

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 484**

51 Int. Cl.:

A61K 38/25 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/04 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61P 5/10 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2003 PCT/JP2003/06349**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2003 WO03097083**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2003 E 03752939 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 1506786**

54 Título: **Composiciones medicinales que contienen grelina**

30 Prioridad:

21.05.2002 JP 2002146155

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2017

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (50.0%)
3-5-1, NIHONBASHI HONCHO
CHUO-KU TOKYO, JP y
KANGAWA, KENJI (50.0%)

72 Inventor/es:

MINAMITAKE, YOSHIHARU y
MATSUMOTO, MASARU

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 615 484 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

Composiciones medicinales que contienen grelina

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene grelina, que es un secretagogo endógeno de la hormona del crecimiento (GHS), para un receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS-R) en un estado estable, así como a un procedimiento para impedir la degradación del grupo hidrófobo de modificación de la grelina en una grelina disuelta en una solución acuosa.

Técnica anterior

La grelina, un secretagogo endógeno de la hormona del crecimiento (GHS) para el receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS-R) que es uno de los receptores huérfanos, es un péptido fisiológicamente activo aislado y purificado por primera vez de la rata en 1999 (Kojima, *et al.*, Nature, 402: 656-660, 1999). Después de eso, se han aislado algunas grelinas que tienen la misma estructura química de la grelina de rata a partir de vertebrados distintos de la rata, tales como humano, ratón, cerdo, pollo, anguila, bovino, equino, ovino, rana, trucha y cánido. Las estructuras químicas de estas grelinas se enumeran en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Humano	GSS(n-octanoil)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR GSS(n-octanoil)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
Rata	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
Ratón	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
Porcino	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKVQQRKESKKPPAKLQPR
Bovino	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQRKEAKKPSGRLKPR
Ovino	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
Cánido	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR
Anguila	GSS(n-octanoil)FLSPSQRPQGKDKKPPRV-NH ₂
Trucha	GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQVRQGGKPPRV-NH ₂ GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQGGKPPRV-NH ₂
Pollo	GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQQKGRKPTAR GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQQKDRKPTAR GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQQKDRKPTARLH
Rana toro	GLT(n-octanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNM GLT(n-decanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNM GLT(n-octanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNM
Tilapia	GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQNKVKSSRI-NH ₂
Siluro	GSS(n-octanoil)FLSPTQKPQNRGDRKPPRV-NH ₂ GSS(n-octanoil)FLSPTQKPQNRGDRKPPRVG
Equino	GSS(n-butanoil)FLSPEHHKQHRKESKKPPAKLQPR

(en las que, los residuos de aminoácidos se representan mediante la notación de una letra definida por la IUPAC y la IUC)

Estos péptidos se caracterizan por una estructura específica debida a la acilación del grupo hidroxilo de la cadena lateral del grupo serina (S) o del grupo treonina (T) por un ácido graso tal como el ácido octanoico o el ácido decanoico, y nunca se han aislado péptidos fisiológicamente activos que tengan un grupo hidrófobo de modificación como la grelina. Estos nuevos péptidos son estimuladores potentes de la secreción de la hormona del crecimiento, y ha quedado claro que estos péptidos realizan un ajuste de la secreción de la hormona del crecimiento. Por tanto, muchos investigadores tienen un gran interés en el papel fisiológicamente activo de la grelina y en el desarrollo de estos péptidos como medicamentos (por ejemplo, la publicación de patente mundial WO 01/07475).

Se sabe que el grupo hidrófobo de modificación en la molécula de la grelina es necesario para los efectos fisiológicos que realiza (Kojima, *et al.*, Nature, 402: 656-660, 1999). Sin embargo, debido a la inexistencia de péptidos que, como la grelina, tengan el grupo hidrófobo de modificación de la molécula en el grupo hidroxilo de la cadena lateral de residuos de aminoácido específicos, nunca se ha estudiado la estabilidad de estos péptidos para el desarrollo de medicamentos.

