal) y al aumento de la cantidad de ácidos grasos y glicerol libres en la sangre.

45 La liberación pulsátil de la hormona del crecimiento desde la hipófisis somatotropa está regulada por dos neuropéptidos hipotalámicos: la somatoliberina y la somatostatina. La somatoliberina estimula la liberación de la hormona del crecimiento mientras que la somatostatina inhibe la secreción de la hormona del crecimiento (Frohman et al., *Endocrinology Review* (1986) 7: 223-53 y Strobi et al., *Pharmacology Review* (1994) 46: 1-34). La mayoría de

las deficiencias de la GH están ocasionadas por defectos de la liberación de la GH, y no por defectos primarios en la síntesis de la propia hormona en la hipófisis. El incremento de la secreción de la GH puede conseguirse mediante la estimulación o la inhibición de diferentes sistemas neurotransmisores en el cerebro y en el hipotálamo. Como consecuencia, se persigue el desarrollo de agentes sintéticos que liberan la hormona de crecimiento para estimular la secreción de la GH hipofisaria y puede tener algunas ventajas sobre el incómodo y caro tratamiento sustitutivo de la GH. Al actuar sobre las vías reguladoras fisiológicas, los agentes más deseables estimularían la secreción pulsátil de la GH, y gracias a que están intactos los bucles de retroalimentación negativa se evitaría que la GH estuviera en exceso, lo que está asociado a los efectos secundarios indeseables de la administración de GH exógena.

Se postula que la patogénesis de la inhibición del crecimiento mediada por glucocorticoides es muy probablemente de naturaleza multifactorial, e implica la resistencia parcial a la hormona del crecimiento, la supresión de la actividad del IGF-1 y el antagonismo de la actividad de la insulina. Todos estos factores influyen en el metabolismo de los glúcidos y de los lípidos.

Al inhibir la secreción de la GH, la elevación de la concentración de glucocorticoides puede inducir el catabolismo de las proteínas, lo que, a su vez, puede conducir a la degradación del músculo esquelético o a la atrofia de las microvellosidades intestinales. La falta de hormona del crecimiento da lugar a una serie de trastornos médicos. Las consecuencias de la deficiencia adquirida de la GH incluyen la profunda reducción de la masa corporal magra y el incremento concomitante de la grasa corporal total, en particular en la región del tronco. La disminución de la masa y la fuerza de la musculatura cardíaca y esquelética conduce a una reducción significativa de la capacidad de hacer ejercicio. También se reduce la densidad ósea.

Se ha expresado cierta preocupación en cuanto a los efectos sobre el crecimiento somático que tiene el tratamiento precoz con dexametasona, ya que se ha demostrado que los glucocorticoides alteran el tamaño celular y la síntesis de ADN en los modelos animales (Cotterrell M. et al., «Effects of Corticosteroids on the Biochemical Maturation of Rat Brain: Postnatal Cell Formation», *J. Neurochem.*, 1972, 19: 2151-67). Además, se ha hallado que el tratamiento con dexametasona puede comprometer la mineralización ósea y esto puede afectar a la velocidad del crecimiento óseo, incluso cuando aumenta el gasto de energía (Weiler, H. A. et al., «Longitudinal Assessment of Growth and Bone Mineral Accretion in Prematurely Born Infants Treated for Chronic Lung Disease with Dexamethasone», *Early Hum. Dev.*, 1997, 47: 271-86 y Gibson, A. T. et al., «Growth Retardation After Dexamethasone Administration: Assessment by Knemometry», *Arch. Dis. Child*, 1993, 69: 505-9).

Tal y como se describe en el *New England Journal of Medicine*, se observó que los niños que reciben pronto el tratamiento con dexametasona posnatal para el síndrome de dificultad respiratoria aguda de la prematuridad tienen más deterioro de la función cognitiva y neuromotora y más incapacidad en edad escolar que los niños prematuros que no se trataron con dexametasona. Un estudio llevado a cabo en la Universidad Médica de China, Taichung, Taiwan, reveló que los niños tratados con dexametasona tenían un diámetro cefálico significativamente más pequeño y una altura media significativamente más baja. Además se observó que los niños tratados con dexametasona evidenciaban una habilidad motora y una coordinación motora significativamente peores, así como una peor integración motora y visual, que los niños que no se trataron con dexametasona. El incremento observado de la disfunción del neurodesarrollo en los recién nacidos tratados con dexametasona llevó a los investigadores taiwaneses a recomendar la interrupción del uso de un tratamiento con dexametasona para la enfermedad pulmonar crónica en los niños a pesar de los beneficios debido a los efectos adversos sobre el crecimiento somático en la edad escolar (Hendry, J., «Postnatal Dexamethasone Treatment Associate with Later Neuromotor and Cognitive Function Impairment and Disability, 2004, *N. England J. Med.*, 350: 1304-13).

El tratamiento con glucocorticoides se considera esencial para el control del asma; tales tratamientos se dan a menudo de forma diaria y durante un extenso periodo de tiempo. Los estudios recientes han demostrado que la administración de glucocorticoides, al mismo tiempo que alivia algunos síntomas del asma, también puede conducir al daño de la vías respiratorias o a su remodelación (véase Dorscheid, D. R. et al., «Apoptosis of airway epithelial cells induced by corticosteroids», *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, 164: 1939-1947). Como observó Dorscheid, el tratamiento del asma con los corticoesteroides tales como la dexametasona y la inducción resultante de la muerte celular «abre la posibilidad de que al menos uno de los principales componentes del daño crónico de las vías respiratorias en el asma, el desprendimiento epitelial y la denudación, puedan en parte ser resultado de un tratamiento principal de la enfermedad».

Los pacientes que deben tomar dosis grandes de glucocorticoides farmacológicos, tal como la dexametasona, pueden desarrollar el síndrome de Cushing si se exponen a dosis lo suficientemente altas durante un periodo de tiempo extenso. El síndrome de Cushing es una afección que está asociada a una serie de efectos catabólicos negativos, entre ellos, la reducción de la velocidad de crecimiento y de la masa muscular magra. Una persona que padece el síndrome de Cushing normalmente tiene una cara redonda y grande (habitualmente denominada «cara de luna») con unos brazos y piernas delgados en proporción con el tronco engrosado. Los efectos catabólicos de esta enfermedad limitan la capacidad muscular, lo que conduce a una debilidad física pronunciada. La piel se vuelve fina, se amorata con facilidad y cicatriza mal cuando se hacen hematomas o cortes. La elevada concentración de glucocorticoides asociada al síndrome de Cushing, con el tiempo, da lugar a una elevación crónica de la tensión arterial, osteoporosis, disminución de la resistencia a las infecciones, con desarrollo de cálculos renales y diabetes. Se ha encontrado que las alteraciones mentales, entre ellas la depresión y las alucinaciones, se producen en

personas que tienen el síndrome de Cushing. Las mujeres suelen experimentar ciclos menstruales irregulares. Los niños con el síndrome de Cushing crecen lentamente y se quedan bajitos. En algunas personas, las glándulas suprarrenales también producen andrógenos en gran cantidad. Cuando no se trata el exceso crónico de glucocorticoides asociado al síndrome de Cushing, se incrementa el riesgo de muerte prematura.

5 La grelina probablemente mejora la actividad de las neuronas que secretan la somatoliberina (GHRH), mientras que a la vez actúan como un antagonista funcional de la somatostatina (SS) (Ghigo, E. et al., *Eur J Endocrinol* (1997) 136(5): 445-60). La observación de que la grelina es capaz de estimular la ingestión de alimento, incrementar la asimilación de los alimentos y el vaciado gástrico, junto con su capacidad para incrementar la concentración de GH, lo que favorece así la incorporación rápida de los nutrientes en el músculo y en las reservas de grasa, indica que la grelina puede tener potencial terapéutico para tratar las indicaciones en las que el catabolismo de las proteínas es un síntoma.

10 La administración a largo plazo de los glucocorticoides es uno de los tratamientos más utilizados en la medicina clínica, pero se sabe que suprime la secreción y acción de la GH. De hecho, los glucocorticoides inhiben la liberación pulsátil de la GH, reducen la expresión del receptor y la transducción de la señal de la GH, e inhiben la bioactividad del IGF-1. El reconocimiento del antagonismo mediado por los glucocorticoides sobre la secreción y acción de la GH ha renovado el interés por el tratamiento o tratamientos de la GH para estimular la liberación de la GH como una posible manera de revertir algunos de los efectos secundarios más dañinos del tratamiento con los glucocorticoides a largo plazo, tal como la inhibición del crecimiento y los efectos catabólicos. Hay diferentes estudios que sugieren que los efectos perjudiciales de los glucocorticoides pueden vencerse con distinto éxito con el tratamiento de la GH, pero el tratamiento de la GH a largo plazo también es posible que origine efectos adversos y que requiera más seguimiento y estudios. Se ha demostrado profusamente en los humanos y en los animales que los efectos inhibitorios que tiene la administración de glucocorticoides a largo plazo sobre la secreción de la GH están mediados por el incremento del tono de la somatostatina. La GHS sintética estimula la liberación de la GH, en parte, a través de la inhibición de la vía de la somatostatina; de hecho, en las ratas, la GHRP-6 es capaz de contrarrestar completamente la inhibición de la GH mediada por los glucocorticoides.

15 La patente de los EE.UU. n.º US 2006/025566 A1 describe compuestos macrocíclicos definidos conformacionalmente que son moduladores selectivos del receptor de la grelina, así como la síntesis de los compuestos. Los compuestos se describen como agonistas útiles del receptor de la grelina y por tener uso en medicina.

20 La patente de los EE.UU. n.º US 2005/272648 A1 describe análogos peptídicos que poseen una actividad agonista o antagonista de la grelina, así como los usos terapéuticos y no terapéuticos de los mismos.

En Reid et al 1997, *European Journal of Endocrinology* 137: 209-217, se da a conocer una revisión de los mecanismos y del tratamiento de la osteoporosis por glucocorticoides.

25 La patente internacional WO 97/24369 A1 se refiere a secretagogos específicos de la hormona de crecimiento que se dice que incrementan la cantidad de la hormona de crecimiento endógena, y a su uso terapéutico.

En Laron et al. 1995, *Clin Endocrinol. (Oxf)* 43: 631-635, se presenta un estudio de los efectos del péptido somatorrelínico (GHRP) hexarrelina con respecto a la aceleración del crecimiento de los niños bajos.

En Barnes 1995, *The New England Journal of Medicine* 332: 868-875, se da a conocer una revisión del uso terapéutico de glucocorticoides inhalados para el tratamiento del asma.

30 Un objetivo principal en la técnica es elevar al máximo los efectos beneficiosos de los glucocorticoides, en particular de la dexametasona, al mismo tiempo que se disminuyen al mínimo sus efectos adversos. Los efectos secundarios catabólicos de los glucocorticoides impiden que esta clase de sustancias se utilicen en un abanico de tratamientos incluso más amplio. A pesar de los escasos efectos secundarios de los corticoides modernos, sigue siendo crítico en particular el tratamiento a largo plazo con ingredientes activos de esta clase de sustancias. Así pues, en la técnica existe la necesidad de agentes y procedimientos para contrarrestar los efectos negativos de la administración de los glucocorticoides a largo plazo y, por lo tanto, estimular los efectos beneficiosos de dicha administración.

Compendio de la invención

35 En la presente memoria se describe un procedimiento y una composición farmacéutica para inhibir el efecto de los glucocorticoides sobre la secreción de la hormona del crecimiento, y más en particular, la administración farmacéutica de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) que se ha encontrado que es útil como agonista de la grelina para contrarrestar los efectos catabólicos de la dexametasona y de otros glucocorticoides naturales.

