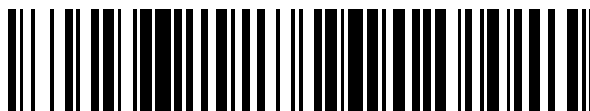


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 441**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/60 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2007 E 07711101 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 1997827**

54 Título: **Compuestos análogos a secretagogos peptídicos de la hormona del crecimiento y preparaciones que los contienen**

30 Prioridad:

28.02.2006 CU 502006

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

04.02.2014

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (100.0%)
AVENIDA 31 ENTRE 158 Y 190 CUBANACAN,
PLAYA
CIUDAD DE LA HABANA 10600, CU**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, ROLANDO
EDUARDO;
DE LA NUEZ VEULENS, ANIA;
ESTRADA GARCÍA, MARIO PABLO;
MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, REBECA;
CHINEA SANTIAGO, GLAY;
REYES ACOSTA, OSVALDO;
FERNÁNDEZ MASSÓ, JULIO RAÚL;
GARCÍA DEL BARCO HERRERA, DIANA;
BERLANGA ACOSTA, JORGE AMADOR y
MUSACCHIO LASA, ALEXIS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 441 441 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

Compuestos análogos a secretagogos peptídicos de la hormona del crecimiento y preparaciones que los contienen

Campo de la técnica

La presente invención puede describirse en el campo del diseño racional de entidades moleculares biológicamente activas que regulan la actividad metabólica y la citoprotección de los organismos. Más específicamente, sobre compuestos análogos a secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento cuya actividad incluye pero no está restringida a: la liberación controlada de la hormona de crecimiento, cardioprotección, el aumento de la respuesta funcional del sistema cardiovascular, neuroprotección, regulación y control del apetito, consumo de grasa y metabolismo energético.

Técnica anterior

Los secretagogos sintéticos de la hormona de crecimiento (GH) consisten en una familia de ligandos que incluye moléculas peptídicas y no peptídicas, siendo descritos primero por Momany y Bowers unos péptidos sintéticos de 6 y 7 aminoácidos antes de que se aislara la hormona liberadora de GH (GHRH), que resultaron ser potentes péptidos liberadores de GH (GHRP); tales péptidos se describieron antes de conocer su función en el organismo y su forma de acción. Estudios mutacionales y experimentos *in vivo* e *in vitro* revelaron que la disposición de dos aminoácidos L-D y D-L separados por un aminoácido que actúa como espaciador, se consideraba óptima para la actividad liberadora de GH, y se adaptó el péptido (His-D-Trp-Ala-D-Trp-Phe-NH₂) para la liberación de GH a una concentración de 10 a 30 ng/ml llegando a un péptido conocido como GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) en el que el resto de Lys se necesitaba solamente para mejorar la actividad *in vivo* porque no se consideraba funcional *in vitro* (Momany F.A., Bowers C.Y., y col. (1981) Design, synthesis and biological activity of peptides which release growth hormone, *in vitro*. *Endocrinology*, 108: 31-39).

Se han descubierto otros péptidos análogos; en 1993 Bowers y col., descubrieron dos péptidos análogos de GHRP-6, el GHRP-2 (D-Ala-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) y el GHRP-1 (Ala-His-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂). Estos tres secretagogos mostraron una mayor liberación de GH *in vitro* a partir de hipófisis-hipotálamo incubados, que a partir de glándula hipofisaria sola, demostrando que el impulso hipotalámico era importante para tal acción, también se demostró, incluso en seres humanos, que la acción sinérgica de GHRP y GHRH liberaba más GH que cualquiera de los dos por separado (Bowers C.Y. (1993) GH-releasing peptides: structure and kinetics. *J Pediatr Endocrinol*, 6 (1): 21-31).

A partir del péptido denominado GHRP-2 se obtuvieron nuevos péptidos cíclicos, cambiando el D-Ala del extremo N por un aminoácido que tenía la cadena lateral unida a otro aminoácido insertado entre D-Phe y Lys. Uno de tales péptidos (D-Lys-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Glu-Lys-NH₂) resultó tener una actividad *in vitro* 10 veces mayor y una eficacia *in vivo* comparable a GHRP-6 (McDowell R.S., y col. (1995) Growth hormone secretagogues: characterization, efficacy, and minimal bioactive conformation. *PNAS USA*, 92 (24): 11165-11169). Se completaron los estudios con estudios estructurales en solución de péptidos cíclicos DL llegando a la conclusión de que la introducción de aminoácidos D en los compuestos peptídicos se necesitaba esencialmente para conseguir la actividad que se deseaba. Otras investigaciones se dirigieron a encontrar moléculas activas con una biodisponibilidad oral aumentada y tiempos más largos de aclaramiento, dando lugar al descubrimiento de nuevos GHRP y otras moléculas no peptídicas. En 1993, se describió el primer secretagogo GH no peptídico (Smith R.G., y col. (1993) A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science*, 260: 1640-43), y más tarde se comunicó la síntesis de un GHS no peptídico y más potente, el MK-0677, que tiene una alta biodisponibilidad y es capaz de estimular la secreción de GH 24 horas después de una única dosis por administración oral (Patchett A.A., Nargund R.P., y col. (1995) Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *PNAS USA*, 92: 7001-7005; Smith R.G., Van der Ploeg L.H., y col. (1997) Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.*, 18: 621-645). Más recientemente se diseñó otro GHS peptidomimético con una actividad de liberación de GH selectiva y potente (EP1572) que muestra una potencia de unión al receptor secretagogo GH (GHS-R) en tejidos humanos y animales similar a la de la Grelina y a GHS peptídicos induciendo un aumento importante en la GH tras la administración subcutánea a ratas recién nacidas (Broglia F., Boutignon F., y col. (2002) EP1572: a novel peptide-mimetic GH secretagogue with potent and selective GH-releasing activity in man. *J Endocrinol Invest*, 25: RC26-RC28).

En 1999 se descubrió la grelina como un péptido de 28 aminoácidos que se producía principalmente en el estómago, aunque también se encontraba su ARNm en diferentes tejidos. En el estómago, la producen las células X/A que son las células con mayor población de células endocrinas en la mucosa oxíntica. Se encontró también grelina en el núcleo arcuato hipotalámico donde está presente su ARN en las neuronas NPY y AGRP, implicadas en el control del apetito y el equilibrio energético (Kojima M., Hosoda H., y col. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402:656-60; Nakazato M., Murakami N., y col. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409:194-198). Su ARN también se ha encontrado en el páncreas y el intestino. Circula en el torrente sanguíneo de seres humanos adultos a una concentración de 100-120 fmol/ml, sugiriendo que se segrega por las células del estómago y puede actuar por una ruta endocrina. La producción de grelina también se ha informado en tejidos neoplásicos (Takaya K., Ariyasu H., y col. (2000) Ghrelin strongly

stimulates growth hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85:4908-11; Papotti M., y col. (2001) Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endoc. Metab.*, 86:4984-4990).

- 5 Otros estudios en animales demostraron que la secreción de grelina es pulsátil y está más asociada al apetito en los pulsos de GH (Tolle V., Bassant M.H., y col. (2002) Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behaviour, and sleep wake patterns in rats. *Endocrinology*, 143:1353-1361).

La grelina es la primera hormona natural que se ha encontrado que tiene un grupo hidroxilo de una de las serinas acilado con ácido octanoico. Esta modificación se ha descrito como esencial para la unión al GHS-R 1a, así como para la capacidad de liberación de GH, y probablemente otras acciones endocrinas.

- 10 La grelina no acilada circula en cantidades mayores que la acilada, aunque no se le ha descrito una acción endocrina directa, se considera que actúa en otras funciones no endocrinas como los efectos cardiovasculares, cardioprotectores, antiproliferativos, y citoprotectores en general, probablemente mediados por la unión con otros subtipos de GHS-R (Matsumoto M., Hosoda H., y col. (2001) Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 287:142-146; Hosoda H., Kojima M., y col. (2000) Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 279:909-913; Cassoni P., Papotti M., y col. (2001) Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1738-1745).

- 20 Hay otro ligando endógeno para GHS-R 1a que se puede aislar de la mucosa endocrina del estómago, des-Gln14-grelina que resulta de un proceso alternativo del gen de la grelina que pierde la Gln14 y como grelina experimenta el mismo proceso de acilación en Ser3.

- 25 Los estudios que se han hecho con varios análogos de la grelina tienen el tercer resto modificado con varios grupos alifáticos o aromáticos y varios péptidos cortos derivados de la cadena lateral de grelina demostraron que los grupos hidrofóbicos en el resto 3 son esenciales para la actividad. También se ha observado que los segmentos cortos que contienen los cinco primeros restos de la grelina son capaces de activar el receptor con una eficacia comparable al péptido completo. Los tetrapéptidos se mostraron menos potentes y los fragmentos que carecen de extremo N son incapaces de activar el receptor (Bednarek M.A., Feighner S.D., y col. (2000) Structure-Function Studies on the New Growth Hormone-Releasing Peptide, Ghrelin: Minimal Sequence of Ghrelin Necessary for Activation of Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *J Med Chem*, 43: 4370-4376; Silva Elipe M.V., Bednarek M.A., y col. (2001) 1H NMR structural analysis of human ghrelin and its six truncated analogs. *Biopolymers*, 59: 489-501). Tales estudios sugieren que la secuencia de la grelina completa no es esencial para la actividad y que el fragmento Gly-Ser-Ser (n-octanil)-Phe es el activo en la actividad como agonista de GHS-R 1a.

- 35 Antes y después del descubrimiento de la grelina se hizo un gran esfuerzo para encontrar moléculas pequeñas y derivados que pudieran ser ligandos del GHS-R y un número importante de patentes describen moléculas de este tipo (Patentes de Estados Unidos: US 3.239.345; 4.036.979; 4.411.890; 5.492.916; 5.494.919; 5.559.128; 5.663.171; 5.721.250; 5.721.251; 5.723.616; 5.726.319; 5.767.124; 5.798.337; 5.830.433; 5.919.777; 6.034.216; 6.548.501; 6.559.150; 6.576.686; 6.686.359; Patentes Internacionales: WO 89/07110; 89/07111; 92/07578; 93/04081; 94/11012; 94/13696; 94/19367; 95/11029; 95/13069; 95/14666; 95/17422; 95/17423; 95/34311; 96/02530; 96/15148; 96/22996; 96/22997; 96/24580; 96/24587; 96/32943; 96/33189; 96/35713; 96/38471; 97/00894; 97/06803; 97/07117; 97/09060; 97/11697; 97/15191; 97/15573; 97/21730; 97/22004; 97/22367; 97/22620; 97/23508; 97/24369; 97/34604; 97/36873; 97/38709; 97/40023; 97/40071; 97/41878; 97/41879; 97/43278; 97/44042; 97/46252; 98/03473; 98/10653; 98/18815; 98/22124; 98/46569; 98/51687; 98/58947; 98/58948; 98/58949; 98/58950; 99/08697; 99/09991; 99/36431; 99/39730; 99/45029; 99/58501; 99/64456; 99/65486, 99/65488, 00/01726; 00/10975; 01/47558; 01/92292; 01/96300; 01/97831) (Carpino, P. (2002) Recent developments in ghrelin receptor (GHS-R 1a) agonists and antagonists *Exp. Opin. Ther. Patents* 12:1599-1618). Después de tan extensa revisión se han descrito otros compuestos como antagonistas del GHS-R (US 2005288316 y WO 2005048916) y se describen también otros que se unen al GHS-R y que se utilizan para varios propósitos (WO 2005046682; WO 2005039625; JP 2003335752; US 2004009984; US 2003130284; WO 03004518). Más recientemente se ha añadido al grupo una nueva serie de compuestos macrocíclicos con el propósito principal de ser agonistas de GHS-R sin provocar la liberación de GH (US 2006025566). El GHS-R es un receptor acoplado a proteínas G de clase A, expresado en seres humanos por un único gen en el locus cromosómico 3q26.2. Se identificaron dos tipos de ADNc como resultado del proceso alternativo del pre-ARNm (McKee K.K., Tan C.P., y col. (1997) Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics*, 46:426-434; McKee K.K., Palyha O.C., y col. (1997) Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol*, 11: 415-423; US 6.242.199; WO 97/21730). El ADNc 1a codifica un receptor de 366 aminoácidos con siete segmentos transmembrana (GHS-R 1a). El ADNc 1b codifica una proteína más corta (GHS-R 1b) que tiene 289 aminoácidos y cinco fragmentos transmembrana. Aunque el papel de GHS-R 1b hasta ahora no se conoce, se ha probado su expresión en varios tejidos endocrinos y no endocrinos (Howard A.D., Feighner S.D., y col. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273:974-917; Gnanapavan S., Kola B., y col. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:2988; Smith R.G., Leonard R., y col. (2001)

Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine*, 14:9-14).