40 De acuerdo con esto, en un aspecto la presente invención se da a conocer un agonista de la grelina de la fórmula [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso en el tratamiento de los efectos catabólicos del exceso de glucocorticoides en un individuo que sufre el síndrome de Cushing.

La invención también da a conocer un agonista de la grelina de la fórmula [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ para el uso en el tratamiento de los efectos secundarios catabólicos en un individuo asociados a la administración a largo plazo de dosis terapéuticas de un glucocorticoide, en donde dichos efectos secundarios se seleccionan del grupo que consiste en reducción del crecimiento, reducción de la velocidad de crecimiento, reducción de la masa corporal, reducción de la masa corporal magra, reducción de la cantidad del factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1) y reducción de la masa ósea.

El glucocorticoide administrado puede ser dexametasona. En un aspecto, las dosis terapéuticas de los glucocorticoides se administran a un niño para tratar el síndrome de dificultad respiratoria de la prematuridad y dichos efectos catabólicos de dicho tratamiento con glucocorticoides se alivian mediante la administración de dicho agonista de la grelina. En otro aspecto, las cantidades terapéuticas de los glucocorticoides se administran a un individuo para tratar el asma y dichos efectos catabólicos de dicho tratamiento con glucocorticoides se alivian mediante la administración de dicho agonista de la grelina. El individuo puede ser un adulto o un niño. En un aspecto, el tratamiento del individuo puede comprender la administración del agonista de la grelina al individuo por la vía de administración intramuscular, intranasal, intraperitoneal o intravenosa.

La grelina es un péptido que se produce en la naturaleza que tiene la secuencia siguiente: H-Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg-NH₂ (Kojima M. et al. *Nature* (1999) 402(6762): 656-60; SEQ ID n.º 1). La grelina la sintetizan las células epiteliales que revisten el fondo gástrico y que estimulan el apetito y la adiposidad. La cantidad de grelina aumenta antes de una comida y disminuye después. La cantidad de grelina en el plasma de los individuos obesos es menor que en los individuos más delgados y la cantidad de grelina se incrementa durante el momento del día que va de la medianoche hasta el amanecer en los individuos más enjutos, lo que sugiere la existencia de un defecto en el aparato circulatorio de los individuos obesos (Yildiz, B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) 101: 10434-9), lo que conduce así a la creencia de que la grelina tiene la capacidad de regular la homeostasia.

Se ha descubierto que la grelina estimula poderosamente la secreción de la hormona del crecimiento desde la adenohipófisis y se cree que es un ligando endógeno para el receptor del subtipo 1a de los secretagogos de la GH (GHS) (de ahora en adelante se puede encontrar citado como «GHS-1a»; Kojima et al., *Nature* (1999) 402: 656-60) tanto en los animales como en los humanos (Ukkola, O. et al., 2002 *Ann. Med.* (2002) 34: 102-8).

En la presente memoria se describe un procedimiento para mejorar los efectos catabólicos del exceso de glucocorticoides en un individuo que necesita tal tratamiento que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de la grelina. El agonista de la grelina puede ser [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2).

El exceso de glucocorticoides puede ser el resultado de una enfermedad o de una afección. El exceso de glucocorticoides puede ser el resultado de la administración de glucocorticoides a largo plazo al individuo. El glucocorticoide administrado puede ser dexametasona.

Los efectos catabólicos inducidos por los glucocorticoides pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, una reducción del crecimiento, una reducción de la velocidad de crecimiento, una reducción de la masa corporal, una reducción de la masa corporal magra, una reducción de la concentración de IGF-1 y/o una reducción de la masa ósea. El individuo que recibe el procedimiento de la invención para mejorar una reducción del crecimiento, una reducción de la velocidad de crecimiento, una reducción de la masa corporal, una reducción de la masa corporal magra, una reducción de la concentración de IGF y/o una reducción de la masa ósea, puede ser un niño o un adulto. El agonista de la grelina que es útil para mejorar una reducción del crecimiento, una reducción de la velocidad de crecimiento, una reducción de la masa corporal, una reducción de la masa corporal magra, una reducción de la concentración de IGF-1 y/o una reducción de la masa ósea puede ser [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2). La reducción del crecimiento, de la velocidad de crecimiento, de la masa corporal, de la masa corporal magra, de la concentración de IGF-1 y/o de la masa ósea puede ser un resultado de la administración de la dexametasona.

La administración puede incluir, pero sin limitarse a ellas, la administración subcutánea, intramuscular, intranasal, intraperitoneal e intravenosa.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para permitir la administración a largo plazo de dosis terapéuticas de glucocorticoides para tratar una enfermedad o afección, que comprende aliviar los efectos catabólicos de la administración de dichas dosis terapéuticas de glucocorticoides a largo plazo mediante la administración de un agonista de la grelina. El agonista de la grelina puede ser [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2). El glucocorticoide puede ser dexametasona. El individuo que recibe el procedimiento de la invención para aliviar los efectos catabólicos de la administración a largo plazo de dosis terapéuticas de glucocorticoides, tal como la dexametasona, mediante la administración de un agonista de la grelina, tal como [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), es un niño o un adulto.

Se describe adicionalmente un procedimiento que permite la administración a largo plazo de dosis terapéuticas de glucocorticoides a un niño para tratar el síndrome de dificultad respiratoria de la prematuridad, que comprende aliviar los efectos catabólicos de la administración de dichas dosis terapéuticas de glucocorticoides a largo plazo mediante

la administración de un agonista de la grelina. El agonista de la grelina puede ser [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2). El glucocorticoide puede ser dexametasona.

5 Se describe adicionalmente un procedimiento que permite la administración a largo plazo de dosis terapéuticas de glucocorticoides para tratar el asma, que comprende el alivio de los efectos catabólicos de la administración de dichas dosis terapéuticas de glucocorticoides a largo plazo mediante la administración de un agonista de la grelina. El agonista de la grelina puede ser [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2). El glucocorticoide puede ser dexametasona. El individuo que recibe el procedimiento de la invención que permite la administración a largo plazo de dosis terapéuticas de glucocorticoides para tratar el asma puede ser un niño o un adulto.

10 También se describe un procedimiento que permite la administración a largo plazo de dosis terapéuticas de glucocorticoides para tratar una enfermedad o afección, que comprende aliviar los efectos catabólicos de la administración de dichas dosis terapéuticas de glucocorticoides a largo plazo mediante la administración de un agonista de la grelina, en donde la administración incluye, pero no se limita a ellas, la administración intramuscular, intranasal, intraperitoneal e intravenosa.

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1. Efectos de la respuesta a la dosis de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) (indicado como «A») frente a la grelina en el recambio de fosfoinosítidos en las células transfectadas CHO-K1 que expresan el receptor de hGHS1a. Los resultados son la media ± DE de tres experimentos independientes.

20 Figura 2. Efecto de la respuesta a la dosis de la administración intravenosa de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) (indicado como «A») sobre la secreción de la GH en ratas con libertad de movimientos. Los valores de las dosis se expresan como nmol/kg. Cada punto experimental representa la media ± EEM de cuatro animales replicados. Cuando no se ilustran barras de error, el EEM es más pequeño que la altura ocupada por el símbolo que representa la media.

25 Figura 3. El efecto del tratamiento farmacológico diferente sobre el crecimiento somático de las ratas macho jóvenes, el tratamiento con dexametasona (también denominado en la presente memoria «DEX») disminuyó significativamente (P < 0,01) el crecimiento somático, mientras que la administración de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) (indicado como «A») incrementó significativamente (P < 0,05) el crecimiento somático en comparación con las ratas tratadas con SAL. La supresión del crecimiento inducida por DEX se revirtió mediante el tratamiento concomitante con [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) (prueba de la t de Dunnett para comparaciones múltiples). Los datos representan la media de ocho animales; las *líneas rectas* representan el análisis de regresión lineal (R = 0,9, P < 0,05 para todos los grupos experimentales).

30 Figura 4. Panel A: el efecto del tratamiento farmacológico diferente sobre la ingestión de alimento durante 24 h expresado como porcentaje del valor del control. Los datos representan la media ± EEM de nueve determinaciones realizadas a intervalos irregulares desde el día 33 al día 47 después del nacimiento. Panel B: el efecto de los diferentes tratamientos farmacológicos sobre la eficacia del alimento calculado como proporción entre la ingestión de alimento (g) y la masa corporal (g) medida durante el mismo intervalo de tiempo en diferentes etapas del crecimiento. Los datos representan la media ± EEM de ocho ratas. * P < 0,05; ** < 0,01 frente a ratas tratadas con SAL (prueba de la t de Dunnett). Panel C: el efecto de los diferentes tratamientos farmacológicos sobre la ingestión acumulativa de alimento medida a lo largo de los intervalos de tiempo indicados en diferentes etapas del crecimiento.

35 Figura 5. Estudio de la relación entre la masa corporal final y la concentración de IGF-1 en el plasma en el momento de matar las ratas: se observó una correlación lineal positiva (N = 32, Pearson de dos colas R = 0,7125, P < 0,001); *cuadrado relleno*, SAL; *cuadrado vacío* [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2); *círculo relleno*, DEX; *círculo vacío*, DEX + [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2).

45 Figura 6. Estudio de la relación entre la masa corporal final y la concentración de insulina en el plasma en el momento de matar las ratas: se observó una correlación lineal positiva, lo que limita el análisis a ratas tratadas con DEX (N = 16, Pearson de dos colas R = 0,5848, P < 0,05); *cuadrado relleno*, SAL; *cuadrado vacío* [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2); *círculo relleno*, DEX; *círculo vacío*, DEX + [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2).

Descripción detallada de la invención

50 Se describe en la presente memoria un nuevo procedimiento para tratar las disfunciones catabólicas inducidas por el exceso de glucocorticoides. El procedimiento comprende la administración a un humano o animal que sufre una disfunción catabólica, o que posiblemente pueda padecerla, de una cantidad terapéuticamente eficaz de la grelina, o un análogo funcional de la misma, en particular [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2).

55 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente el experto en la técnica a la que pertenece la invención. De igual

forma, todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria están incorporadas por referencia.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión «exceso de glucocorticoides» o «glucocorticoides en exceso» se refiere a los pacientes que padecen una afección asociada a la exposición crónica a una cantidad de glucocorticoides por encima de lo normal. Como resultado, estos pacientes se pueden caracterizar por tener una elevada concentración de glucocorticoides en la sangre. Los ejemplos incluyen la secreción excesiva de las hormonas de la corteza suprarrenal tales como el cortisol en el síndrome de Cushing, o la exposición crónica a los glucocorticoides, tal como la dexametasona, utilizados como antiinflamatorios en muchos cuadros clínicos tales como el síndrome de dificultad respiratoria grave de la prematuridad.

10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el «catabolismo» se refiere a una degradación neta del tejido anatómico. Así pues, un «efecto catabólico» es un efecto que implica una degradación de los tejidos anatómicos. Los efectos catabólicos inducidos por el exceso de glucocorticoides pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, reducción del crecimiento, reducción de la velocidad de crecimiento, reducción de la masa corporal, reducción de la masa corporal magra, reducción de la concentración de IGF-1 y reducción de la masa ósea. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un sujeto experimenta una «reducción del crecimiento» cuando el sujeto es más bajo que la altura teórica, lo que normalmente se juzga con relación a la altura y al peso de sujetos similares de edad similar, lo que a menudo se juzga en relación con los gráficos de altura y de peso para niños y/o adultos. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un sujeto experimenta una «reducción de la velocidad del crecimiento» cuando la velocidad de crecimiento del sujeto es más lenta o inferior que dicha velocidad para los sujetos similares de edad similar, lo que a menudo se juzga en relación con los gráficos de altura y peso para niños y/o adultos. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «peso corporal» o «masa corporal» se refiere al peso total de un sujeto, que incluye los tejidos grasos y magros. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «peso corporal» o «masa corporal» se refiere al peso total de un sujeto, que incluye la grasa y los tejidos magros. Así pues, un sujeto experimenta una reducción de la masa corporal cuando el sujeto pesa menos que sujetos similares de edad similar, lo que a menudo se juzga con respecto a los gráficos de altura y peso para niños y/o adultos. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «masa corporal magra» se refiere al peso de los tejidos magros de un sujeto y excluye el peso de los tejidos grasos de un sujeto. De un modo similar a la «reducción de la masa corporal», un sujeto experimenta una «reducción de la masa corporal magra» cuando la masa corporal magra del sujeto es menor que la de los sujetos similares de edad similar. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «reducción de la concentración de IGF-1» se refiere a una afección en la que la concentración de IGF-1 en circulación en un sujeto está reducida en comparación con sujetos similares de edad similar. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un sujeto experimenta una «reducción de la masa ósea» cuando la densidad ósea del sujeto es menor que la de sujetos similares de edad similar. También se puede medir una reducción del crecimiento, una reducción de la velocidad de crecimiento, una reducción de la masa corporal, una reducción de la masa corporal magra, una reducción de la concentración de IGF-1 y una reducción de la masa ósea, y comparar con las concentraciones o valores obtenidos en el mismo sujeto antes de la aparición de la enfermedad o afección que requiere la administración de glucocorticoides.

40 Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «disfunción catabólica» es una afección que induce una vía bioquímica catabólica en la cual se degrada una estructura anatómica. Con «prevención de un estado catabólico» incluimos un efecto en el que se estimula la síntesis de proteínas y/o un efecto en el cual se disminuye la velocidad de degradación de las proteínas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «mejorar» se refiere al alivio, reducción, supresión, disminución o cuanto menos aminoración de los efectos catabólicos del exceso de glucocorticoides.

45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «enfermedad consuntiva de proteínas» o una «afección consuntiva de proteínas» es una enfermedad o afección en la que las proteínas, a saber, la masa corporal magra, disminuye o se reduce o desciende a un nivel indeseado y/o a una velocidad indeseada. Un ejemplo de una enfermedad consuntiva de proteínas es la caquexia.

50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la administración de un fármaco a largo plazo, tal como un glucocorticoide, describe la administración del medicamento para el tratamiento de una afección crónica. El fármaco se puede administrar siempre y cuando exista la afección y el paciente obtenga un beneficio de la administración. La administración a largo plazo puede durar varias semanas, varios meses o incluso varios años. En algunos casos, el medicamento se administra mientras el paciente esté vivo.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «crecimiento somático» se refiere al crecimiento del cuerpo a diferencia de las vísceras.

55 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «secreción pulsátil de la hormona del crecimiento (GH)» se refiere a la secreción rítmica de la GH desde la adenohipófisis.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «dificultad respiratoria de prematuridad», que también se puede denominar «síndrome de dificultad respiratoria», es un trastorno de la respiración de los recién nacidos prematuros

en los que los alvéolos de los pulmones del recién nacido no permanecen abiertos ya que no se produce tensioactivo o se produce poco.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «lipólisis» se refiere a la descomposición o degradación de la grasa.

5 El presente procedimiento está diseñado para utilizarse en todas las disfunciones catabólicas, tanto enterales como parenterales. La terminología «enteral» se pretende que indique la porción del canal alimentario entre el estómago y el ano. La terminología «parenteral» denota esa región que está fuera del tubo digestivo. La administración de la grelina, o de un análogo funcional de la misma, en particular [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), puede ser tanto por medio enteral como parenteral. La administración enteral se lleva a cabo mediante un catéter de poco calibre colocado a través de la nariz en las regiones gástrica o duodenal, o a través de la implantación quirúrgica tal y como en, por ejemplo, gastrostomía o yeyunostomía. Las vías parenterales de administración incluyen, pero sin limitarse a ellas, vías tales como inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, absorción nasofaríngea o por mucosa, o absorción transdérmica.

15 En la mayoría de los casos se administra por vía intravenosa el [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En la administración intravenosa, la cantidad terapéuticamente eficaz de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es en forma líquida, que se administra desde un reservorio directamente a través de la colocación de una aguja en una vena grande del paciente, en donde la aguja está conectada al reservorio mediante catéter.

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «agonista» es una molécula que se fija al mismo receptor o receptores que una molécula de ejemplo y desencadena la misma respuesta, o una parecida, del receptor o receptores de dicha molécula de ejemplo. Por ejemplo, el [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) es un «agonista de la grelina», es decir, es una molécula que se fija al mismo receptor o receptores que la grelina nativa y desencadena la misma respuesta, o una parecida, al fijarse a dichos receptores. La terminología «análogo funcional» es otra frase utilizada para describir una molécula agonista.

25 La terminología «sustancialmente asociado a» se aplica a las disfunciones catabólicas para las cuales resulta eficaz el procedimiento de la invención.

Los análogos funcionales de la grelina que conservan las características de la grelina se contemplan como equivalentes.

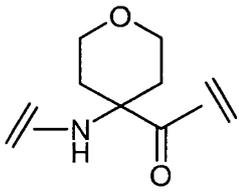
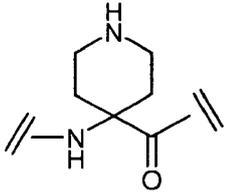
30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «cantidad terapéuticamente eficaz» para la administración de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, son las cantidades lo suficientemente grandes para impedir el catabolismo o la atrofia de los tejidos del cuerpo para mantener la homeostasia metabólica.

35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «composición terapéutica» o «composición farmacéutica» se define por comprender el [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que también puede contener excipientes como agua, minerales y otros vehículos compatibles.

El uso de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo mediante el procedimiento descrito en la presente memoria es idealmente adecuado para la preparación de composiciones. Estas composiciones pueden comprender [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en monoterapia o en politerapia con otras sustancias químicas.

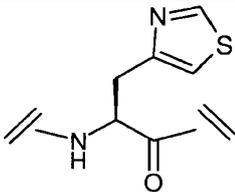
40 Los análogos de la grelina tal como [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) se pueden administrar en cualquier forma farmacéutica adecuada, p. ej., formularse con cualquier vehículo farmacéutico conocido, sea orgánico o inorgánico. Los vehículos así utilizados deben ser inertes (no reactivos). Preferiblemente para la administración enteral, por ejemplo, en comprimidos, cápsulas o similares, se pueden incorporar a ésta vehículos convencionales, p. ej., gelatina, lactosa, almidones o similares. Si se desea, las preparaciones se pueden esterilizar o pueden contener adicionalmente sustancias auxiliares conocidas, tales como conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, sales para regular la presión osmótica, tampones, aditivos y/o otros vehículos convencionales y similares. El contenido de las sustancias activas en estas preparaciones, tal como una ampolla o un comprimido, puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 a 100 mg, preferiblemente de aproximadamente 5 a 10 mg. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y emulsiones. Se pueden utilizar vehículos o vendajes oclusivos para incrementar la permeabilidad de la piel y estimular la absorción. Se pueden utilizar contenedores que contienen la composición descrita en la presente memoria para facilitar la administración de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente memoria. Estos contenedores están diseñados para contener, por ejemplo, la dosis diaria de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se ha de administrar al paciente.

Nomenclatura y abreviaturas

Símbolo	Significado
Algunos aminoácidos presentes en los compuestos descritos en la presente memoria se puede representar y se representan en la presente memoria como sigue:	
Abu	ácido α -aminobutírico
Acc	ácido 1-amino-1-ciclo(C ₃ -C ₉)alquilcarboxílico
A3c	ácido 1-amino-1-ciclopropanocarboxílico
A4c	ácido 1-amino-1-ciclobutanocarboxílico
A5c	ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico
A6c	ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico
	
Act	indica la estructura
Aib	ácido α -aminoisobutírico
Aic	ácido 2-aminoindan-2-carboxílico
Ala o A	alanina
β -Ala	beta-alanina
	
Apc	indica la estructura:
Arg o R	arginina
hArg	homoarginina
Asn o N	asparragina
Asp o D	ácido aspártico

ES 2 424 970 T3

Símbolo	Significado
Ava	ácido 5-amino-n-valérico
Cha	β -ciclohexilalanina
Cys o C	cisteína
hCys	L-homocisteína
Dab	ácido 2,4-diaminobutírico
Dap	ácido 2,3-diaminopropiónico
Dhp	3,4-deshidroprolina
Dmt	ácido 5,5-dimetiltiazolidina-4-carboxílico
2-Fua	β -(2-furil)-alanina
Gln o Q	glutamina
Glu o E	ácido glutámico
Gly o G	glicina
His o H	histidina
3-Hyp	trans-3-hidroxi-L-prolina, a saber, ácido (2S,3S)-3-hidroxipirrolidina-2-carboxílico
4-Hyp	4-hidroxiprolina, a saber, ácido (2S,4R)-4-hidroxipirrolidina-2-carboxílico
Ile o I	isoleucina
Inc	ácido indolina-2-carboxílico
Inp	ácido isonipecótico
Ktp	4-cetoprolina
Leu o L	leucina
hLeu	homoleucina
Lys o K	lisina
Met o M	metionina
1-Nal	β -(1-naftil)-L-alanina
2-Nal	β -(2-naftil)-L-alanina

Símbolo	Significado
Nle	norleucina
Nva	norvalina
Oic	ácido octahidroindol-2-carboxílico
Orn	ornitina
2-Pal	β -(2-piridil)alanina
3-Pal	β -(3-piridil)alanina
4-Pal	β -(4-piridil)alanina
Phe o F	fenilalanina
hPhe	homofenilalanina
Pip	ácido piperídico
Pro o P	prolina
Ser o S	serina
	
Taz	β -(4-tiazolil)alanina, a saber,
2-Thi	β -(2-tienil)-alanina
3-Thi	β -(3-tienil)-alanina
Thp	4-amino-4-carboxitetrahidropirano
Thr o T	treonina
Thz	ácido tiazolidina-4-carboxílico
Tic	ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico
Tle	<i>tert</i> -leucina
Trp o W	triptófano
Tyr o Y	tirosina
Val o V	valina

Si el aminoácido tiene formas isoméricas, es la forma de L del aminoácido la que se representa, a menos que se indique explícitamente otra cosa.