El GHS-R 1a tiene una identidad del 96 y el 93% con el de la rata y el cerdo respectivamente, y se ha mostrado una estrecha relación entre la secuencia del GHS-R humano y el de los peces teleosteos. Tales hallazgos sugieren que el GHS-R 1a se ha conservado entre las especies altamente y probablemente ejerce una función biológica esencial. (Palyha O.C., Feighner S.D., y col. (2000) Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from pufferfish to humans. *Mol Endocrinol.* 14:160-169).

La unión de la grelina y el GHS sintético al GHS-R 1a activa la ruta de señalización de la fosfolipasa C, aumentando la concentración de inositol-1,4,5 trifosfato (IP3), y la activación de la proteína quinasa C (PKC), seguida por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. La activación de GHS-R también inhibe los canales de K^+ , permitiendo el ingreso de Ca^{2+} a través de los canales activados por voltaje tipo L pero no por los del tipo T. A diferencia del GHS-R 1a, el GHS-R 1b no se une ni responde al GHS y su función aún se desconoce (Chen C., Wu D., y col. (1996) Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol.* 148: 381-386; Casanueva F.F., Dieguez C. (1999) Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol.* 20: 317-363; Howard A.D., Feighner S.D., y col. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273: 974-977).

El GHS sintético, la grelina y su isoforma natural (des-Gln14-grelina) se unen con alta afinidad al GHS-R 1a, y la eficacia del desplazamiento de [^{35}S] MK-0677 o [^{125}I] [Tyr 4] grelina se corresponde con la concentración que se necesita para estimular la liberación de GH (Muccioli G., Papotti M., y col. (2001) Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest.* 24: RC7-RC9; Hosoda H., Kojima M., y col. (2000) Purification and characterization of rat des-Gln14-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, 275: 21995-22000).

Para determinar las características estructurales esenciales de la grelina para la unión y la activación de GHS-R 1a, se estudiaron péptidos cortos de grelina en células HEK-293, que expresaban GHS-R 1a humano observando que 4 o 5 aminoácidos del extremo N de péptidos de grelina eran capaces de activar el receptor. Basándose en estos resultados *in vitro* se postuló que Gly-Ser-Ser (n-octanil)-Phe se necesitaba esencialmente para la activación del receptor (Van der Lely A.J., Tschop M., y col. (2004) Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *Endocrine Reviews*, 25 (3): 426-457). Los primeros 7 aminoácidos de la grelina se conservan entre todas las especies estudiadas, sin embargo la capacidad de los derivados de la grelina para estimular el GHS-R 1a en células transfectadas no parece que signifique una indicación de la capacidad para estimular la liberación de GH en las células somatotropas, recientemente se ha demostrado que (1-4) y (1-8) octanil grelina no son capaces de estimular la liberación de GH en ratas y no hubo un desplazamiento eficaz de [^{125}I] [Tyr 4] grelina del sitio de unión en preparaciones de membranas de hipófisis humana o hipotalámicas (Torsello A., Ghe C., y col. (2002) Short ghrelin peptides neither displace ghrelin binding *in vitro* nor stimulate GH release *in vivo*. *Endocrinology*, 143: 1968-1971). Otro estudio en las mismas células que expresan GHS-R 1a humano o porcino encontró que la adenosina también activaba el receptor, pero como los análogos cortos de la grelina no puede estimular la secreción de GH, sugiriendo que la adenosina es un agonista parcial de GHS-R 1a en sitios de unión distintos en el receptor que MK-0677 o GHRP-6 (Smith R.G., Griffin P.R., y col. (2000) Adenosine: a partial agonist of the growth hormone secretagogue receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 276: 1306-1313). Más recientemente se ha informado que el GHS-R 1a también se puede unir a la cortistatina (CST), un neuropéptido análogo de la somatostatina (SS) que no es capaz por sí misma de reconocer al GHS-R 1a (Deghenghi R., Papotti M., y col. (2001) Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest.* 24: RC1-RC3). El GHS-R 1a se expresa en el núcleo arcuato y en las células somatotropas de la hipófisis, zonas cruciales para las actividades neuroendocrinas y de estimulación del apetito de la grelina y los GHS sintéticos (Willesen M.G., Kristensen P., Romer J. (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, 70: 306-316; Bluet-Pajot M.T., Tolle V., y col. (2001) Growth hormone secretagogues and hypothalamic networks. *Endocrine*, 14: 1-8; Shintani M., Ogawa Y., y col. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*, 50: 227-232). La grelina y los GHS sintéticos estimulan la expresión de los marcadores de actividad neuronal (*c-fos* y *EGR-1*) en las neuronas del núcleo arcuato. Se ha detectado un ARNm de GHS-R 1a en áreas extrahipotalámicas como el giro dentado y las regiones CA 2 y CA 3 del hipocampo, la sustancia nigra pars compacta, y el área tegmental ventral, núcleos de Raphe dorsal y medial, núcleos de Edinger-Westphal, puente y bulbo raquídeo, lo que indica posibles acciones extrahipotalámicas. También se ha encontrado ARNm en varios órganos periféricos como el estómago, el intestino, páncreas, riñón, corazón, aorta, varios adenomas humanos y algunas neoplasias humanas de pulmón, estómago y páncreas. (Hewson A.K., Dickson S.L. (2000) Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol.* 12: 1047-1049; Muccioli G., Ghe y col. (1998) Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland. *J Endocrinol.* 157: 99-106; Guan X.M., Yu H., y col. (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res.* 48: 23-29; Mori K., Yoshimoto y col. (2000) Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett.* 486: 213-216; Nagaya N., Miyatake K., y col. (2001) Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusión in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 5854-5859; Korbonits M., Bustin S.A., y col. (2001) The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other

neuroendocrine tumours. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 881-887; Papotti M., Cassoni P., y col. (2001) Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5052-5059). La grelina y GHS tienen afinidad alta por el GHS-R 1a. Sin embargo hay pruebas de otros sitios adicionales para GHS. Los sitios específicos para Tyr-Ala-hexarelina y otros GHS con una densidad de receptor similar, al menos igual a la densidad encontrada en la hipófisis, se ha encontrado en corazón humano y de rata y muchos otros tejidos periféricos no endocrinos tales como: pulmones, arterias, músculos esqueléticos, riñón, e hígado (Muccioli G., Ghe C., y col. (1998) Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland. *J Endocrinol*, 157: 99-106; Muccioli G., Broglio F., y col. (2000) Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. *Ann Endocrinol (Paris)*, 61: 27-31; Bodart V., Bouchard J.F., y col. (1999) Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res*, 85: 796-802; Katugampola S., Davenport A. (2003) Emerging roles for orphan G protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*, 24: 30-35; Ghigo E., Arvat E., y col. (2001) Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans. *Endocrine*, 14: 87-93; Papotti M., Ghe C., Cassoni P., y col. (2000) Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 3803-3807). Tales sitios de unión mostraron baja afinidad por la grelina y probablemente no son receptores de grelina sino receptores de péptidos análogos a la grelina. El GHS-R cardíaco tiene un peso molecular (84 kDa) mayor que el del GHS-R 1a y no hay homología en sus secuencias, la secuencia predicha de aminoácidos para el receptor en el corazón es similar al CD36 (Papotti M., Ghe C., y col. (2000) Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 3803-3807; Bodart V., Febbraio M., y col. (2002) CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, 90: 844-849). El significado funcional de los receptores GHS de tejidos periféricos y los hallazgos en el sistema cardiovascular sugieren que tales sitios de unión modulan las actividades cardioprotectoras de los GHS peptídicos. La grelina y otros secretagogos sintéticos estimulan la liberación de GH por las células somatotropas *in vitro* probablemente por despolarización de membrana y por el incremento de la GH segregada por las células, informándose también de un efecto estimulante del GHS sobre la síntesis de GH (Kojima M., Hosoda H., y col. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656-660; Sartor O., Bowers C.Y., Chang D. (1985) Parallel studies of His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ and human pancreatic growth hormone releasing factor-44-NH₂ in rat primary pituitary cell monolayer culture. *Endocrinology*, 116: 952-957; Bowers C.Y., Sartor A.O., y col. (1991) On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*, 128: 2027-2035; Wu D., Chen C., y col. (1994) The effect of GH-releasing peptide-2 (GHRP-2 or KP 102) on GH secretion from primary cultured ovine pituitary cells can be abolished by a specific GH-releasing factor (GRF) receptor antagonist. *J Endocrinol*, 140: R9-R13;).

Estudios anteriores mostraron que GHS estimula la secreción de GH utilizando un receptor y ruta diferentes que la GHRH. Un antagonista del receptor GHRH inhibe la secreción de GH producida por la GHRH, pero no la liberación de GHRH estimulada por secretagogos y un supuesto antagonista GHS-R no afecta a la liberación de GH en respuesta a la GHRH. En los ensayos de unión al receptor, el GHRP-6 no compite con la GHRH por los sitios de unión de la GHRH, existe un efecto aditivo sobre la liberación de GH en la coadministración de GHS y GHRH, y no hay insensibilización cruzada entre GHRH y GHS en términos de liberación de GH (Wu D., Chen C., y col. (1994) The effect of GH-releasing peptide-2 (GHRP-2 or KP102) on GH secretion from primary cultured ovine pituitary cells can be abolished by a specific GH-releasing factor (GRF) receptor antagonist. *J Endocrinol*, 140:R9-13; Thorner M.O., Hartman M.L., y col. (1994) Current status of therapy with growth hormone-releasing neuropeptides. Savage MO, Bourguignon J, Grossman AB (eds). *Frontiers in Paediatric Neuroendocrinology*, 161-167).

La actividad de liberación de GH es mayor en las preparaciones de hipófisis-hipotálamo que en las de hipófisis aislada, de acuerdo con la evidencia de los mayores efectos estimulantes de GH *in vivo* (Mazza E., Ghigo E., y col. (1989) Effect of the potentiation of cholinergic activity on the variability in individual GH response to GH-releasing hormone. *J Endocrinol Invest*, 12:795-798; Bowers C.Y., Sartor A.O., y col. (1991) On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*, 128:2027-2035; Clark R.G., Carlsson M.S., y col. (1989) The effects of a growth hormone-releasing peptide and growth hormone releasing factor in conscious and anaesthetized rats. *J Neuroendocrinol*, 1: 249-255).

A nivel hipotalámico, la grelina y los GHS actúan sobre las neuronas secretoras de GHRH y se ha observado el aumento de los niveles de GHRH en la circulación portal hipofisaria después de la administración de GHS en ovejas (Conley L.K., Teik J.A., y col. (1995) Mechanism of action of hexarelin and GHRP-6: analysis of the involvement of GHRH and somatostatin in the rat. *Neuroendocrinology*, 61: 44-50; Guillaume V., Magnan E., y col. (1994) Growth hormone (GH)-releasing hormone secretion is stimulated by a new GH-releasing hexapeptide in sheep. *Endocrinology*, 135: 1073-1076).