Ciertas abreviaturas utilizadas en la presente memoria se definen a continuación:

Boc:	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
BSA:	albúmina de suero bovino
Bzl:	bencilo
DCM:	diclorometano
DIC:	N, N-diisopropilcarbodiimida
DIEA:	diisopropiletil amina
Dmab:	4-{N-(1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutil)-amino} bencilo
DMAP:	4-(dimetilamino)piridina
DMF:	dimetilformamida
DNP:	2,4-dinitrofenilo
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
Fmoc:	fluorenilmetiloxicarbonilo
HBTU:	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
cHex	ciclohexilo
HOAT:	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HOBt:	1-hidroxi-benzotriazol
MBHA	4-metilbenzohidrilamina
Mmt:	4-metoxitritilo
NMP:	N-metilpirrolidona
Pbf:	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PhiPr	éster de γ -2-fenilisopropilo
tBu:	<i>tert</i> -butilo
TIS:	triisopropilsilano
TOS:	tosilo

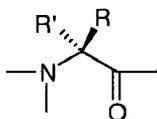
trt tritilo

TFA: ácido trifluoroacético

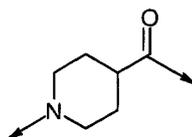
TFFH: hexafluorofosfato de tetrametilfluoroforamidinio

Z: benciloxicarbonilo

La nomenclatura utilizada para definir los péptidos en la presente memoria es la típicamente utilizada en la técnica, en donde el grupo amino del extremo amino aparece a la izquierda y el grupo carboxilo del extremo carboxilo aparece a la derecha, es decir, representa la estructura -NH-C(R)(R')-CO-, en donde R y R' son cada uno, independientemente, hidrógeno o la cadena lateral de un aminoácido (p. ej., R = CH₃ y R' = H para Ala), o R y R' pueden unirse para formar un sistema de anillo. Para el aminoácido del extremo amino, la abreviatura representa la estructura de:



o cuando el aminoácido del extremo amino es el ácido isonipecótico (Inp), la abreviatura representa la estructura de:



Un péptido también puede indicarse en la presente memoria mediante otro formato, p. ej., (Aib²)hGrelina(1-28)-NH₂, con el o los aminoácidos sustituidos de la secuencia natural colocados entre la primera pareja de paréntesis (p. ej., Aib² para Ser² en la hGrelina). Los números entre el segundo conjunto de paréntesis se refiere al número de aminoácidos presentes en el péptido (p. ej., hGrelina(1-18) se refiere a los aminoácidos 1 a 18 de la secuencia peptídica de la grelina humana). La designación «NH₂» en, p. ej., (Aib²)hGrelina(1-28)-NH₂, indica que el extremo carboxilo del péptido está amidado. (Aib²)hGrelina(1-28), o, alternativamente, (Aib²)hGrelina(1-28)-OH indica que el extremo carboxilo es el ácido libre.

A menos que se indique otra cosa, los aminoácidos con un centro quiral se proporcionan en el enantiómero L. La referencia a un «derivado del mismo» se refiere a un aminoácido modificado tal como el correspondiente D-aminoácido, un N-alquil-aminoácido, un β-aminoácido o un aminoácido marcado.

«Acilo» se refiere a R'-C(O)-, en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, arilo, alquilarilo o alquilarilo sustituido.

«Alquilo» se refiere a un grupo hidrocarbonado que contiene uno o más átomos de carbono en los que múltiples átomos de carbono, si están presentes, se unen mediante enlaces sencillos. El grupo hidrocarbonado de alquilo puede ser de cadena lineal o contener una o más ramificaciones o grupos cíclicos.

«Alquilo sustituido» se refiere a un alquilo en donde uno o varios átomos de hidrógeno del grupo hidrocarburo están reemplazados por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno (a saber, flúor, cloro, bromo y yodo), -OH, -CN, -SH, -NH₂, -NHCH₃, -NO₂, -alquilo C₁₋₂₀ sustituido con 1 a 6 halógenos, -CF₃, -OCH₃, -OCF₃, y -(CH₂)₀₋₂₀-COOH. En diferentes realizaciones se presentan 1, 2, 3 o 4 sustituyentes. La presencia de -(CH₂)₀₋₂₀-COOH da lugar a la producción de un ácido alquílico. Ejemplos de ácidos alquílicos que contienen, o que consisten en, -(CH₂)₀₋₂₀-COOH incluyen ácido 2-norbornano acético, ácido *tert*-butírico y ácido 3-ciclopentil propiónico.

«Heteroalquilo» se refiere a un alquilo en el que uno o varios átomos de carbono del grupo hidrocarburo están reemplazados por uno o varios de los siguientes grupos: amino, amido, -O-, -S- o carbonilo. En diferentes realizaciones están presentes 1 o 2 heteroátomos.

«Heteroalquilo sustituido» se refiere a un heteroalquilo en donde uno o varios átomos de hidrógeno del grupo hidrocarburo están reemplazados por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno (a saber, flúor, cloro, bromo y yodo), -OH, -CN, -SH, -NH₂, -NHCH₃, -NO₂, -alquilo C₁₋₂₀ sustituido con 1 a 6 halógenos, -CF₃, -OCH₃, -OCF₃, y -(CH₂)₀₋₂₀-COOH. En diferentes realizaciones, se presentan 1, 2, 3 o 4 sustituyentes.

«Alquenilo» se refiere a un grupo hidrocarburo compuesto por dos o más carbonos en los que están presentes uno o varios dobles enlaces carbono-carbono. El grupo hidrocarbonado de alquenilo puede ser de cadena lineal o contener una o más ramificaciones o grupos cíclicos.

5 «Alquenilo sustituido» se refiere a un alquenilo en donde uno o varios hidrógenos están reemplazados por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno (a saber, flúor, cloro, bromo y yodo), -OH, -CN, -SH, -NH₂, -NHCH₃, -NO₂, -alquilo C₁₋₂₀ sustituido con 1 a 6 halógenos, -CF₃, -OCH₃, -OCF₃, y -(CH₂)₀₋₂₀-COOH. En diferentes realizaciones se presentan 1, 2, 3 o 4 sustituyentes.

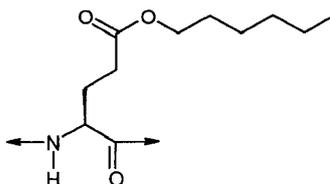
10 «Ariilo» se refiere a un grupo aromático opcionalmente sustituido con por lo menos un anillo que tiene un sistema de electrones π conjugados que contiene hasta dos sistemas de anillos conjugados o condensados. Ariilo incluye grupos ariilo carbocíclico, ariilo heterocíclico y biarilo. Preferiblemente, el ariilo es un anillo de cinco o seis miembros. Los átomos preferidos para un ariilo heterocíclico son uno o varios de azufre, oxígeno y/o nitrógeno. Los ejemplos de ariilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, indol, quinolina, 2-imidazol y 9-antraceno. Los sustituyentes de ariilo se seleccionan del grupo que consiste en -alquilo C₁₋₂₀, -alcoxi C₁₋₂₀, halógeno (a saber, flúor, cloro, bromo y yodo), -OH, -CN, -SH, -NH₂, -NO₂, -alquilo C₁₋₂₀ sustituido con 1 a 5 halógenos, -CF₃, -OCF₃ y -(CH₂)₀₋₂₀-COOH. En diferentes realizaciones el ariilo contiene 0, 1, 2, 3 o 4 sustituyentes.

La terminología «halo» abarca flúor, cloro, bromo y yodo.

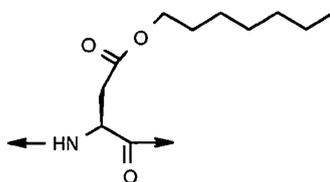
La terminología «resto de hidrocarburo (C₁-C₁₂)» abarca alquilo, alquenilo y alquinilo y, en el caso del alquenilo y del alquinilo, son C₂-C₁₂.

«Alquilarilo» se refiere a un «alquilo» unido a un «ariilo».

20 Lo que se quiere significar mediante Glu(O-hexilo) es

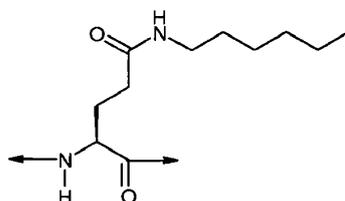


Lo que se quiere significar mediante Asp(1-heptanol) es

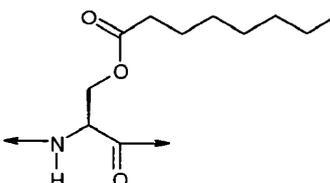


Lo que se quiere significar mediante Glu(NH-hexilo) es

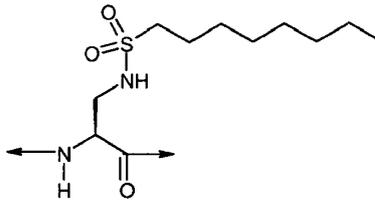
25



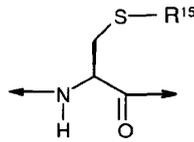
Lo que se quiere significar mediante Ser(n-octanoílo) o Ser(C(O)-heptilo) es



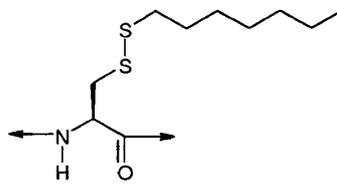
Lo que se quiere significar mediante Dap(1-octanosulfonilo) es



Lo que se quiere significar mediante Cys(R¹⁵) es:

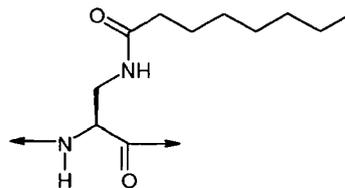


Lo que se quiere significar mediante Cys(S-heptilo) es

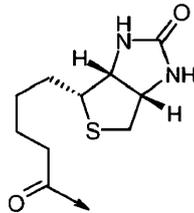


5

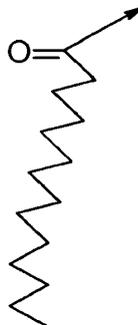
Lo que se quiere significar mediante Dap(octanoílo) es



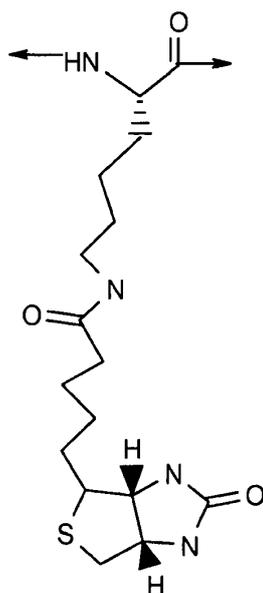
Lo que se quiere significar mediante biotínilo es



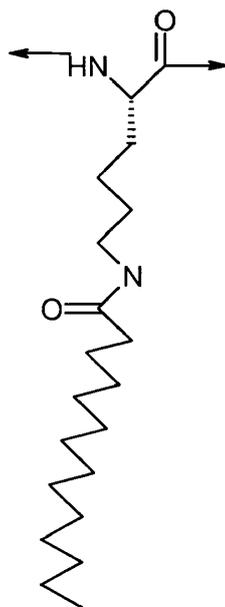
10 Lo que se quiere significar mediante miristilo es



Lo que se quiere significar mediante Lys(biotínilo) es



Lo que se quiere significar mediante Lys(miristilo) es



5 En la presente memoria se incluyen diastereómeros así como también sus formas racémicas y enantioméricamente puras resueltas. Los análogos de grelina pueden contener D-aminoácidos, L-aminoácidos o sus combinaciones. Preferiblemente, los aminoácidos presentes en un análogo de grelina son los L-enantiómeros.

10 Los derivados de análogos citados en la presente memoria pueden comprender D-aminoácidos, N-alkil-aminoácidos, β -aminoácidos y/o uno o varios aminoácidos marcados (entre ellos una versión marcada de un D-aminoácido, un N-alkil-aminoácido o un β -aminoácido). Un derivado marcado indica la alteración de un aminoácido o un derivado de aminoácido con un marcador detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen marcadores luminiscentes, enzimáticos o radiactivos. Tanto el tipo de marcación como la posición del marcador pueden alterar la actividad del análogo. Los marcadores se deben seleccionar y posicionar de modo que no alteren sustancialmente la actividad del análogo de la grelina en el receptor de GHS. El efecto de un marcador y posición concretos sobre la actividad de la grelina se puede determinar mediante ensayos que miden la actividad de la grelina y/o su unión.

15 Un grupo protector unido covalentemente al grupo carboxilo del extremo carboxilo reduce la reactividad del extremo carboxilo en condiciones *in vivo*. El grupo protector del extremo carboxilo está preferiblemente unido al grupo α -carbonilo del último aminoácido. Los grupos protectores del extremo carboxilo pueden incluir amida, metilamida y etilamida.