El GHS necesita GHRH para expresar completamente su efecto liberador de GH, en humanos la respuesta de GH se inhibe por los antagonistas del receptor de GHRH, y por desconexión hipotálamo-hipofisaria (Bluet-Pajot M.T., Tolle V., y col. (2001) Growth hormone secretagogues and hypothalamic networks. *Endocrine*, 14: 1-8; 148: 371-380; Popovic V., Miljic D., y col. (2003) Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 3450-3453). Los pacientes con una deficiencia en el receptor GHRH no muestran un aumento de la secreción de GH en respuesta a la estimulación por GHS pero mantienen la capacidad para aumentar el cortisol, ACTH y PRL tras la estimulación con GHS (Maheshwari H.G., Pezzoli S.S., y col. (2002) Pulsatile growth hormone secretion persists in genetic growth hormone-releasing hormone resistance. *Am*

J Physiol Endocrinol Metab, 282: E943-E951; Maheshwari H.G., Rahim A., y col. (1999) Selective lack of growth hormone (GH) response to the GH-releasing peptide hexarelin in patients with GH-releasing hormone receptor deficiency. J Clin Endocrinol Metab, 84: 956-959; Gondo R.G., Aguiar-Oliveira M.H., Hayashida C.Y., y col. (2001) Growth hormone-releasing peptide-2 stimulates GH secretion in GH-deficient patients with mutated GH-releasing hormone receptor. J Clin Endocrinol Metab, 86: 3279-3283). En los animales y los seres humanos hay evidencias de que GHS y GHRH inducen insensibilización homóloga pero no heteróloga, se ha demostrado actividad de insensibilización homóloga de GHS durante la infusión de GHS, pero no en la administración vía oral o nasal diaria intermitente del péptido durante más de 15 días (Ghigo E., Arvat E., y col. (1994) Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man. J Clin Endocrinol Metab, 78: 693-698; Ghigo E., Arvat E., y col. (1996) Short-term administration of intranasal or oral hexarelin, a synthetic hexapeptide, does not desensitize the growth hormone responsiveness in human aging. Eur J Endocrinol, 135: 407-412). Por otra parte la administración vía parenteral, intranasal y oral de GHS aumenta el pulso espontáneo de GH y sube los niveles de IGF-I en adultos jóvenes sanos, como en niños y en sujetos de edad avanzada (Chapman I.M., Bach M.A., y col. (1996) Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of a GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects. J Clin Endocrinol Metab, 81: 4249-4257; Copinschi G., Van Onderbergen A., y col. (1996) Effects of a 7-day treatment with a novel, orally active, growth hormone (GH) secretagogue, MK-0677, on 24-hour GH profiles, insulin-like growth factor I, and adrenocortical function in normal young men. J Clin Endocrinol Metab, 81: 2776-2782; Laron Z., Frenkel J., y col. (1995) Intranasal administration of the GHRP hexarelin accelerates growth in short children. Clin Endocrinol (Oxf), 43: 631-635).

La grelina es capaz de estimular el apetito en ratas y esta propiedad podría estar mediada por la síntesis de NPY y AGRP. La grelina intraventricular también es capaz de anular los efectos anorexígenos de la leptina, y se ha postulado que existe una interacción competitiva entre estos dos péptidos sobre el apetito y el control de la homeostasia energética. Las concentraciones circulantes de grelina en la rata aumentan en el ayuno y son menores tras la alimentación o la ingestión de glucosa (Shintani M., Ogawa Y., y col. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. Diabetes, 50: 227-32; Nakazato M., Murakami N., y col. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature, 409 (6817): 194-198; Tschöp M., Smiley D.L., Heiman M.L. (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature, 407: 908-13).

El GHS también estimula el apetito y la ganancia de peso. El tratamiento crónico con GHRP-2 estimula la acumulación de tejido adiposo en ratones deficientes de NPY e incrementa la expresión hipotalámica de ARNm AGRP en los controles (Torsello, A., Luoni, M., y col. (1998) Novel hexarelin analogs stimulate feeding in the rat through a mechanism not involving growth hormone release. Eur. J. Pharmacol, 360:123-129; Ghigo, E., Arvat, E., y col. (1999) Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans. Horm. Res, 51:9-15; Tschop, M., Statnick, y col. (2002) GHreleasing peptide-2 increases fat mass in mice lacking NPY: indication for a crucial mediating role of hypothalamic agoutirelated protein. Endocrinology, 143:558-568).

La administración de grelina a ratas produce la ganancia de apetito y peso por un aumento significativo del tejido adiposo sin que se observen cambios en la masa magra, tejido óseo o estimulación en el crecimiento. El efecto lipogénico de la grelina es independiente de la acción de la GH, y se puede encontrar en ratas genéticamente deficientes en GH. La GH produce un incremento del gasto de energía y produce la eliminación de la grasa, permitiendo por un equilibrio con la grelina, en el que la grelina aumenta el tejido graso y la GH no permite un descenso en el tejido magro (Nakazato M., Murakami N., y col. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature, 409 (6817): 194-198; Wren A.M., Small C.J., y col. (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. Endocrinology, 141 (11): 4325-4328; Tschop M., Smiley D.L., Heiman M.L. (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature, 407: 980-913).

En individuos obesos los niveles de grelina están empobrecidos y no descienden después de la alimentación, esto es una condición reversible, porque con la pérdida de peso, los niveles medios de grelina en plasma se incrementan. Los niveles de grelina en el plasma se correlacionan negativamente con el índice de peso corporal, el peso en grasa corporal, el tamaño de los depósitos grasos y los niveles plasmáticos de insulina, glucosa y leptina (English P.J., Ghatei M.A., y col. (2002) Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. J Clin Endocrinol Metab, 87 (6): 2984; Tschop M., Weyer C., y col. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. Diabetes, 50 (4): 707-9).

Se ha informado que la insuficiencia de GH en pacientes obesos es reversible después de una dieta prolongada y una marcada pérdida de peso. El aumento crónico de ácidos grasos libres e hiperinsulinismo asociados con niveles bajos de grelina puede tener un papel importante produciendo insuficiencia de GH en la obesidad (Maccario M., Tassone F., Grottoli S., Rossetto R., Gauna C., Ghigo E. (2002) Neuroendocrine and metabolic determinants of the adaptation of GH/IGF-I axis to obesity. Ann Endocrinol (Paris), 63 (2 Pt 1): 140-144).

Como se ha encontrado que la grelina es adipogénica y orexígena, se puede pensar en antagonizarla para el tratamiento de la obesidad, sin embargo las consecuencias de tal antagonismo bajan la secreción de GH y se asocian con el aumento de la masa grasa (Jorgensen J.O., Vahl N., (1996) Influence of growth hormone and androgens on body composition in adults. Horm Res, 45:94-98). La administración a largo plazo de agonistas o

antagonistas de la grelina revelarán cuál de estos dos efectos es dominante y determinará su influencia sobre el equilibrio energético.

En el hombre obeso las concentraciones circulantes de grelina están disminuidas y se correlacionan negativamente con el tejido adiposo corporal y los niveles de insulina y leptina (Tschöp M., Weyer C., y col. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 50:707-9).

El eje GH/IGF-I tiene un papel muy importante durante el desarrollo cardíaco y para el mantenimiento de la estructura y la función del corazón; el deterioro de la función cardiovascular es uno de los síntomas de deficiencia de GH que puede revertirse con una terapia con GH (Sacca L, Cittadini A, Fazio S (1994) Growth hormone and the heart. *Endocr Rev* 15: 555-573; Caidahl K, Eden S, Bengtsson BÅ 1994 Cardiovascular and renal effects of growth hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40: 393-400).

Hay datos experimentales que muestran una mejoría de la función del músculo cardíaco debido a la GH, entre ellos muchos estudios que utilizan un modelo de infarto de miocardio (IM) en ratas, el tratamiento con GH tras un IM dio como resultado un aumento del volumen de eyección sistólico, el gasto cardíaco y otras variables sistólicas, junto con una vasodilatación pronunciada y una disminución de la resistencia periférica total debido a GH/IGF-I, probablemente contribuyendo a mejorar la contractilidad miocárdica (Timsit J, Riou B, y col. 1990 Effects of chronic growth hormone hypersecretion on intrinsic contractility, energetics, isomyosin pattern and myosin adenosine triphosphate activity of rat left ventricle. *J Clin Invest* 86:507-515; Tajima M, y col. (1999) Treatment with growth hormone enhances contractile reserve and intracellular calcium transients in myocytes from rats with post infarction heart failure. *Circulation* 99: 127-134).

Por otro lado, los modelos animales con exceso de GH muestran un cambio a una isoforma de miosina con una actividad adenosín trifosfatasa baja, lo que puede disminuir la demanda de energía en el proceso de la contracción (Timsit J, Riou B, y col. (1990) Effects of chronic growth hormone hypersecretion on intrinsic contractility, energetics, isomyosin pattern and myosin adenosine triphosphate activity of rat left ventricle. *J Clin Invest* 86:507-515).

Hay varios estudios de los efectos cardíacos y periféricos de la GH y/o IGF-I, entre ellos datos clínicos buenos que apuntan a un papel en el futuro de GH/IGF-I en la terapia cardiovascular (Fazio S., Sabatini D., y col. (1996) A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 334:809-814).

Varios GHS sintéticos y la grelina tienen propiedades cardioprotectoras en varios estudios *in vivo* mejorando varias variables de la función cardíaca, que tienen un efecto comparable con las de la GH. La similitud del perfil hemodinámico de la hexarelina con el de la GH podría sugerir que la acción de los GHS está mediada por la GH, sin embargo estudios recientes apoyan una acción directa sobre el corazón (Locatelli V., Rossoni G., (1999) Growth Hormone independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology*, 140:4024-4031; Tivesten Å., Bollano E., (2000) The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology*, 141:60-66).

El ARNm GHS-R 1a se ha encontrado en aorta y corazón, y también está aumentado en cultivos de cardiomiocitos tras la preincubación con hexarelina (Gnanapavan S., Kola B., y col. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2988-2991; Nagoya N., Kojima M., y col. (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280: R1483-R1487; Pang J.-J., Xu R.-K., y col. (2004) Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286 (3): H1063-1069).

Los sitios de unión específicos de la grelina se han identificado en el corazón de rata y en arterias humanas, en las que la densidad de receptores está aumentada en aterosclerosis y se encontraron GHS peptídicos marcados radioactivamente unidos específicamente a las células miocárdicas de rata y varios tejidos cardiovasculares humanos (ventrículo, aurícula, aorta, coronarias, carótida, endocardio y vena cava), en mayores cantidades que en la hipófisis (Katugampola S.D. (2001) [125I-His (9)]-ghrelin, a novel radioligand for localising GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 134: 143-149; Ong H., McNicoll N., y col. (1998) Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photo affinity labeling. *Endocrinology*, 139: 432-435; Bodart V., McNicoll N., y col. (1999) Identification and characterization of a new GHRP receptor in the heart. *Circ Res*, 85: 796-808; Papotti M., Ghe C., y col. (2000) Growth hormone secretagogue binding site in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 3803-3807).

Aunque la administración de altas dosis farmacológicas de GHS peptídico inducen una vasoconstricción clara pero transitoria en el corazón perfundido de ratas al utilizar ratas jóvenes con deficiencia de GH inducida por inmunización con GHR, se ha encontrado también que la hexarelina puede proteger contra la lesión miocárdica inducida por la isquemia y reperfusión, tal actividad protectora se ha asociado a la liberación de prostaciclina y la recuperación de la actividad vasopresora de la Angiotensina II (Bodart V., Febbario M., y col. (2000) CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, 90:844-849; de Gennaro Colonna V., Rossoni G., y col. (1997) Hexarelin, a growth hormone-releasing peptide, discloses protectant activity against cardiovascular damage in rats with isolated growth hormone deficiency. *Cardiologia*, 42:1165-1172; de Gennaro Colonna V., y col. (1997) Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient

rats: protection by hexarelin. Eur J Pharmacol, 334: 201-207). Se han obtenido resultados similares en ratas viejas en las que el tratamiento con hexarelina dio como resultado una fuerte protección contra la disfunción ventricular post-isquémica. Se observó la recuperación completa de la función cardíaca con la reperfusión y la reducción simultánea de los niveles de la creatinquinasa corroboró la integridad de las membranas cardíacas y la protección de la debilidad contráctil a continuación de la readmisión de oxígeno. El efecto protector de la hexarelina también se demostró por la producción de 6-keto-PGF1a y la restauración de la reactividad vascular coronaria a la Angiotensina II (Rossoni G., de Gennaro Colonna V., y col. (1998) Protectant activity of hexarelin or growth hormone against post ischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. J Cardiovasc Pharmacol, 32:260-265; Rossoni G., de Gennaro Colonna V., y col. (1998) Protectant activity of hexarelin or growth hormone against post ischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. J Cardiovasc Pharmacol, 32:260-265; Locatelli V., Rossoni G., y col. (1999) Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. Endocrinology, 140:4024-4031). Estudios en ratas hipofisectomizadas mostraron los efectos cardioprotectores de GHS, independientes de la GH y mediados por receptores miocárdicos específicos (Locatelli V., Rossoni G., y col. (1999) Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. Endocrinology, 140:4024-4031; Bodart V., McNicoll N., y col. (1999) Identification and characterization of a new GHRP receptor in the heart. Circ Res, 85:796-808).