20 **Ejemplos**

La descripción anterior describe de forma general la presente invención. Se puede obtener un conocimiento más completo mediante referencia a los ejemplos específicos que vienen a continuación y que se dan a conocer en la presente memoria sólo con el propósito de ilustrarla y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique de otra manera.

5 Se pueden producir análogos de la grelina mediante las técnicas descritas en la presente memoria para producir [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), así como las técnicas que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, una región del polipéptido de un análogo de la grelina puede sintetizarse y modificarse química o bioquímicamente. Las técnicas para síntesis química de polipéptidos también se conocen bien en la técnica (Vincent en «Peptide and Protein Drug Delivery», Nueva York, N. Y., Dekker, 1990.) Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse por síntesis de péptidos estándar en fase sólida (Stewart, J. M., et al., *Solid Phase Synthesis* (Pierce Chemical Co., 2.ª ed. 1984)).

10 Los ejemplos de técnicas para la síntesis bioquímica implican la introducción de un ácido nucleico en una célula y la expresión de ácidos nucleicos se da a conocer en Ausubel, «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley, 1987-1998, y en Sambrook et al., en «Molecular Cloning, A Laboratory Manual», 2.ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Ejemplo 1

Síntesis del análogo de la grelina [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2).

15 El [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) se sintetizó en un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems® (Foster City, CA) modelo 430A® que se modificó para realizar la síntesis acelerada de péptidos en fase sólida con química Boc (Schnolzer et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1992, 40: 180). Se utilizó una resina de 4-metilbenzidrilamina (a partir de ahora se denominará «MBHA») (Peninsula, Belmont, CA) con la sustitución de 0,91 mmol/g. Los aminoácidos con Boc (Midwest Bio-Tech®, Fishers, IN; Novabiochem®, San Diego, CA) se utilizaron con la siguiente protección de la cadena lateral: Boc-Ala-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-His(DNP)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Lys(2CIZ)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH y Boc-Pro-OH. Con respecto a las posiciones sustituidas, se utilizó Boc-Gly-OH como resto en la posición 1, Fmoc-Aib-OH se utilizó como resto en la posición 2, y Fmoc-Glu(OtBu)-OH (Novabiochem®, San Diego, CA) se utilizó como resto en la posición 3 de la secuencia. La síntesis se llevó a cabo a una escala de 0,25 mmol. Se retiraron los grupos de Boc mediante tratamiento con TFA al 100% durante 2 x 1 minuto. Los aminoácidos con Boc (2,5 mmol) se activaron con HBTU (2,0 mmol) y DIEA (1,0 ml) en 4 ml de DMF y se conjugaron sin una neutralización previa de la sal de TFA de resina-péptido. El tiempo de conjugación fue de 5 minutos.

20 Al final del ensamblaje de los primeros 25 restos en el sintetizador de péptidos ABI 430A® y antes de la conjugación de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, la resina con el péptido protegido se transfirió a un recipiente de reacción en un agitador para la síntesis manual. Después de retirar el grupo protector Boc mediante el uso de TFA al 100% durante 2 x 1 minuto y el lavado con DMF, la resina se mezcló con Fmoc-Glu(OtBu)-OH (2,5 mmol) que se había activado con HBTU (2,0 mmol), HOBT (2,0 mmol) y DIEA (1,0 ml) en 4 ml de DMF. La mezcla se agitó durante 2 horas. Se repitió esta etapa de conjugación. Tras el lavado con DMF, la resina se trató con una solución de TFA que contenía agua al 5% y TIS al 5% durante 2 horas para retirar el grupo protector tBu de la cadena lateral del resto de Glu. La resina se neutralizó con DIEA al 10% en DMF y se lavó con DMF y DCM, y luego se trató con hexilamina (2,0 mmol), DIC (2,0 mmol), HOBT (2,0 mmol) en 5 ml de DCM durante 2 x 2 horas. La resina se lavó con DMF y se trató con piperidina al 25% en DMF durante 30 minutos para retirar los grupos protectores Fmoc. Tras el lavado con DMF y DCM, la resina se transfirió al recipiente de reacción en el sintetizador de péptidos ABI 430A® para el ensamblaje de los dos restos que faltaban.

25 Al terminar el ensamblaje de toda la cadena peptídica, la resina se trató con una solución de mercaptoetanol al 20%/DIEA al 10% en DMF durante 2 x 30 minutos para retirar el grupo DNP de la cadena lateral de la histidina. A continuación, el grupo Boc del extremo amino se retiró mediante el tratamiento con TFA al 100% durante 2 x 2 minutos. La resina con el péptido se lavó con DMF y DCM, y se secó a baja presión. La escisión final se realizó mediante la agitación de la resina unida al péptido en 10 ml de HF que contenía 1 ml de anisol y ditiotretol (50 mg) a 0 °C durante 75 minutos. El HF se retiró mediante un flujo de nitrógeno. El residuo se lavó con éter (6 x 10 ml) y se extrajo con HOAc a 4 N (6 x 10 ml).

30 Este producto bruto se purificó en una HPLC preparativa de fase inversa con una columna (4 x 43 cm) de C₁₈ DYNAMAX-100A® (Varian®, Walnut Creek, CA). La columna se eluyó con un gradiente lineal de A al 75% y B al 25% a A al 55% y B al 45% a una velocidad de flujo de 10 ml/minuto durante una hora, en donde A era TFA al 0,1% en agua y B era TFA al 0,1% en acetonitrilo. Las fracciones se recogieron y verificaron en una HPLC analítica. Las que contenían el producto puro se combinaron y se liofilizaron hasta secarlas. Se obtuvieron 31,8 mg de un sólido blanco.

35 La pureza fue del 97% basándose en el análisis de la HPLC analítica. El análisis por espectrometría de masas por ionización y electropulverización (ESI MS) dio la masa molecular de 3366,95 Da (en concordancia con la masa molecular calculada de 3367,24 Da).

Ejemplo 2**Estudios *in vitro*: Recambio de fosfoinosítidos**

Células CHO-K1, que expresan el receptor recombinante de GHS-1a de los humanos se recogieron y resuspendieron en una solución salina tamponada con fosfato que contenía glucosa a 25 mM y sacarosa a 75 mM (PBS+GS) y se incubaron previamente con 25 $\mu\text{Ci/ml}$ de $\text{mio}[^3\text{H}]\text{inositol}$ durante 60 min a 37 °C. Las células se lavaron, se resuspendieron en PBS+GS y se incubaron con LiCl (100 mM) y péptidos GHS en un volumen final de 0,30 ml. Se terminó la reacción con la adición de cloroformo/metanol (1:2) y se aislaron los fosfatos de $[^3\text{H}]\text{inositol}$ totales tal y como se describió previamente (Snider et al. *J. Neurochem.* 1986, 47: 1214-1218; véase también la figura 1).

Ejemplo 3**Estudios *in vivo*****3A) Efectos relacionados con la dosis de $[\text{Aib}^2, \text{Glu}^3(\text{NH-hexil})]\text{hGrelina}(1-28)\text{-NH}_2$ (SEQ ID n.º 2) en la secreción de la GH sobre las ratas que se mueven con libertad**

Durante el estudio, los animales se mantuvieron de acuerdo con la directrices del Ministerio Italiano de Salud para el cuidado y el uso de animales de laboratorio (*Decreto legge 116/92*). En este estudio se utilizaron ratas macho jóvenes Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*). Los animales se compraron a Harlan, Italia (S. Pietro al Natisone, Italia) y se mantuvieron en un medio con la temperatura controlada (21-23 °C) en un periodo continuo de exposición a luz:oscuridad de 12:12 horas en el que la exposición a la luz comenzaba a las 08:00 horas y terminaba a las 20:00 horas. A los animales se les proporcionó agua y alimento a voluntad que consistía en un pienso granulado estándar (Piccioni, Gessate-Milano, Italia) que contenía al menos el 3% de grasa, el 56% de glúcidos y el 19% de proteínas. El contenido calórico total fue aproximadamente de 3200 calorías/kg de pienso granulado.

Se anestesió a las ratas (200-250 g) con hidrato de cloral (500 mg/kg) y se les ajustó una cánula auricular desde la yugular derecha al menos 18 horas antes del experimento. Para determinar la concentración basal de las hormonas, se tomaron muestras de sangre con jeringuillas heparinizadas a -10 y 0 minutos de ratas que se movían con libertad y estaban totalmente conscientes. Inmediatamente tras la muestra de sangre a los 0 minutos, a las ratas se les inyectó o bien $[\text{Aib}^2, \text{Glu}^3(\text{NH-hexil})]\text{hGrelina}(1-28)\text{-NH}_2$ (SEQ ID n.º 2) o bien el vehículo (una solución salina estéril con seroalbúmina bovina al 0,25% (p/v) mediante la cánula permanente. Se tomaron posteriormente muestras de sangre aproximadamente a los 10, 20, 40 y 60 minutos de la inyección inicial. Se separó el plasma y se conservó hasta que se realizó el ensayo de la GH (véase la figura 2).

3B) Efectos de diferentes tratamientos farmacológicos sobre los parámetros de crecimiento 3B.1) Procedimiento operativo y de cuidado de los animales

Se compraron 32 ratas macho Sprague-Dawley prepúberes de aproximadamente 21 días de edad y que pesaban entre 45 y 55 g a Harlan, Italia (S. Pietro al Natisone, ITALIA). Durante el estudio, los animales se mantuvieron de acuerdo con la directrices del Ministerio Italiano de Salud para el cuidado y el uso de animales de laboratorio (*Decreto legge 116/92*). Los animales se repartieron aleatoriamente entre dos grupos de tratamiento y se mantuvieron en un medio controlado a una temperatura constante de 21 a 23° C con un periodo continuo de exposición a luz:oscuridad de 12:12 horas, en donde la exposición a la luz comenzaba a aproximadamente las 8:00 horas de la mañana y terminaba aproximadamente a las 20:00 horas. Se dio agua y alimento a los animales a voluntad, que consistía en una dieta diaria de aproximadamente 3200 calorías/kg de pienso granulado estándar proporcionado por Piccioni, Gessate-Milano, Italia (que contiene al menos el 19% de proteínas, el 3% de grasas y el 56% de glúcidos).

A partir del 23.º día (a saber, los animales tenían 23 días de edad), 16 de los animales de estudio se trataron por vía intraperitoneal (i.p.) diariamente con 40 $\mu\text{g/kg}$ de solución salina o bien de fosfato de sodio y de dexametasona (vendido con la marca comercial Decadron[®] de Merck Pharmaceuticals, West Point, Pensilvania). A partir del 30º día (a saber, los animales tenían 30 días de edad), el subgrupo de 16 animales estudiados se dividió adicionalmente en grupos de 8 y se trató por vía subcutánea tres veces al día (a aproximadamente las 9:00 de la mañana, a las 13:00 y las 17:00) con o bien 80 nmol/kg del análogo de la grelina $[\text{Aib}^2, \text{Glu}^3(\text{NH-hexil})]\text{hGrelina}(1-28)\text{-NH}_2$ (SEQ ID n.º 2) (IPSEN, Milford, Massachusetts) disuelto en una solución salina estéril con seroalbúmina bovina al 0,25%, o bien con el vehículo (solo la solución salina de seroalbúmina bovina). Se continuó con este tratamiento durante 24 días, y a lo largo de dicho tiempo, los animales estudiados se pesaron dos veces por semana. A intervalos irregulares, se midió la ingestión acumulada de alimento durante un periodo de 24 horas. A partir del día 46.º (a saber, los animales tenían 46 días de edad), se midió la longitud de los animales de control y problema desde la nariz al ano (de aquí en adelante se denominará «la longitud ano-nariz»). El día 47.º (a saber, los animales tenían 47 días de edad), dejó de darse pienso a los sujetos problema a partir de las 8:00 de la mañana. Se tomaron pequeñas muestras de sangre mediante una punción percutánea de la cola para valorar la glucemia durante el periodo de tratamiento.

Los animales problema recibieron dos administraciones subcutáneas de $[\text{Aib}^2, \text{Glu}^3(\text{NH-hexil})]\text{hGrelina}(1-28)\text{-NH}_2$ (SEQ ID n.º 2) a aproximadamente las 9:00 de la mañana y a las 13:00. Los animales estudiados se sacrificaron

mediante una decapitación rápida a aproximadamente las 14:00, se recogió sangre del tronco para determinar la concentración de las hormonas, y se retiraron y pesaron las almohadillas de grasa del plexo testicular.

3B.2) Preparación y análisis de las muestras

5 Las muestras de sangre troncal se tomaron de los sujetos problema tras la decapitación. Las muestras de sangre se recogieron en tubos que contenían EDTA, se separaron mediante centrifugación y se conservaron a -20 °C. Se midió la concentración plasmática de insulina, de IGF-1 y de corticoesterona utilizando kits comerciales de RIA (los kits de corticoesterona e insulina se obtuvieron de ICN-Biomedicals, Asse-Relegem, Bélgica y el kit problema rIGF-1 se obtuvo de Mediagnostic GmbH, Tubingen, ALEMANIA). Se determinó la concentración de glucosa utilizando el glucómetro Glucotrend® Soft Test System (Roche Diagnostics, Barcelona, España).

10 **3B.3) Cálculos y análisis estadístico**

A menos que se indique de otra manera, los resultados descritos en las figuras 3 a 6 se expresan como la media ± EEM de ocho sujetos problema replicados. Se analizaron los datos en busca de significación estadística mediante ANOVA de una sola cola, lo que determina la variación (varianza) dentro de los grupos y cómo la variación se traduce en variación (a saber, diferencias) entre los grupos, teniendo en cuenta cuántos sujetos hay en cada grupo. 15 A este análisis estadístico le siguió la prueba de la t de Dunnett o la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, que se utilizan para determinar si la media de los grupos de control diferían significativamente. El análisis de correlación lineal se realizó mediante la prueba paramétrica de Pearson o la prueba no paramétrica de Spearman. Se consideró significativo un valor de P por debajo de 0,5.

3B.4) Resultados

20 El análisis de regresión de las curvas de crecimiento mostró claramente las diferencias de aumento de peso corporal para los cuatro grupos de tratamiento (véase la tabla 1). La dexametasona redujo significativamente la masa corporal final y la longitud corporal final; [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) incrementó el crecimiento lineal en las ratas tratadas con disolución salina y revirtió la inhibición del crecimiento en las ratas 25 tratadas con dexametasona (véase la tabla 1). Los efectos inhibidores de la dexametasona sobre el crecimiento somático fueron paralelos a la disminución de la ingestión de alimento durante 24 horas, reducción de la eficacia del alimento (definida como una proporción entre el aumento de peso corporal y la ingestión de alimento medida en el mismo intervalo de tiempo) y disminución de la concentración de IGF-1 en el plasma en comparación con las ratas tratadas con el vehículo. El [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) indujo un incremento de la ingestión y la eficacia del alimento y del IGF-1 en el plasma de las ratas tratadas con solución salina, y revirtió los 30 efectos inhibidores de la dexametasona (véase la tabla 2, figura 4). Estos resultados demostraron que [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) es una opción terapéutica para revertir los efectos catabólicos inducidos por los glucocorticoides.

Tabla 1. Los efectos de diferentes tratamientos farmacológicos sobre una serie de parámetros de crecimiento.

Tratamiento	Masa corporal final (g)	Velocidad de crecimiento (g/día)	Índice de obesidad de Lee	Longitud final de la nariz al ano (cm)	Almohadillas de grasa del plexo testicular (g)
Disolución salina	211,1 ± 3,2	6,7 ± 0,3	322 ± 3,7	18,5 ± 0,2	1,23 ± 0,06
A [^]	230,8 ± 4,8*	7,6 ± 0,3**	318 ± 1,4	19,3 ± 0,1**	1,31 ± 0,07
Dexametasona	185,2 ± 4,2*	5,6 ± 0,2*	321 ± 1,6	17,8 ± 0,2*	1,14 ± 0,06
Dexametasona & A	196,1 ± 4,7	6,2 ± 0,3	317 ± 2,9	18,3 ± 2,9	1,22 ± 0,1

Todos los datos se expresan como media ± EEM de ocho animales para cada grupo experimental. * = P < 0,05; ** = P < 0,01 frente a ratas tratadas con solución salina (prueba de la t de Dunnett). A[^] = [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2).

Tabla 2. Los efectos de diferentes tratamientos farmacológicos sobre la concentración de la glucosa y de las hormonas en el plasma.

Tratamiento	Corticoesterona (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml)	Insulina (μ U/ml)	Glucosa (mg/dl)
Disolución salina	125 \pm 27	1464 \pm 112	45,7 \pm 4,1	120 \pm 4
A [^]	235 \pm 23*	1653 \pm 87*	40,4 \pm 5,7	122 \pm 3
Dexametasona	19 \pm 2***	1257 \pm 112*	50 \pm 6	107 \pm 6*
Dexametasona & A	22 \pm 3**	1375 \pm 89	63 \pm 4,9*	103 \pm 5*

Todos los datos se expresan como media \pm EEM de ocho animales para cada grupo experimental. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001 frente a las ratas tratadas con solución salina (prueba de Dunnett). A[^] = [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2).

5 Los efectos del tratamiento crónico con glucocorticoides sobre el crecimiento somático se ilustran en la figura 3 y se describen en la tabla 1. El análisis de regresión de los datos obtenidos durante el periodo de tratamiento completo demostró que todos los grupos experimentales mostraban un incremento lineal de la masa corporal frente al tiempo (P < 0,05); realmente, la pendiente de la curva de crecimiento que ofrece la velocidad de crecimiento descrita en la tabla 1 fue significativamente más baja en las ratas tratadas con dexametasona y mayor en las ratas tratadas con [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) en comparación con los animales tratados con la solución salina; el último grupo creció a una velocidad indicativa de un crecimiento normal. La velocidad de crecimiento de las ratas que reciben tanto dexametasona como [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) no difirió significativamente del valor medido en el grupo tratado con la solución salina. Se observaron efectos parecidos cuando se analizaron los grupos experimentales en función de la masa corporal final y la longitud ano-nariz final. Ninguno de los diferentes tratamientos farmacológicos alteró significativamente ni el índice de obesidad (índice de Lee) ni el peso de las almohadillas de grasa del plexo testicular (tabla 1).

La administración de dexametasona no afectó significativamente a la ingestión acumulada de alimento a las 24 horas o hasta 10 días desde el comienzo del tratamiento (datos sin mostrar). Pasado este tiempo se observó una reducción significativa de la cantidad de alimento consumido por los sujetos problema tratados con dexametasona en comparación con la cantidad consumida por los animales tratados con la solución salina; los sujetos tratados con [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) mostraron un incremento de la ingestión diaria de alimento en comparación con los animales tratados con la solución salina; el consumo de alimento para los sujetos problema que reciben tanto dexametasona como [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) no difirió significativamente de los animales tratados sólo con solución salina respecto al comportamiento de alimentación (figura 4A). Se calculó la eficacia del alimento como la proporción entre el aumento de masa corporal (en gramos) y la ingestión de alimento (en gramos) medidos durante el mismo intervalo de tiempo. Tal y como se muestra en la figura 4B, el tratamiento con dexametasona redujo significativamente la eficacia del alimento, mientras que el tratamiento con [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) incrementó la eficacia del alimento en comparación con el tratamiento con solución salina en dos de tres determinaciones; se observó que la administración de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) es capaz de revertir la disminución de la eficacia del alimento inducida por la dexametasona. Se encontró que la eficacia del alimento disminuía con la edad en todos los grupos experimentales (P < 0,05); en la tercera determinación, todos los valores tendían a un mínimo sin diferencias significativas entre los grupos experimentales. En la tabla 2 se describen los efectos de los diferentes tratamientos farmacológicos sobre la concentración de la glucosa y de las hormonas en el plasma medida en el momento de sacrificar los sujetos problema. Tal y como se esperaba, la administración crónica de dexametasona suprimió casi completamente la secreción de corticoesterona y redujo significativamente la concentración de IGF-1 en el plasma en comparación con la solución salina. El análogo de la grelina, [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), indujo un incremento bien definido de la corticoesterona en el plasma de los animales tratados con la solución salina en comparación con los tratados sólo con el vehículo, pero no pudo vencer la supresión del eje HPA debido a la retroalimentación negativa en los animales tratados con dexametasona. Los sujetos tratados con [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) mostraron una mayor concentración de IGF-1 que los animales tratados con solución salina; el [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) revirtió parcialmente la supresión del IGF-1 en los sujetos tratados con dexametasona. El tratamiento con dexametasona tendió a incrementar la concentración de insulina en el plasma, pero el efecto no alcanzó la significación estadística. La administración de [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) mantuvo inalterada la concentración de la insulina en el plasma de los animales tratados con solución salina en comparación con el vehículo; la

administración simultánea de dexametasona y [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) indujo significativamente la secreción de insulina y el incremento de la insulina en el plasma fue paralelo a una disminución de la glucemia.

5 El penúltimo día del experimento se midió la glucemia en muestras de sangre recogidas de la vena de la cola en tres momentos durante la fase de luz del ciclo diario (10:00 de la mañana, 15:00 de la tarde y 18:00 de la tarde). Todos los sujetos de los grupos experimentales eran euglicémicos con cambios menores respecto al valor medio de la glucosa en el plasma registrado en el momento de la decapitación (véase la tabla 2).

10 Se observó una correlación positiva entre la concentración de IGF-1 en el plasma y la masa corporal final, al representar en un gráfico los valores de dos colas R = 0,7125, P < 0,001; figura 5). En la figura 6 se ilustra una correlación lineal positiva entre la concentración de insulina en el plasma y la masa corporal final, lo que limita el análisis a los sujetos problema tratados simultáneamente con dexametasona y [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2) o su vehículo (N = 16, Pearson de dos colas R = 0,5848, P < 0,05). No se observó ninguna relación entre la insulina en el plasma y la masa corporal final, lo que limita el análisis a los animales tratados con solución salina (figura 4).

15 Las principales implicaciones de los resultados mostrados en este estudio preclínico es que los análogos estabilizados de la grelina pueden tener una aplicación clínica a la hora de contrarrestar el estado catabólico inducido por el tratamiento con glucocorticoides a largo plazo. La reversión de la inhibición del crecimiento por los glucocorticoides en las ratas jóvenes, tras la administración del análogo de la grelina, estuvo mediada por una estimulación de la eficacia del pienso y un incremento de la cantidad de IGF-1 en circulación, un índice de la actividad del eje somatotrópico; la correlación positiva observada entre la concentración de insulina en el plasma y la masa corporal final sugiere que la insulina también podría haber desempeñado una función clave en la mediación de los efectos anabólicos de la grelina en las ratas tratadas con dexametasona. Cabe destacar que se ha probado que la grelina *in vitro* potencia la respuesta celular a la insulina.