La hexarelina aumenta el volumen de eyección sistólico y el gasto cardíaco, y reduce la resistencia periférica total en un modelo de rata de 4 semanas tras la inducción de infarto de miocardio. Aunque el mecanismo de la actividad inotrópica de los GHS sintéticos no está claro, hay pruebas del aumento de la contractilidad de los músculos papilares por acción sobre las células endoteliales o las terminaciones nerviosas (Tivesten A., Bollano y col. (2000) The growth hormone secretagogue Hexarelin improve cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. Endocrinology, 141: 60-66; Bedendi I., Gallo M.P., y col. (2001) Role of endothelial cells in modulation of contractility induced by hexarelin in rat ventricle. Life Sci, 69: 2189-2201).

La grelina no comparte todas las acciones cardiovasculares de los GHS sintéticos, la grelina da una protección pobre al corazón, sugiriendo que los efectos de los GHS sintéticos se deben a la unión y la activación de sitios específicos GHS. Estudios con [¹²⁵I] Tyr-Ala-hexarelina revelaron muchos sitios de unión en el miocardio de rata y en tejidos cardiovasculares humanos distintos de GHS-R 1a, sugiriendo la existencia de otro receptor, con una secuencia similar a CD36 que interviene en las acciones coronarias de los GHS sintéticos (Torsello A., Bresciani E., y col. (2003) Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. Endocrinology, 144: 1787-1792; Muccioli G., Broglio F., y col. (2000) Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. Ann Endocrinol (Paris) 61: 27-31; Bodart V., Febbraio M., y col. (2002) CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. Circ Res, 90: 844-849). Aunque la grelina es en su mayor parte inactiva a nivel coronario, presenta otros efectos cardiovasculares. La grelina tiene un efecto vasodilatador muy potente tanto *in vitro* como *in vivo*, tal acción de la grelina se dirige hacia los músculos no estriados con una potencia comparable a los péptidos natriuréticos. En los pacientes humanos con aterosclerosis los receptores de la grelina están aumentados sugiriendo que tiene un papel en la compensación del aumento de la vasoconstricción que se observa en dicha afección (Okumura H., Nagaya N., y col. (2002) Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. J Cardiovasc Pharmacol, 39: 779-783; Wiley K.E., Davenport A.P. (2002) Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. Br. J. Pharmacol, 136: 1146-1152; Katugampola S.D. (2001) [125IHis (9)]-ghrelin, a novel radioligand for localising GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis. Br J Pharmacol, 134: 143-149).

Otros estudios mostraron que la hexarelina, grelina acilada e incluso la grelina pueden prevenir la muerte celular de los cardiomiocitos H9c2 y células endoteliales inducida por la doxorubicina, probablemente estimulando la señalización intracelular como la activación de ERK 1/2 Y PI 3-quinasa/AKT (Baldanzi G., Filigheddu N., y col. (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. J Cell Biol, 159:1029-1037; Filigheddu N., Fubini A., y col. (2001) Hexarelin protects H9c2 cardiomyocytes from doxorubicin-induced cell death. Endocrine, 14: 113-119).

Estudios *in vivo* sobre cardiomiocitos y células endoteliales sugieren que los efectos antiapoptóticos de GHS están mediados por la activación de ERK y AKT y por la inhibición de la activación de la caspasa 3 y la expresión de BAX, aumentando la expresión de BCL-2 (Pang J.J., Xu R.K., y col. (2004) Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis *in vitro*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 286:H1063-H1069). Tales datos refuerzan la hipótesis de la existencia de otro subtipo de GHS-R, porque la grelina no acilada no activa el GHS-R 1a.

La grelina y GHS además tienen actividad cardiovascular en seres humanos, su administración a voluntarios sanos y pacientes con fallo cardíaco crónico redujo la resistencia vascular sistémica e incrementó el gasto cardíaco y el volumen de eyección sistólico, con una reducción de la presión arterial media pero sin mostrar cambio alguno en el ritmo cardíaco, la presión en la arteria pulmonar medial o la presión capilar pulmonar (Nagaya N., Kojima M., y col. (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 280: R1483-R1487; Enomoto M., Nagaya N., y col. (2003) Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans. Clin Sci (Lond), 105:431-435).

También se ha observado que varios factores tróficos, que incluyen la GH e IGF-I tienen propiedades

neuroprotectoras durante la segunda fase de la isquemia hipóxica (IH) *in vivo* y se ha demostrado que la activación de la ruta PI3K con la fosforilación de AKT es el mediador de la tasa de supervivencia neuronal *in vivo* inducida por los factores de crecimiento, la AKT fosforilada favorece la supervivencia celular y puede inhibir la apoptosis por inactivación de varias dianas antiapoptóticas como Bad, glucógeno sintetasa 3 beta (GSK3 β), caspasa 9 o factor de modificación de la transcripción (Kulik G., Klippel A., Weber M.J. (1997). Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol*, 17:1595-1606). Otra ruta activada por los factores de crecimiento es MAPK p42/44 ERK. Se ha encontrado que la activación de ERK inhibe la apoptosis inducida por hipoxia, además la neuroprotección por BDNF en ratas recién nacidas ha mostrado que está mediada por la activación de MAPK/ERK y el tratamiento con IGF-I después de la IH activa AKT y ERK (Buckley S., Driscoll B., y col. (1999) ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *Am J Physiol*, 277:159-166; Han B.H., Holtzman D.M. (2000) BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury *in vivo* via the ERK pathway. *J Neurosci*, 20:5775-5781).

La hexarelina reduce el daño cerebral en modelos *in vivo* de IH. Esta protección se relaciona con la fosforilación de AKT y GSK3 β indicando la posibilidad de la participación de la ruta PI3K, observando su efecto protector sobre la corteza, el hipocampo, el tálamo, pero no sobre el cuerpo estriado, la distribución espacial de la protección se correlaciona con la localización de los receptores GH y hexarelina (Brywe K.G., Leverin A.-L., y col. (2005) Growth Hormone Releasing Peptide Hexarelin reduces neonatal brain injury and alters Akt/Glycogen Synthase Kinase-3 β phosphorylation. *Endocrinology*, 146: 4665-4672; Lobi e P.E., García-Aragón J., y col. (1993) Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Dev Brain Res*, 74:225-233; Scheepens A., Sirimanne E.S., y col. (2001) Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience*, 104:677-687). Tales hallazgos sugieren que el efecto protector de la hexarelina podría estar mediado por la GH o bien la GH y la hexarelina comparten rutas comunes para la protección celular porque el ARNm GHS-R se ha encontrado en varias estructuras cerebrales. La administración de GHRP-6 a ratas adultas bajo condiciones fisiológicas muestra un aumento de los niveles de IGF-I en el hipotálamo, hipocampo, pero no en el córtex, aunque esto podría ser por aumento en la expresión de IGF-I, el mismo efecto no se encuentra en ratas tratadas con hexarelina 24 horas después de la IH, por otra parte si IGF-I fuera un mediador importante de los efectos de hexarelina se podría esperar una reducción de la lesión cerebral en el cuerpo estriado, ya que los receptores de IGF-I están presentes ahí (Frago L.M., Paneda C., Dickson S.L., y col. (2002) Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signalling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology*, 143:4113-4122; Guan J., Williams C., y col. (1993) The effects of IGF-1 treatment after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13:609-616). La hexarelina también activa la ruta PI3K en el sistema nervioso central (SNC) después de la IH pero esto no afecta la fosforilación de ERK, por el contrario IGF-I activa las rutas tanto ERK como PI3K.

La hexarelina aumenta la fosforilación del receptor IGF-I en ausencia de una inducción obvia de IGF-I, el aumento de fosforilación podría deberse a una transactivación de receptor por la hexarelina o un ligando endógeno. Previamente se ha informado de que agonistas de GPCR como la angiotensina II, trombina, y endotelina pueden estimular la IGF-I y/o AKT (Sumitomo M., Milowsky M.I., y col. (2001) Neutral endopeptidase inhibits neuropeptide-mediated transactivation of the insulin-like growth factor receptor-Akt cell survival pathway. *Cancer Res*, 61:3294-3298; Zahradka P., Litchie B., y col. (2004) Transactivation of the insulin-like growth factor-I receptor by angiotensin II mediates downstream signalling from the angiotensin II type 1 receptor to phosphatidylinositol 3-kinase. *Endocrinology*, 145:2978-2987).

El efecto neuroprotector de la hexarelina no parece que esté mediado primariamente por una inducción del eje GH/IGF-I, podría contribuir a la reducción de la lesión cerebral a través de una señalización aumentada sobre el receptor IGF-I.

Descripción detallada de la invención

A pesar del extenso trabajo en este campo, descrito en el estado de la técnica, es evidente sin embargo que todos los compuestos miméticos de la grelina y aquellos de naturaleza no peptídica no son capaces de ejercer todas las posibles funciones atribuidas a la grelina en el organismo, es preferible la utilización de compuestos de naturaleza peptídica, que tengan una similitud estructural mayor. La descripción de tales análogos peptídicos se reduce sin embargo al uso de aminoácidos de estereoquímica D no naturales como parte de las composiciones.

Teniendo en cuenta la importancia de los secretagogos peptídicos en las funciones descritas anteriormente y la capacidad de tales compuestos sobre funciones endocrinas y no endocrinas en una gran variedad de organismos, sistemas y células, la presente invención describe, en efecto por primera vez moléculas químicas de naturaleza peptídica, con ciclos internos y compuestos únicamente por aminoácidos con una estereoquímica L por el carbono quiral, capaces de ejercer debido a su estructura química, funciones similares a las atribuidas a la grelina, des-acil grelina y otros GHS peptídicos, incluyendo pero sin limitarse a estas, la capacidad de liberar GH, cardioprotección y mejor funcionalidad en general del músculo cardíaco y del sistema reticuloendotelial, neuroprotección que no solamente incluye el cerebro sino todas las células del sistema nervioso, y el control y regulación del apetito incluyendo la regulación de la grasa y del metabolismo energético.

Los compuestos químicos peptídicos descritos en la invención tienen una estructura que les permita cumplir los

requisitos de unión a los receptores específicos de la grelina y al mismo tiempo a los receptores descritos que se unen a otros secretagogos llevando a cabo todas las funciones mencionadas anteriormente.

La invención se refiere a moléculas químicas que tienen la siguiente estructura:

5	A221 GSKFD <u>S</u> PEHQ	(SEC. ID N°:1)
	A222 HGSKF <u>D</u> LEFG	(SEC. ID N°: 2)
	A223 HCKF <u>D</u> LDWH	(SEC. ID N°: 3)
	A224 SSDF <u>K</u> LYWG	(SEC. ID N°: 4)
	A225 AL <u>D</u> FKPNIP	(SEC. ID N°: 5)
	A226 ST <u>D</u> FKPFAI	(SEC. ID N°: 6)
10	A227 HSKG <u>Y</u> DLDH	(SEC. ID N°: 7)
	A228 GKFG <u>D</u> LSPHQ	(SEC. ID N°: 8)
	A229 HAK <u>P</u> GGI <u>D</u> PEQ	(SEC. ID N°: 9)
	A230 GK <u>F</u> DSPHQ	(SEC. ID N°: 10)
	A231 GGGK <u>F</u> WDI <u>P</u> HH	(SEC. ID N°: 11)
15	A232 HKG <u>I</u> DSP <u>E</u> QH	(SEC. ID N°: 12)
	A233 GK <u>F</u> DSPHQ	(SEC. ID N°: 13)
	A234 GDAGAK <u>L</u> SSR	(SEC. ID N°: 14)
	A235 GMEAG <u>I</u> KLCHRQ	(SEC. ID N°: 15)
	A236 GEGY <u>K</u> LDERSQ	(SEC. ID N°: 16)
20	A237 GGEAG <u>K</u> LCPPRY	(SEC. ID N°: 17)
	A238 GLE <u>F</u> KLLHQ	(SEC. ID N°: 18)

En la que los aminoácidos subrayados están unidos a cadenas laterales.

25 Las moléculas mencionadas anteriormente se definieron por su función junto con el modelado molecular exhaustivo del receptor humano de la grelina utilizando técnicas combinadas de modelo homólogo, dinámicas moleculares y técnicas exhaustivas de búsqueda conformacional.