20 El principal inconveniente del uso de la grelina en los pacientes tratados con dexametasona podría ser el incremento de la adiposidad visceral debido al efecto adipogénico de la grelina y a la reducción de la tolerancia a la glucosa a través de la estimulación sostenida de la liberación de la GH. Los resultados descritos en la presente memoria argumentan en contra de esta hipótesis, ya que la glucemia durante la fase de luz y el peso de las almohadillas de grasa del plexo testicular, un índice de los depósitos abdominales de grasa, no difirieron significativamente entre los grupos experimentales después de tres semanas de tratamiento. Es importante observar que el presente experimento difiere de estudios anteriores que tratan sobre los efectos metabólicos y adipogénicos de la grelina en un modelo de rata, ya que el análogo de la grelina se administró a sujetos problema prepúberes. Se sabe bien que los roedores, en esta edad, crecen rápidamente con un crecimiento somático lineal; esto sugiere, pues, que los sujetos seleccionados pueden ser menos propensos a acumular masas de grasa en comparación con los sujetos problema más maduros que tienen una menor velocidad de crecimiento.

Administración

Los análogos de la grelina, en particular [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂ (SEQ ID n.º 2), se pueden formular y administrar a un sujeto que utiliza la guía dada a conocer en la presente memoria junto con técnicas bien conocidas en la técnica. La ruta preferida de administración asegura que una cantidad eficaz del compuesto alcance la diana. Las directrices para la administración farmacéutica en general se dan a conocer en, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18.^a edición, Ed. Gennaro, Mark Publishing, (1990) y en *Modern Pharmaceutics* 2.^a edición, Eds. Banker y Rhodes, Marcel Dekker, Inc., (1990), ambas incorporadas a la presente memoria por referencia.

45 Se pueden preparar análogos de la grelina como sales ácidas o básicas. Las sales farmacéuticamente aceptables (en la forma de productos dispersables o hidrosolubles o liposolubles) incluyen sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forman, p. ej., a partir de bases o ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales por adición de ácido tales como acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato; y sales básicas tales como sales de amonio, sales de metal alcalino tales como sales de sodio y potasio, sales de metal alcalinotérreo tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitclohexilamina, N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos tales como arginina y lisina.

Los análogos de la grelina se pueden administrar por vías diferentes que incluyen oral, nasal, por inyección, transdérmica y transmucosa. Los ingredientes activos que se van a administrar por vía oral como suspensión pueden prepararse de acuerdo con las técnicas conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y pueden contener celulosa microcristalina para impartir volumen, ácido alginico o alginato de sodio como agente de

suspensión, metilcelulosa como potenciador de viscosidad y edulcorantes/saborizantes. Como comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones pueden contener celulosa microcristalina, fosfato de dicalcio, almidón, estearato de magnesio y lactosa y/u otros excipientes, aglutinantes, extensores, disgregantes, diluyentes y lubricantes.

- 5 Administradas mediante inhalación o aerosol nasales, las formulaciones pueden prepararse, por ejemplo, como disoluciones en solución salina que emplean alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para estimular la biodisponibilidad, mediante el uso de fluorocarburos y/o mediante el uso de otros agentes solubilizantes o disgregantes.

- 10 Los análogos de la grelina pueden también administrarse en forma intravenosa (tanto en bolo como en infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión, o intramuscular. Cuando se administra por inyección, la solución o suspensión inyectable puede formularse con diluyentes o solventes idóneos y no tóxicos parenteralmente adecuados, tales como solución de Ringer o solución isotónica de cloruro de sodio, o agentes adecuados de disgregación o humectante y de suspensión, tales como aceites estériles, aceites no volátiles suaves, que incluyen mono- o diglicéridos sintéticos, y ácidos grasos, entre ellos ácido oleico.

- 15 Las posologías de dosificación adecuadas se determinan preferiblemente teniendo en cuenta factores bien conocidos en la técnica, incluido el tipo de sujeto a dosificar; edad, peso, sexo y afección médica del sujeto; la vía de administración; el funcionamiento renal y hepático del sujeto; el efecto deseado; y el compuesto particular empleado.

- 20 La precisión óptima para lograr concentraciones del fármaco dentro del intervalo que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del fármaco hacia sitios diana. Esto implica una consideración de la distribución, el equilibrio y la eliminación del fármaco. Se espera que la dosis diaria para un sujeto esté entre 0,01 y 1000 mg por sujeto por día.

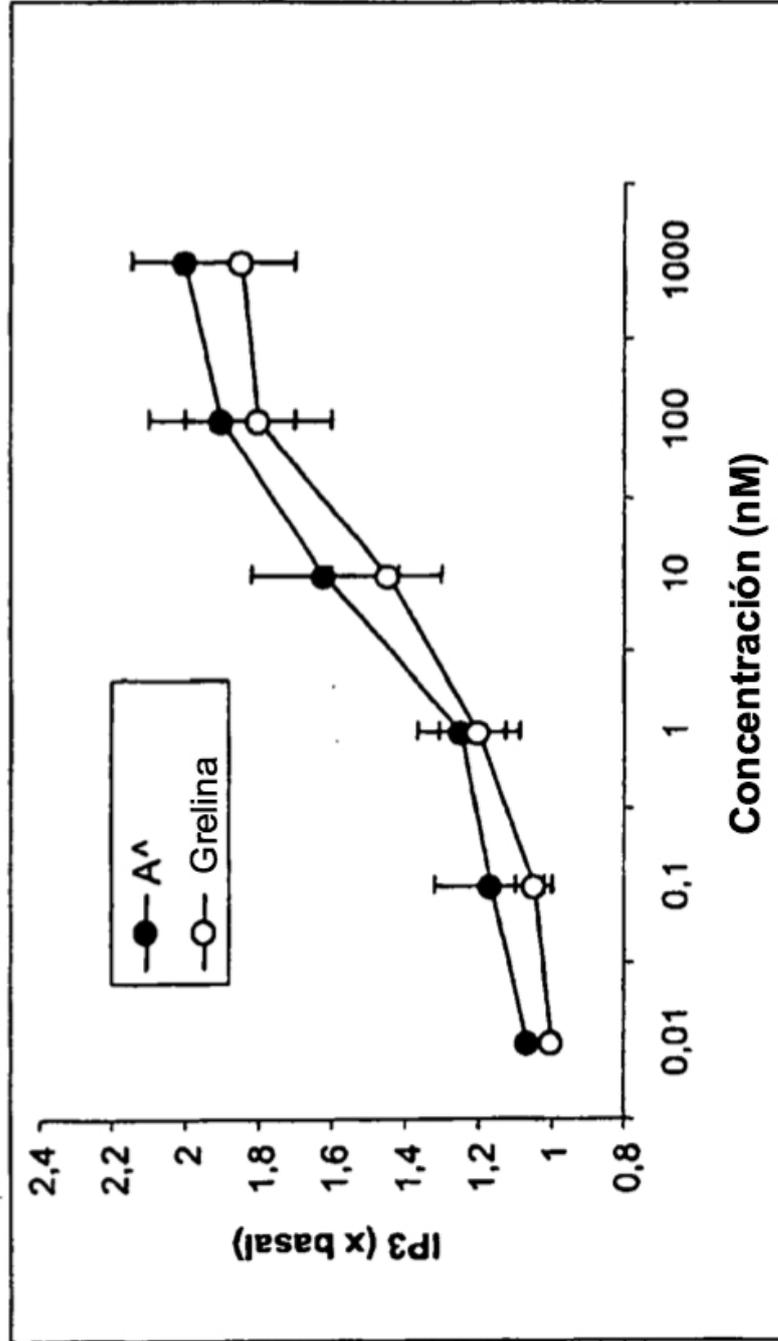
- 25 Los análogos de la grelina pueden darse a conocer en un kit. Dicho kit típicamente contiene un compuesto activo en formas farmacéuticas para la administración. Una forma farmacéutica contiene una cantidad suficiente de compuesto activo tal que puede obtenerse un efecto deseado cuando se administra a un sujeto durante intervalos regulares, tales como 1 a 6 veces por día, durante el transcurso de 1 o más días. Un kit puede contener instrucciones que indican el uso de la forma farmacéutica para lograr un efecto deseable y la cantidad de la forma farmacéutica que se debe tomar durante un periodo de tiempo especificado.

- 30 La invención se ha descrito en un modo ilustrativo, y se ha de entender que la terminología que se ha utilizado tiene como fin describir la invención, en lugar de limitarla. Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la vista de las enseñanzas anteriormente expuestas. Por lo tanto, se ha de entender que dentro del alcance de las reivindicaciones anejas, la invención puede practicarse en un modo distinto al que se describe específicamente.

REIVINDICACIONES

1. Agonista de la grelina de la fórmula $[Aib^2, Glu^3(NH\text{-}hexil)]hGrelina(1\text{-}28)\text{-}NH_2$ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso en el tratamiento de los efectos catabólicos del exceso de glucocorticoides en un individuo que sufre el síndrome de Cushing.
- 5 2. Agonista de la grelina de la fórmula $[Aib^2, Glu^3(NH\text{-}hexil)]hGrelina(1\text{-}28)\text{-}NH_2$ para el uso en el tratamiento de los efectos secundarios catabólicos en un individuo asociados a la administración a largo plazo de dosis terapéuticas de un glucocorticoide, en donde dichos efectos secundarios se seleccionan del grupo que consiste en reducción del crecimiento, reducción de la velocidad de crecimiento, reducción de la masa corporal, reducción de la masa corporal magra, reducción de la concentración de factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1) y reducción de la masa ósea.
- 10 3. Agonista de la grelina para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho glucocorticoide administrado es la dexametasona.
4. Agonista de la grelina para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichas dosis terapéuticas de glucocorticoides se administran a un niño para tratar el síndrome de dificultad respiratoria de la prematuridad y dichos efectos catabólicos de dicho tratamiento con glucocorticoides se alivian mediante la administración de dicho agonista de la grelina.
- 15 5. Agonista de la grelina para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichas cantidades terapéuticas de glucocorticoides se administran a un individuo para tratar el asma y dichos efectos catabólicos de dicho tratamiento con glucocorticoides se alivian mediante la administración de dicho agonista de la grelina.
- 20 6. Agonista de la grelina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 5, en donde dicho individuo es un adulto.
7. Agonista de la grelina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 5, en donde dicho individuo es un niño.
- 25 8. Agonista de la grelina para el uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde dicho glucocorticoide exógeno es la dexametasona.
9. Agonista de la grelina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho tratamiento comprende la administración del agonista de la grelina al individuo mediante una administración intramuscular, intranasal, intraperitoneal o intravenosa.
- 30 10. Agonista de la grelina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho tratamiento comprende la administración del agonista de la grelina al individuo mediante una administración intramuscular.
11. Agonista de la grelina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho tratamiento comprende la administración del agonista de la grelina al individuo mediante una administración intranasal.
- 35 12. Agonista de la grelina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho tratamiento comprende la administración del agonista de la grelina al individuo mediante una administración intraperitoneal.
- 40 13. Agonista de la grelina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho tratamiento comprende la administración del agonista de la grelina al individuo mediante una administración intravenosa.