Una vez que se modeló el receptor, los modelos de unión se construyeron basándose en el modelo de grelina y otros secretagogos, basándose en las interacciones receptor-ligando se construyó una biblioteca virtual con varios miles de estructuras que tenían tales características para llevar a cabo un análisis conformacional, y se llevó a cabo un experimento de unión masiva contra el modelo de receptor.

30 Basándose en estos análisis se seleccionaron una serie de compuestos que representaban varias familias estructurales que se sintetizaron químicamente y se ensayaron con varios sistemas *in vivo* e *in vitro*, tras los ensayos biológicos los compuestos se reoptimizaron y se generaron nuevas bibliotecas y se repitió el análisis estructural para buscar una mayor acción sobre los sistemas biológicos, que tuvieran más regularidades estructurales específicas.

35 La invención también incluye cualquier variante homóloga de los compuestos mencionados anteriormente. Se entiende como "variante homóloga" cualquier molécula de naturaleza química similar en un 70% o más de la secuencia de aminoácidos de los descritos en la presente invención (página 21), incluyendo aminoácidos no naturales, con una estructura que les permita llevar a cabo los mismos efectos que los compuestos descritos en el presente documento.

40 En otra realización preferida de la invención, la composición farmacéutica contiene uno o más de los compuestos descritos o sus sales permitidas, junto con un aditivo aceptable o vehículos con fines de su aplicación. También es parte de la presente invención, el uso de los compuestos para fabricar medicamentos, suplementos nutricionales u otras formulaciones de uso humano y animal, en acuicultura y otras actividades de fomento y cría animal, *in vivo*, *in vitro*, en dispositivos asociados al cuerpo o en dispositivos de liberación controlada en el medio, asociados por
45 acción similar a otros GHS, relacionada directamente o no con su acción endocrina.

Las moléculas descritas en el presente documento se definieron por la capacidad de interactuar con el receptor humano de la grelina, pero no se pueden descartar otras proteínas que no teniendo una estructura similar o secuencia de aminoácidos, tengan la capacidad de unirse a este tipo de compuestos y afecten de alguna manera a su acción biológica sea por activación, potenciación, represión, competición o sinergia con otros sustratos, o por
50 cualquier otro mecanismo, descrito o no y que esté experimentalmente documentado.

Para la definición de los compuestos químicos descritos en la invención, se llevó a cabo el modelo molecular del receptor de la grelina humana, utilizando técnicas combinadas de modelo de homología, dinámicas moleculares y técnicas exhaustivas de búsqueda conformacional. Una vez que se modeló el receptor, los modelos de unión se
55 construyeron basándose en el modelo de la grelina y otros secretagogos, basándose en las interacciones receptor-ligando, se construyó una biblioteca con varios miles de estructuras que tenían tales características para llevar a cabo un análisis conformacional, y se llevó a cabo un experimento masivo de unión contra el modelo de receptor.

Basándose en estos análisis se seleccionaron una serie de compuestos que representaban varias familias

estructurales y que se sintetizaron químicamente y se ensayaron en varios sistemas *in vivo* e *in vitro*, después de los ensayos biológicos los compuestos se re-optimizaron y se generaron nuevas bibliotecas y se repitió el análisis estructural con otra ronda de unión molecular con el receptor para extraer las regularidades estructurales. La naturaleza química de la segunda ronda se optimizó para alcanzar valores más altos de energía calculada de unión, variando entre -58 y -32 KJ/mol y analizando de nuevo para buscar una mayor acción sobre los sistemas biológicos, teniendo más regularidades estructurales específicas. Una selección representativa de 18 de tales compuestos con energías de unión mejores de -40 KJ/mol, se sintetizaron, se purificaron utilizando cromatografía líquida de altas prestaciones, se analizaron por espectrometría de masas y se evaluaron en cuanto a su eficacia *in vivo* e *in vitro*.

Descripción de las figuras

- 10 **Figura 1:** Efectos del tratamiento con los compuestos A221 (a), A228 (b) y A233 (c) en la prevención del fallo miocárdico inducido por doxorubicina (Dx).
Figura 2: Efecto protector de los compuestos A221 (a), A228 (b) y A233 (c) sobre el estrés forzado en ratas tratadas con Dx.
15 **Figura 3:** Efecto del tratamiento con los compuestos A221 (a), A228 (b) y A233 (c) en el momento y reversión de la cardiomiopatía dilatada inducida por la Doxorubicina en grupos tratados con dosis que variaban desde 100 a 500 µg/kg de peso del animal.
Figura 4: Efecto del tratamiento los compuestos A221 (a), A228 (b) y A233 (c) en la supervivencia de los animales con cardiomiopatía dilatada inducida por doxorubicina (Dx).

Ejemplos

- 20 La presente invención se explica en los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: Selección de los compuestos por modelado molecular *in silico*

Los compuestos obtenidos en el segundo ciclo de la evaluación computarizada, como se describe anteriormente, se optimizaron para obtener mejores valores de energía y regularidades más específicas sobre la unión al receptor, se seleccionaron 18 compuestos representativos con energías mejores de -40 KJ/mol como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Energía de interacción calculada de la interacción con el modelo de Receptor Secretagogo de la Hormona de Crecimiento después de la unión molecular

Compuesto	Energía (KJ/mol)	Compuesto	Energía (KJ/mol)
A221	-52,54	A230	-56,27
A222	-49,80	A231	-42,32
A223	-43,76	A232	-50,30
A224	-42,93	A233	-58,06
A225	-54,99	A234	-53,14
A226	-40,00	A235	-45,94
A227	-41,01	A236	-45,20
A228	-40,93	A237	-50,01
A229	-52,25	A238	-51,11

- 25 Ejemplo 2: Prevención de muerte inducida por privación de NGF en células PC12
- Se almacenaron células PC12 en matraces de cultivo de 75 cm² en DMEM que contenía suero fetal bovino al 5% y suero de caballo al 10%, con 50 µg/ml de gentamicina. Las células se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5%. Para inducir la diferenciación las células se transfirieron cuando se llegó a una densidad de 1x10⁴ a placas de 96 pocillos cubiertas de polilisina en un medio DMEM suplementado con NGF durante 7 días, reemplazando el medio cada 2-3 días. Después de la diferenciación las células se incubaron con compuestos análogos de GHS peptídicos, a diferentes concentraciones durante 72 h. Se determinó la supervivencia celular y la proliferación utilizando el ensayo de proliferación no radiactivo de citotoxicidad de Promega, Cell Titer 96, que se basa en la conversión de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en un producto detectable espectrofotométricamente. Después de la privación de NGF el medio se elimina y se añaden 15 µl del colorante disuelto en DMEM, tras 4 h de incubación a 37 °C se añaden 100 µl de solución de parada y se mide la absorbancia a 570 nm.

Los compuestos mostraron un efecto neuroprotector dependiente de la concentración, la CI50 de cada uno de los compuestos se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de la CI50 de cada uno de los compuestos durante la muerte neuronal inducida por privación de NGF.

Compuesto	CI50 uM	Compuesto	CI50 uM
A221	2,02	A230	4,06
A222	2,03	A231	4,00

(continuación)

Compuesto	CI50 uM	Compuesto	CI50 uM
A223	3,12	A232	4,89
A224	2,37	A233	5,00
A225	4,07	A234	5,86
A226	4,87	A235	2,05
A227	3,06	A236	3,00
A228	3,99	A237	3,33
A229	3,41	A238	2,04

Ejemplo 3: Prevención del daño neuronal inducido por adición de Peróxido de Hidrógeno al cultivo primario de neuronas.

- 5 Se obtuvieron cultivos de células granulosas del cerebelo a partir de ratas Wistar de 7-9 días. Después de una disección rápida, los cerebelos de rata se sumergieron en una solución fría y se eliminaron las membranas meníngeas, cada órgano se transfirió a una solución de 2-3 ml de medio recién preparado y se cortaron en finas láminas. Las células se disociaron utilizando una pipeta Pasteur y se filtraron a través de una membrana de nylon de 40 μM (Falcon, Franklin Lakes, N.J.). Se determinó el número de células viables por recuento en un hemocitómetro con azul tripán como marcador. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos cubiertas con polilisina a una densidad de 6.250 células en 200 ml de volumen final. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5%. Tras 24 h, se añadió citosin arabinofuranosa (AraC; Sigma) 10 μM para inhibir la proliferación de células no neuronales.

- 15 La capacidad de prevención del daño neuronal se ensayó añadiendo peróxido de hidrógeno 500 μM en diferentes concentraciones de compuestos análogos de GHS peptídico. La supervivencia celular se determinó utilizando el ensayo de proliferación no radioactivo de citotoxicidad de Promega, Cell Titer 96 (Promega).

Los compuestos mostraron un efecto de neuroprotección dependiente de la concentración. La CI50 para cada uno de los compuestos se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de la CI50 de cada uno de los compuestos durante el daño neuronal inducido por la adición de Peróxido de Hidrógeno a un cultivo primario de neuronas.

Compuesto	CI50 uM	Compuesto	CI50 uM
A221	1,80	A230	3,81
A222	1,30	A231	3,46
A223	2,47	A232	3,28
A224	3,20	A233	3,56
A225	3,99	A234	3,72
A226	3,58	A235	1,01
A227	2,26	A236	3,33
A228	1,77	A237	2,51
A229	1,33	A238	1,00

- 20 Ejemplo 4: Demostración de la actividad biológica de los compuestos análogos de GHS peptídico en peces.

Se determinó el ARNm de IGF-I en el hígado de tilapias inyectadas por vía intraperitoneal controlando también al mismo tiempo la evolución del nivel de GH, mostrando los compuestos análogos del GHS peptídico que eran capaces de estimular los niveles de GH en el torrente sanguíneo en los peces y aumentar los niveles de ARNm de IGF-I tras la inyección de los compuestos como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Niveles de ARNm de IGF-I normalizados con un grupo control de péptidos sintéticos no relacionado.

Compuesto	IGF1	Compuesto	IGF1
A221	1,32	A230	1,48
A222	1,115	A231	1,39
A223	1,40	A232	1,23
A224	1,41	A233	1,69
A225	1,38	A234	1,17
A226	1,13	A235	0,9
A227	1,28	A236	1,13
A228	1,18	A237	1,201
A229	1,09	A238	1,24

25

Ejemplo 5: Experimento en tilapia joven tratada con compuestos análogos de GHS peptídico:

5.1 Aceleración del crecimiento en tilapias tratadas por vía intraperitoneal (ip) con compuestos análogos de GHS Peptídico.

5 Los compuestos se disolvieron en una solución de tampón de fosfato sódico (PBS) se inyectaron dos veces a la semana durante tres semanas a 0,1 µg/g de peso de pescado húmedo (gbw). Los compuestos se aplicaron individualmente a un grupo de 10 tilapias macho con una media de peso de 60,41±10,36 g y un grupo control con un peso medio de 60,58±19,67 g recibieron solamente PBS como control, calculando la media de peso cada semana. Todos los animales del experimento se marcaron con microchips (Stoelting Co. Wood Dale, EE.UU.) para identificarlos adecuadamente. Se obtuvo un incremento de peso en el grupo tratado con un pico del 165% con respecto al grupo control como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Incremento de peso en % del grupo tratado tomando como 100% el crecimiento del grupo de control.

Compuesto	Inc. peso (%)	Compuesto	Inc. peso (%)
A221	98,0	A230	158,0
A222	96,2	A231	150,2
A223	105,0	A232	160,1
A224	132,7	A233	165,0
A225	120,0	A234	110,6
A226	122,4	A235	89,9
A227	139,9	A236	99,0
A228	130,6	A237	100,0
A229	126,5	A238	129,4

En el mismo experimento estudiamos la presencia de monogéneos, Tricodínicos y Helmintos en los animales utilizados en el ensayo para observar y comparar la extensión de la invasión de agentes patógenos en el grupo tratado. La tabla 6 muestra la comparación con los animales no tratados que mostraron seis cruces de media.

Tabla 6. Extensión de infecciones patógenas por Tricodínicos y Helmintos en animales tratados.