Figura 1



A[^] = [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂

Figura 2

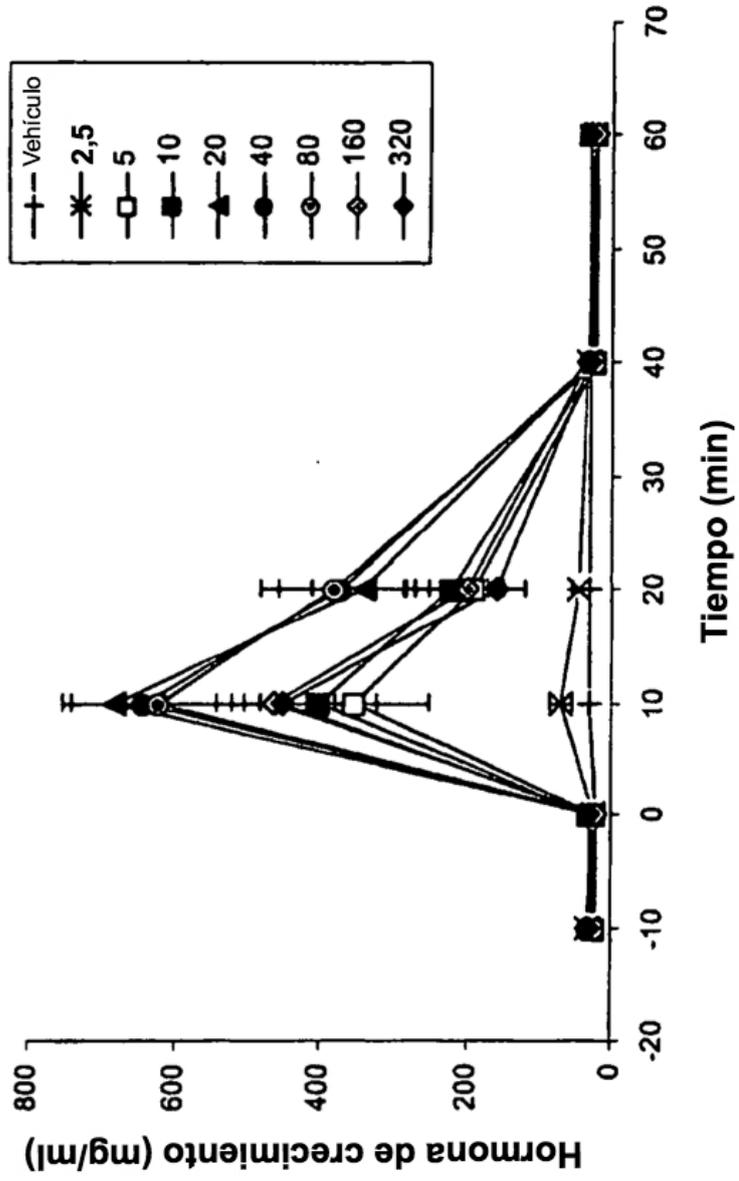
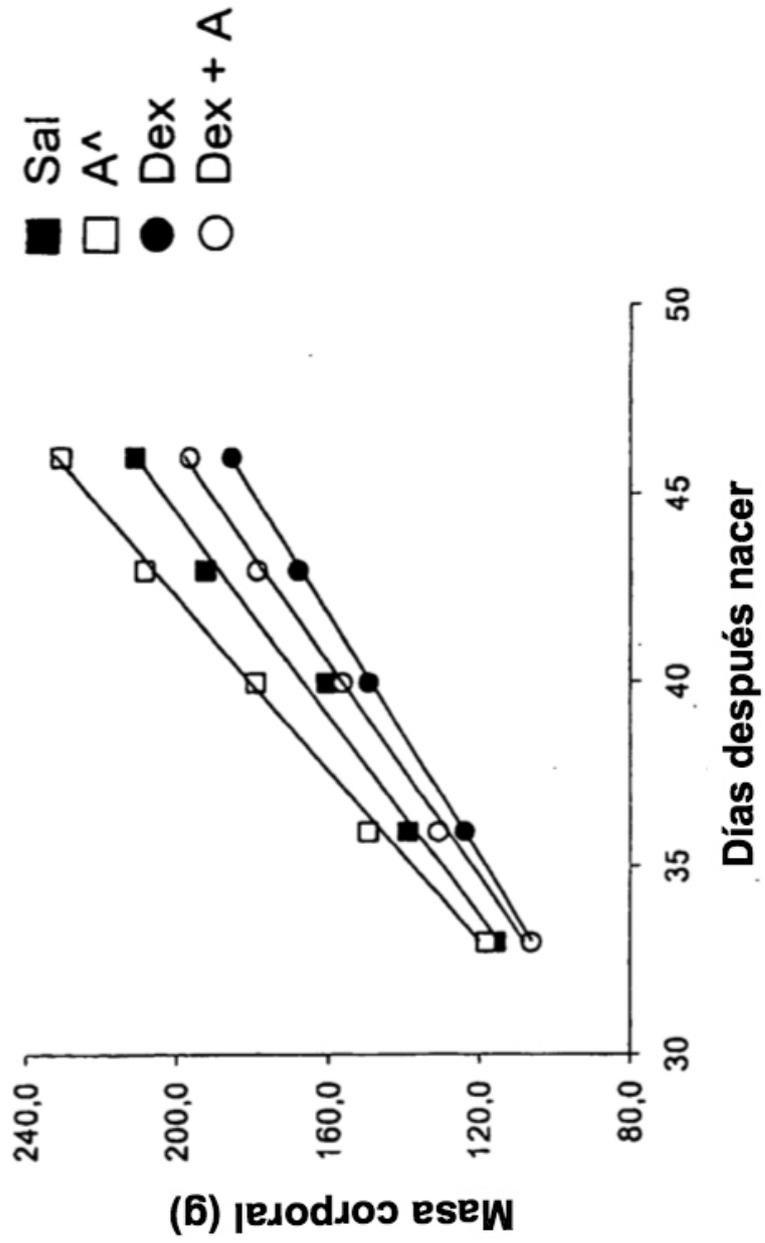
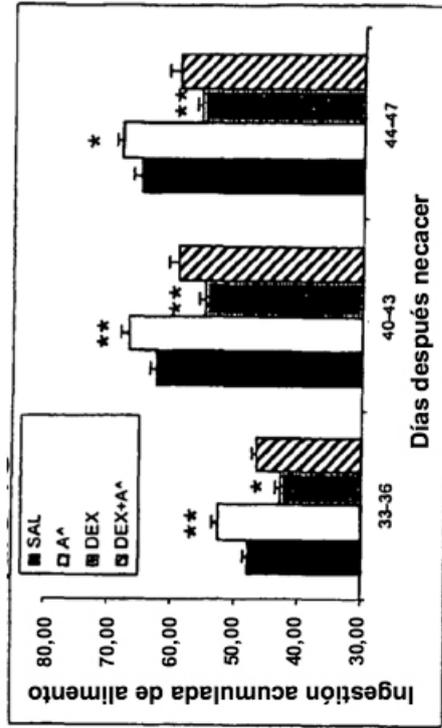


Figura 3



$\wedge A = [Aib^2, Glu^3(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH_2$

Figura 4C



A^A = [Aib², Glu³(NH-hexil)]hGrelina(1-28)-NH₂

Figura 4A

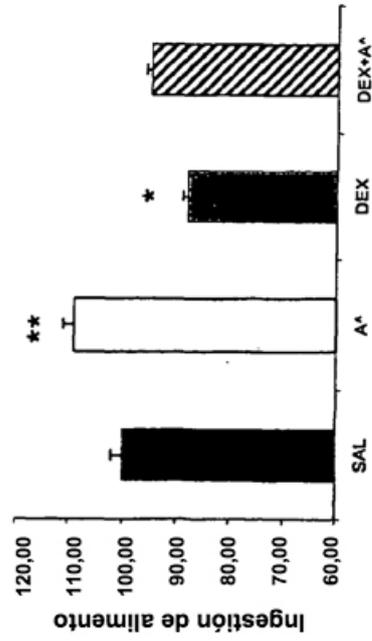


Figura 4B

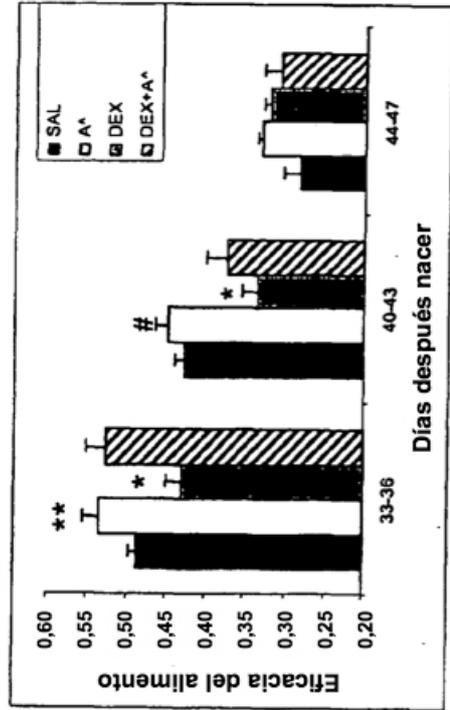


Figura 5

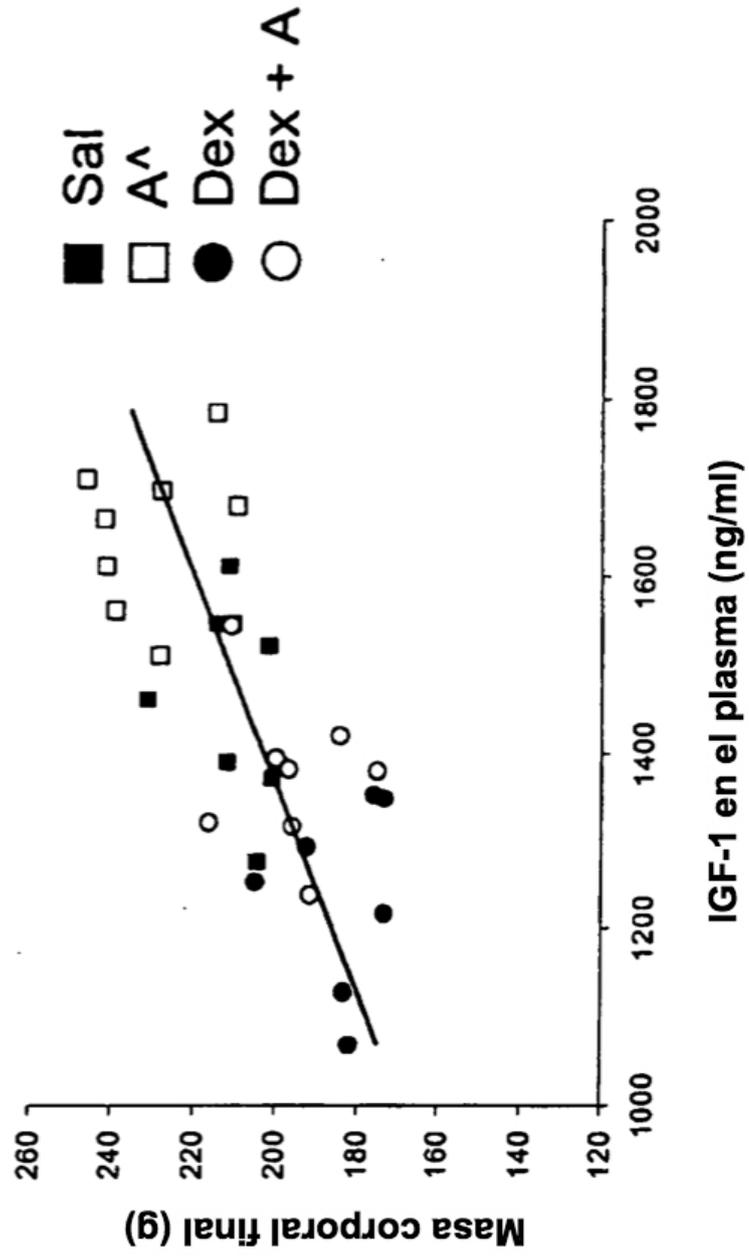


Figura 6