Compuesto	Patógenos	Compuesto	Patógenos
A221	+++++	A230	++
A222	++++	A231	++
A223	++++	A232	++
A224	++++	A233	++
A225	++++	A234	+++
A226	+++	A235	+++
A227	++++	A236	++++
A228	+++	A237	+++
A229	+++	A238	+++

15 **5.2 Estimulación por inmersión del crecimiento de larvas de tilapia (*Oreochromis sp.*) con los análogos de GHS peptídico.**

20 Los experimentos de crecimiento de larvas de tilapia *Oreochromis sp.* se llevaron a cabo evaluando grupos de 100 larvas con una media de 0,01 g, utilizando los análogos de GHS peptídico, en una concentración de 100 µg/l, dos veces por semana utilizando un tiempo de inmersión de una hora. En el curso de tres semanas se obtuvo un máximo de estimulación del crecimiento del 155% de peso medio como se muestra en la tabla 7, con respecto al grupo control que recibió inmersiones en PBS.

Tabla 7. Incremento de peso en % del grupo tratado tomando como 100% el crecimiento del grupo de control.

Compuesto	Inc. peso (%)	Compuesto	Inc. peso (%)
A221	97,0	A230	150,0
A222	96,0	A231	151,0
A223	102,0	A232	148,3
A224	130,0	A233	155,0
A225	98,0	A234	120,6
A226	120,4	A235	90,0
A227	140,6	A236	105,0
A228	132,0	A237	109,9
A229	125,0	A238	112,6

Durante este experimento se controlaron también los niveles de lisozima y se obtuvo un aumento en este marcador de inmunidad en los animales tratados como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Niveles de lisozima de los animales tratados con respecto al grupo de control.

Compuesto	Lisozima	Compuesto	Lisozima
A221	1,01	A230	1,33
A222	1,43	A231	1,89
A223	1,52	A232	2,41
A224	1,37	A233	2,68
A225	1,43	A234	2,77
A226	1,17	A235	1,90
A227	1,52	A236	1,42
A228	1,08	A237	1,01
A229	1,15	A238	1,33

5 Ejemplo 6: Crecimiento de camarones v *Litopenaeus vannamei* por inmersión en una solución de análogos de GHS peptídico.

Las larvas de camarón se sometieron a dos cuatro inmersiones, durante una hora cada tres días con diferentes análogos de GHS peptídico a 0,1 g/l. El grupo de control se sometió a la misma frecuencia de inmersión con 1 mg/l de BSA.

10 Como resultado se observó que en el grupo tratado la calidad de las larvas mejoró con un 120-150% de ganancia de peso y un 10-25% de aumento de tamaño como se muestra en la tabla 9, mostrando también un mayor número de ramificaciones branquiales y modificaciones rostrales. Además se encontró que en general en el grupo tratado los animales tenían menor contenido de agua muscular y mejores valores de ARN/ADN, proteína/ADN, mostrando una activación más alta del metabolismo en las larvas tratadas.

Tabla 9. Incremento de peso y tamaño en % del grupo tratado tomando como 100% el crecimiento del grupo de control.

Compuesto	Inc. peso (%) / Inc. tamaño	Compuesto	Inc. peso (%) / Inc. tamaño
A221	120,1/112,0	A230	150,0/123,6
A222	121,0/112,2	A231	130,0/123,0
A223	120,0/110,9	A232	132,8/123,0
A224	127,0/116,0	A233	143,0/124,9
A225	121,0/112,6	A234	123,6/114,2
A226	120,1/112,2	A235	121,0/112,5
A227	128,6/118,5	A236	121,0/112,0
A228	128,2/118,9	A237	127,0/116,2
A229	126,1/115,9	A238	129,2/117,9

15 Este experimento también se llevó a cabo en condiciones de producción para los compuestos A221, A228 y A233, con una supervivencia de un 20% mayor comparada con los controles, manteniendo una estimulación del 110% sobre el peso y un 30% sobre el tamaño, mostrando en los animales una mejor homogeneidad de la distribución del tamaño con solo un 30% y un 8% de coeficiente de variación de peso y tamaño respectivamente, en contra del 77% y 30% en el grupo no tratado.

20 Ejemplo 7: Estimulación del crecimiento en camarones por dieta suplementada con los análogos de GHS peptídico.

Los análogos de GHS peptídico se incluyeron al 1% en una dieta de crustáceos post-larvarios. Se alimentaron las post-larvas de *Litopenaeus vannamei* con la dieta mencionada anteriormente en paralelo con un grupo de control con la adición de BSA al 1%. El efecto se midió con un micrómetro óptico y se pesaron los animales en una báscula de precisión de 0,1 mg.

25 El compuesto añadido produjo un aumento de tamaño del 30-40% comparado con el del grupo de control como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Incremento de tamaño en % del grupo tratado tomando como 100% el crecimiento del grupo de control.

Compuesto	Inc. tamaño (%)	Compuesto	Inc. tamaño (%)
A221	130,0	A230	140,0
A222	131,0	A231	140,1
A223	131,6	A232	139,7
A224	131,2	A233	140,1

(continuación)

Compuesto	Inc. tamaño (%)	Compuesto	Inc. tamaño (%)
A225	130,0	A234	138,6
A226	130,4	A235	137,0
A227	139,0	A236	137,0
A228	140,0	A237	132,0
A229	140,0	A238	130,1

7.1 Encapsulación en *Artemia salina*

Los análogos de GHS peptídico se bioencapsularon en *Artemia* para alimentar post-larvas de *Litopenaeus vannamei*. Para la encapsulación se añadieron los compuestos en 10 mh/l, se dejaron una hora, se recolectaron y se lavaron. Los animales se alimentaron cuatro veces al día durante un mes mientras que el grupo de control se alimentó con BSA encapsulado en *Artemia*. El efecto se midió con un micrómetro óptico y se pesaron los animales con una báscula de precisión de 0,1 mg. Los compuestos encapsulados aumentaron el crecimiento de los animales en un 30 a 40% con respecto al grupo de control con una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Incremento de tamaño en % del grupo tratado tomando como 100% el crecimiento del grupo de control.

Compuesto	Inc. tamaño (%)	Compuesto	Inc. tamaño (%)
A221	130,2	A230	140,0
A222	130,3	A231	140,2
A223	132,0	A232	139,6
A224	130,0	A233	140,0
A225	130,0	A234	135,0
A226	132,0	A235	134,2
A227	140,0	A236	138,0
A228	140,0	A237	136,0
A229	140,0	A238	140,0

Ejemplo 8: Efecto cardioprotector en ratas de los análogos de GHS peptídico.

Para reproducir los efectos fisiopatogénicos de una cardiomiopatía dilatada (CMD) se trataron ratas hembra Wistar de 160 g con 2 mg/kg de Doxorubicina (Dx) durante 8 semanas. Un grupo de estas ratas se trató también en paralelo con los compuestos A221, A228 o A233 por vía intraperitoneal a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durante las 8 semanas de tratamiento con Dx, otro grupo tratado con Dx estuvo recibiendo también solución salina como placebo, y como control sano para el experimento se utilizó otro grupo de ratas Wistar sin tratar de la misma edad. Después de las 8 semanas de tratamiento todas las ratas se ensayaron con un electrocardiograma, para ensayar la funcionalidad ventricular y evaluar la fracción de eyección ventricular (VEF). Como se ve en la fig. 1 las ratas que recibieron en paralelo Dx-compuesto A221 (1a), A228 (1b) o A233 (1c) tenían modificado el VEF ligeramente ($p > 0,05$) con respecto al control sano, por el contrario el grupo que recibió el placebo sufrió una caída en el VEF de aproximadamente un 40% ($p < 0,01$), con respecto al grupo de control sano. Para demostrar las implicaciones funcionales de la respuesta al estrés de la caída del VEF, las ratas se sometieron a natación forzada en agua a 4 °C durante 30 min, como se muestra en la fig. 2 los animales que recibieron el tratamiento con Dx-compuesto A221 (2a), A228 (2b) o A233 (2c) tuvieron una supervivencia del 100% y los que recibieron Dx-solución salina sobrevivieron el 45% ($p = 0,0043$).

Estos resultados sugieren que la protección por los compuestos A221, A228, y A233, no solo mantiene el VEF sino que produce resistencia cardíaca al estrés forzado.

Ejemplo 9: Efecto cardioprotector y reversión de la Cardiomiopatía Dilatada (CMD) en ratas de los análogos de GHS peptídico.

Para evaluar si había un efecto de respuesta a la dosis y reversión de la CMD, las ratas Wistar se sometieron a un tratamiento de 2 mg/kg de Doxorubicina (Dx) durante 8 semanas, después del tratamiento se seleccionaron todas las ratas con una caída del VEF mayor del 40%, se dividieron en 2 grupos de $n=8$ y se trataron con diferentes dosis de los compuestos A221, A228 o A233 como sigue:

- 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$

- 10 µg/kg
- Solución salina.

Definiendo los grupos basándose en las dosis de A221.

- 5 Como se muestra en la fig. 3, dos semanas después el tratamiento con los compuestos A221 (3a), A228 (3b) o A233 (3c) revierte parcialmente la CMD en el intervalo de concentración de 50 µg/kg a 500 µg/kg, pero a las 4 semanas de tratamiento la reversión de la CMD es completa en los grupos que recibieron los compuestos A221, A228 o A233 en el intervalo de 100 a 500 µg/kg, la dosificación de 50 µg/kg no es eficaz para la recuperación completa del VEF pero sin embargo es eficaz en la reducción de la mortalidad en el grupo, con respecto a los animales que recibieron el placebo o los grupos tratados con concentraciones más bajas, que no recuperaron el VEF y tuvieron una supervivencia más baja días después de que finalizara el tratamiento (Fig. 4, a A221, b A228, y c A233).
- 10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRO DE INGENIARÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

5 <120> COMPUESTOS ANÁLOGOS A SECRETAGOGOS PEPTÍDICOS DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO Y PREPARACIONES QUE LOS CONTIENEN

<130> P85719EP00

10 <150> PCT/CU2007/000007
<151> 28-02-2007

<150> CU 2006-0050
<151> 28-02-2006

15 <160> 18
<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Lys3 y Asp5.

<400> 1

30 **Gly Ser Lys Phe Asp Ser Pro Glu His Gln**
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Lys4 y Asp6.

40 <400> 2

His Gly Ser Lys Phe Asp Leu Glu Phe Gly
1 5 10

45 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Lys3 y Asp5.

55 <400> 3

His Cys Lys Phe Asp Leu Asp Trp His
1 5

60 <210> 4
<211> 9
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Asp3 y Lys5.

5

<400> 4

Ser₁ Ser Asp Phe Lys₅ Leu Tyr Trp Gly

10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Asp3 y Lys5.

<400> 5

20

Ala₁ Leu Asp Phe Lys₅ Pro Asn Ile Pro

<210> 6

<211> 9

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Asp3 y Lys5.

30

<400> 6

Ala₁ Leu Asp Phe Lys₅ Pro Asn Ile Pro

35

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Lys3 y Asp6.

45

<400> 7

His₁ Ser Lys Gly Tyr₅ Asp Leu Asp His

50

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de de Lys2 y Asp5.

<400> 8

Gly Lys Phe Gly Asp Leu Ser Pro Glu His Gln

1 5 10

5 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Lys3 y Asp8

<400> 9

His Ala Lys Pro Gly Gly Ile Asp Pro Glu Gln
1 5 10

15 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Lys2 y Asp4.

25 <400> 10

Gly Lys Phe Asp Ser Pro Glu His Gln
1 5

30 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Lys4 y Asp7.

<400> 11

Gly Gly Gly Lys Phe Trp Asp Ile Pro His His
1 5 10

40 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de de Lys2 y Asp5.

50 <400> 12

His Lys Gly Ile Asp Ser Pro Glu Gln His
1 5 10

55 <210> 13
 <211> 10

ES 2 441 441 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Lys2 y Asp4.

<400> 13

10 Gly Lys Phe Asp Leu Ser Pro Glu His Gln
1 5 10

15 <210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Asp2 y Lys6.

<400> 14

25 Gly Asp Ala Gly Ala Lys Leu Leu Ser Ser Arg
1 5 10

30 <210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Glu3 y Lys7.

<400> 15

40 Gly Met Glu Ala Gly Ile Lys Leu Cys His Arg Gln
1 5 10

45 <210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Glu2 y Lys5.

<400> 16

55 Gly Glu Gly Tyr Lys Leu Asp Glu Arg Ser Gln
1 5 10

60 <210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Glu3 y Lys6.

<400> 17

Gly₁ Gly Glu Ala Gly₅ Lys Leu Cys Pro Pro₁₀ Arg Tyr

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de péptido ejemplar con ciclo interno que consigue las regularidades estructurales descritas en la patente. Ciclo en las cadenas laterales de Glu3 y Lys5.

15

<400> 18

Gly₁ Leu Glu Phe Lys₅ Leu Leu His Gln

REIVINDICACIONES

- 5 1. Moléculas químicas de naturaleza peptídica, con ciclos internos y L-aminoácidos, y sus variantes homólogas, capaces de ejercer, debido a su estructura química, funciones similares a las atribuidas a la grelina, des-acil grelina y otros Secretagogos de la Hormona de Crecimiento peptídicos, en los que la estructura química se define por la siguiente secuencia de aminoácidos: Sec ID N° 1-Sec ID N° 18, correspondientes a los compuestos A221-A238.
2. Composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos químicos descritos en la reivindicación 1, cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, y excipientes o vehículos.
- 10 3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada porque** tiene los compuestos químicos peptídicos en un intervalo de 2 a 100 µg de compuesto por ml, si se prepara como una solución o más si se utiliza como un polvo liofilizado.
4. Composición veterinaria para su uso como un medicamento veterinario en acuicultura u otra producción animal, o mejora, que comprende uno o más de los compuestos descritos en la reivindicación 1, cualquiera de sus sales aceptables en veterinaria, y otros excipientes o vehículos.
- 15 5. Composición veterinaria para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada por** la administración de los compuestos como pienso, como suplemento nutricional, en inyecciones periódicas o en baños de inmersión, con el propósito de estimular del crecimiento y/o favorecer la resistencia a las enfermedades en peces o crustáceos.
- 20 6. El uso de los compuestos químicos de la reivindicación 1, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, para producir una composición farmacéutica para la inducción de la hormona de crecimiento en un paciente que necesite de tal tratamiento, por la administración de uno o más de tales compuestos.
7. El uso de los compuestos químicos de la reivindicación 1, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, para producir una composición farmacéutica para la inducción de cardioprotección, y/o neuroprotección, y/o control del apetito incluyendo el metabolismo graso y energético en un paciente que necesite tal tratamiento, por la administración de uno o más de tales compuestos.
- 25 8. El uso de los compuestos químicos de la reivindicación 1, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, para la producción de una composición veterinaria para estimular el crecimiento y/o favorecer la resistencia a las enfermedades en peces o crustáceos, utilizando uno o más de tales compuestos.
- 30 9. El uso, de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los compuestos químicos peptídicos están en el intervalo del 0,01 al 1% y, para administrarse como pienso, en el intervalo de 0,05 a 10 µg de compuesto por gramo de peso húmedo de animal, o en el intervalo de 10 a 500 µg de compuesto por litro, para administrarse en baños de inmersión.
10. Compuestos químicos de acuerdo con la reivindicación 1, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso como un medicamento veterinario administrada en inyecciones periódicas en las que los compuestos químicos peptídicos están en el intervalo del 0,01 al 1%.

35

Figura 1a

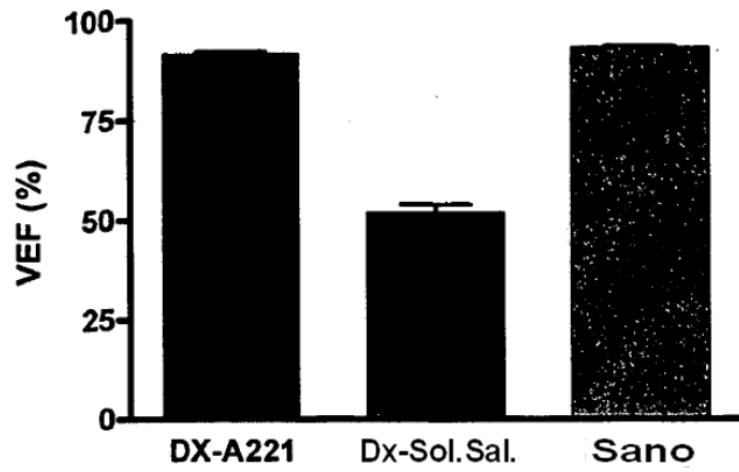


Figura 1b

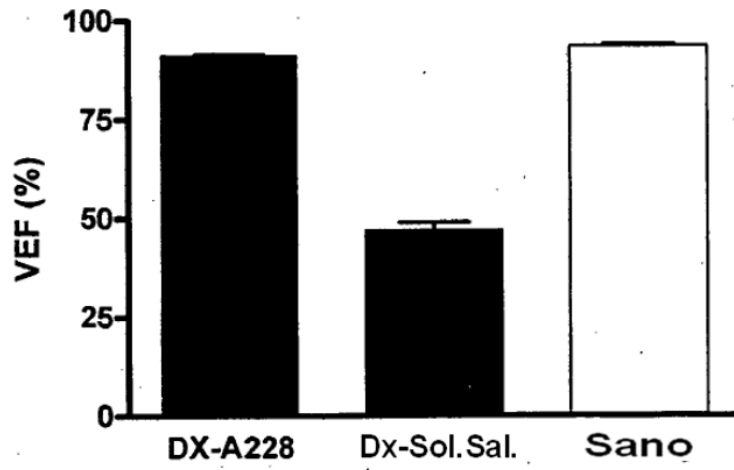


Figura 1c

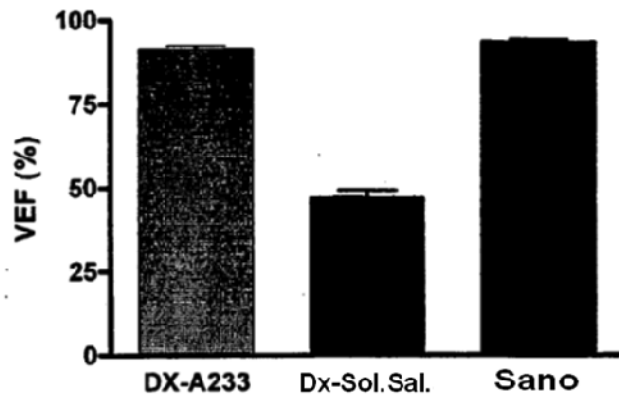


Figura 2a

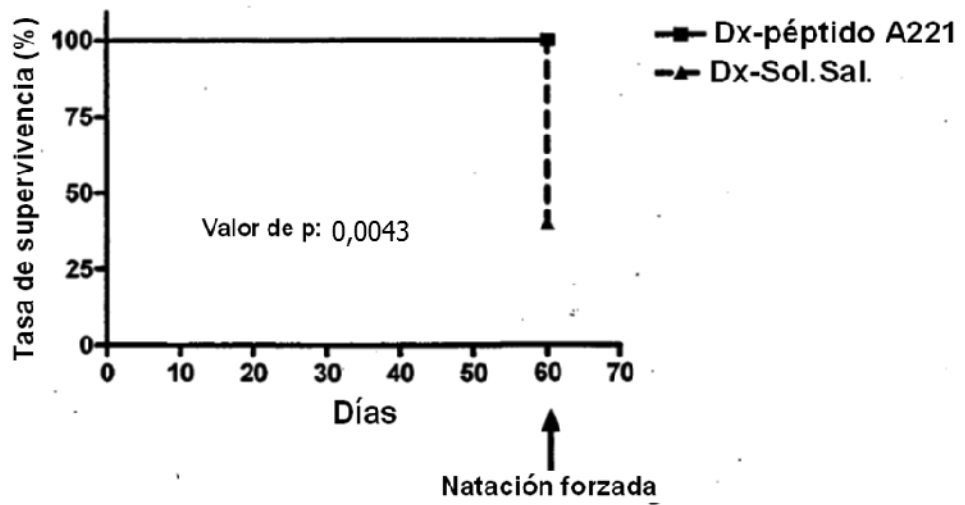


Figura 2b

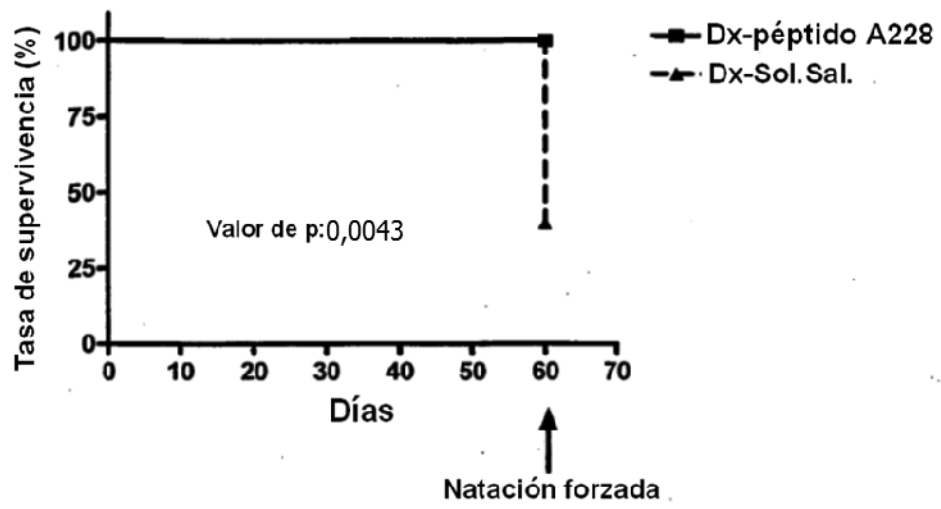


Figura 2c

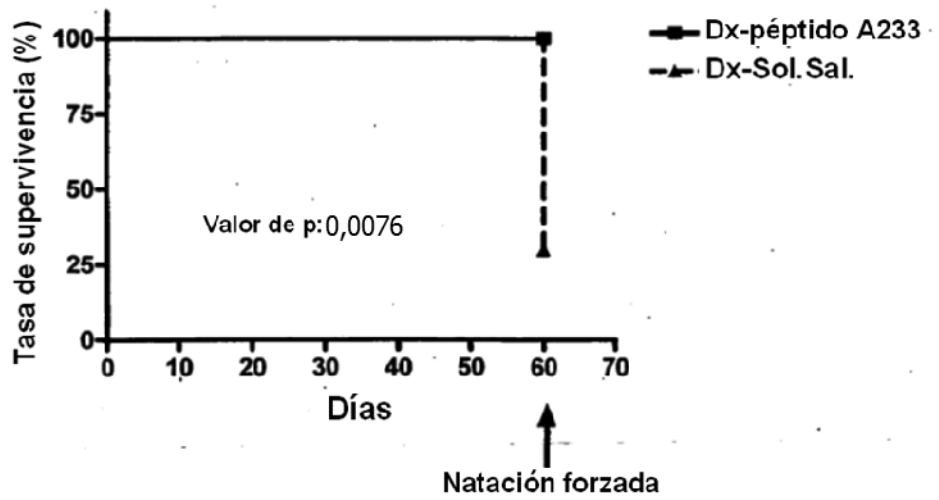


Figura 3a

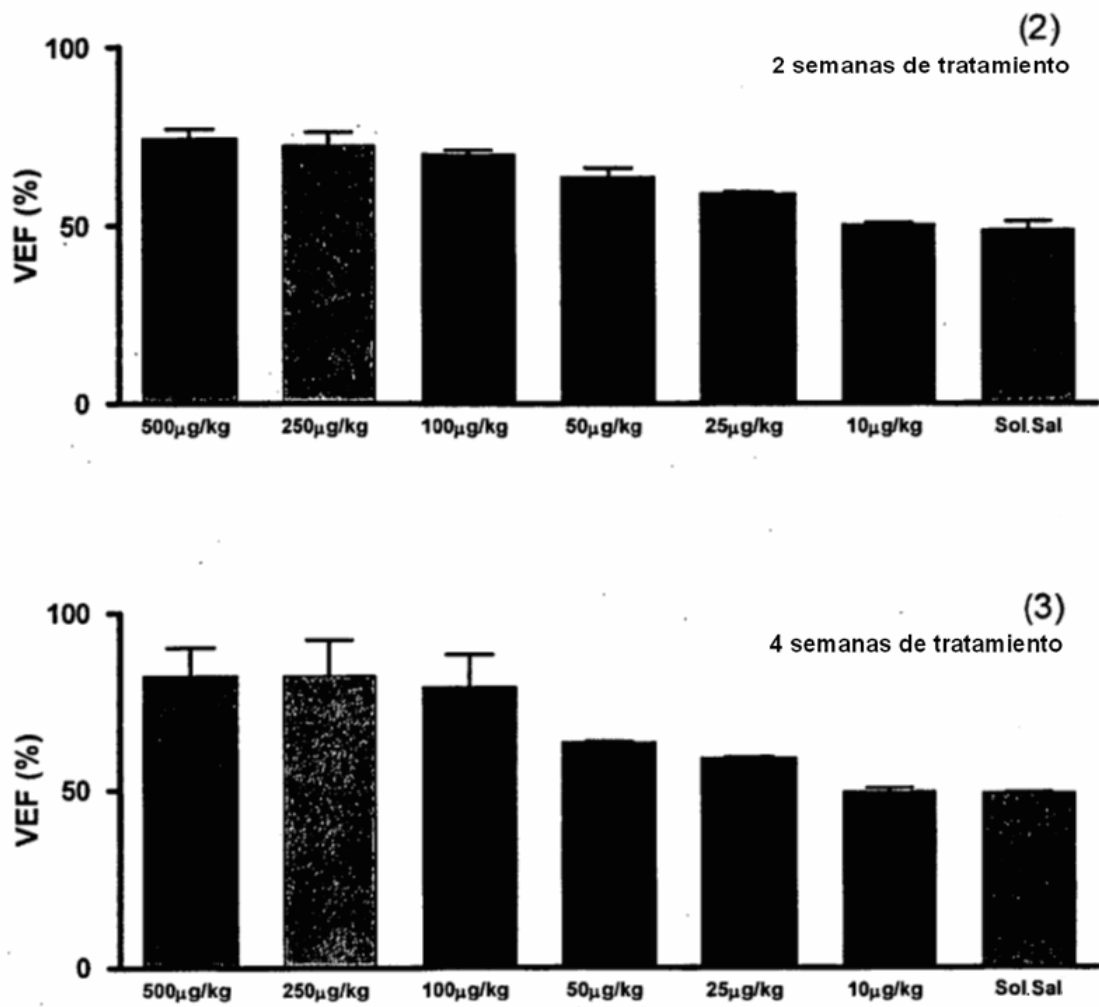


Figura 3b

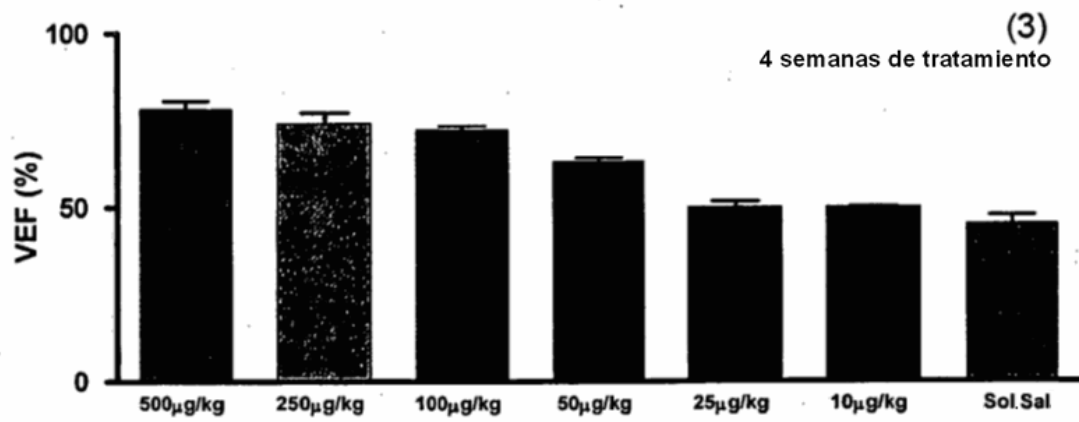
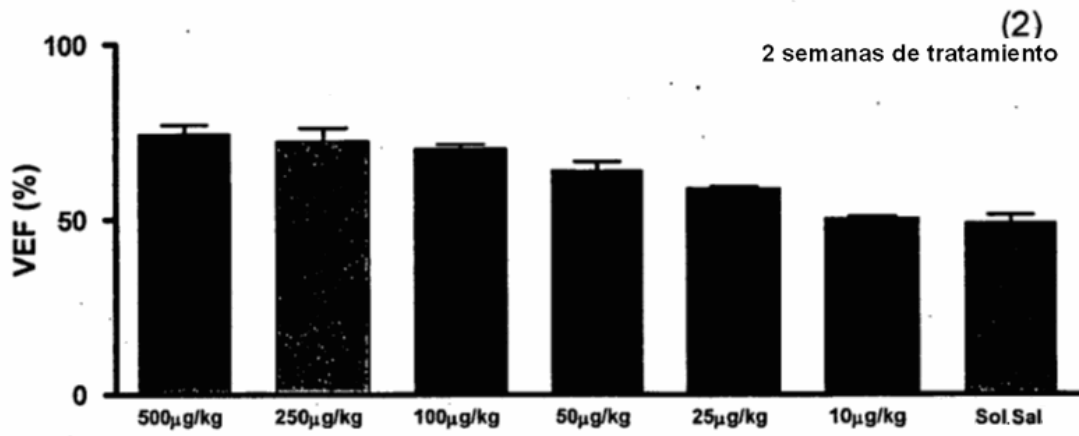


Figura 3c

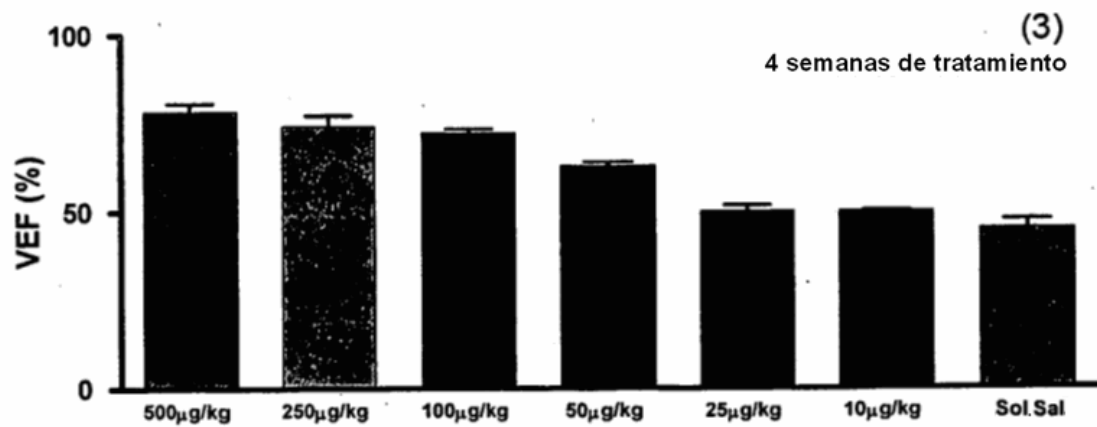
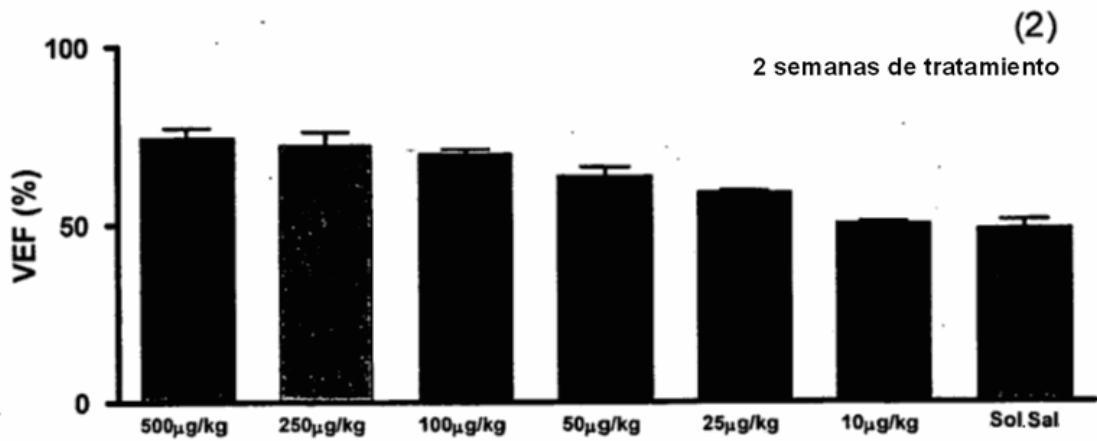


Figura 4a

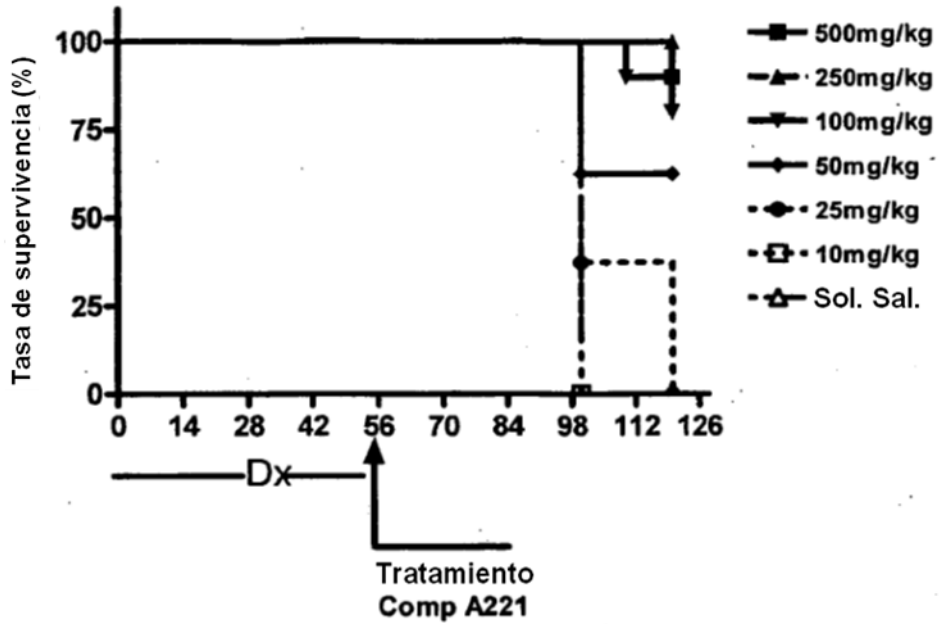


Figura 4b

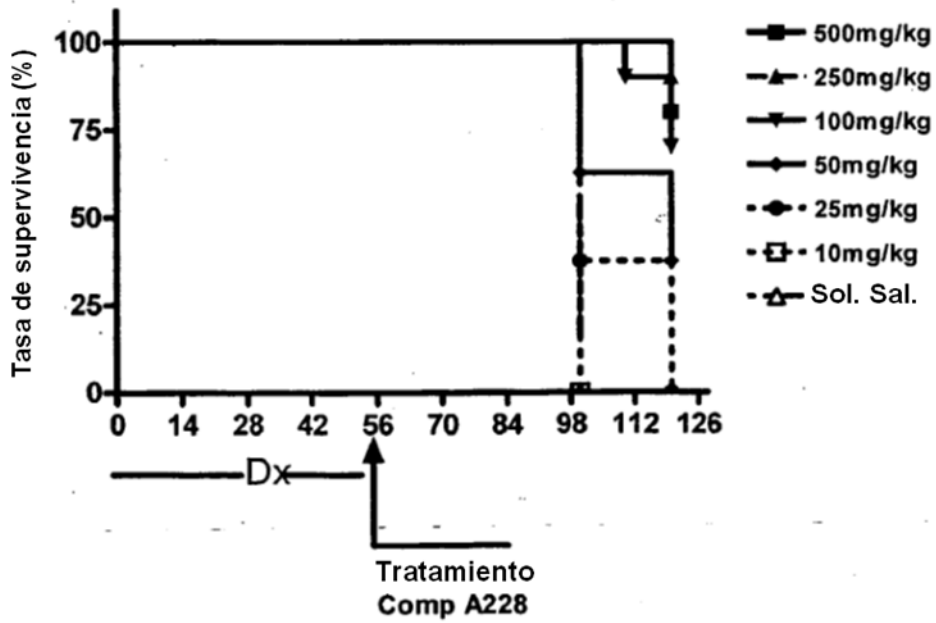


Figura 4c