Casualmente, el compuesto que va a desarrollarse como medicamento tiene las diversas clases de estructuras

químicas, y debido a estas estructuras químicas, los compuestos pueden degradarse fácilmente en el proceso de formulación o en el proceso de almacenamiento posterior. Las reacciones de degradación son escisión hidrolítica, deshidratación, isomerización, eliminación, oxidación, reducción o fotodegradación del compuesto, y además, la reacción química del compuesto con los aditivos que van a incluirse en el compuesto. Por tanto, es muy importante estudiar y entender las distintas reacciones de degradación y sus grados a partir de la estructura química de los compuestos, para el desarrollo del compuesto como medicamento, y en consecuencia el control de calidad del mismo.

Se sabe bien que la estabilidad de los medicamentos puede controlarse en gran medida por las condiciones ambientales, tal como el nivel de pH del entorno. Se ha estudiado la influencia del pH de la solución en la velocidad de degradación de los medicamentos en estado acuoso, y se ha notificado el perfil de pH de la velocidad de degradación de muchos medicamentos (por ejemplo, Sumie Yoshioka, "Stability of Medicines" de Nankohdo, 1995).

Los péptidos fisiológicamente activos o las proteínas fisiológicamente activas son inactivados y degradados por proteasas existentes en el aparato digestivo, y es difícil desarrollar una composición administrable por vía oral que contenga estos péptidos o proteínas. Por tanto, estos péptidos o proteínas se preparan en forma de composiciones inyectables para la administración clínica, y para este fin la estabilidad de estas sustancias en la solución acuosa es muy importante a la hora de preparar formulaciones farmacéuticas líquidas independientemente de la forma de administración, ya sea en forma de solución o en forma de solución soluble extemporánea.

En la actualidad, se comercializan medicamentos como composiciones farmacéuticas que contienen diversas clases de péptidos o proteínas tales como derivados de la insulina, la hormona del crecimiento, calcitonina, péptido natriurético auricular, la LH-RH (hormona liberadora de hormona luteinizante) o derivados de la hormona adrenocorticotrópica, y se informa que los cambios químicos de estos péptidos o proteínas son la desamidación, la formación de ácido iso-aspartico, la escisión hidrolítica tal como la fragmentación, la racemización, la formación de enlaces disulfuro o la reacción de intercambio, la β -eliminación o la reacción oxidativa.

Estos cambios químicos influyen sobre la estabilidad de la composición que contiene péptidos o proteínas, y los grados de la reacción de degradación de los péptidos o proteínas dependen del valor de pH de la solución. Por ejemplo, se notifica que la estructura química de los productos de degradación y la cantidad producida de los productos de degradación variaba según el valor de pH de la solución que contiene estos péptidos o proteínas, tales como los derivados de la LH-RH (Strickley *et al.*, Pharm. Res., 7, 530-536, 1990), la hormona paratiroidea humana (Nobuchi *et al.*, Pharm. Res., 14, 1685-1690, 1997), la hirudina (antitrombina: Gietz *et al.*, Pharm. Res., 15, 1456-1462, 1998) y derivados de la amilina humana (Hekmann *et al.*, Pharm. Res., 15, 650-659 1998).

La grelina de la presente invención es un péptido fisiológicamente activo, y es común preparar una solución acuosa que contiene grelina como composición farmacéutica para uso medicinal. Aunque la estabilidad de la grelina en la solución acuosa es muy importante para la preparación de la composición farmacéutica, nunca ha habido ningún estudio sobre la estabilidad de la grelina en la solución acuosa. La grelina tiene el grupo hidrófobo de modificación específico en su molécula, es decir, el grupo hidroxilo de la cadena lateral de determinados residuos de aminoácidos de la grelina está acilado por ácidos grasos. Nunca se ha descubierto un péptido similar a la grelina que tenga el grupo hidrófobo de modificación específico en la molécula, por tanto, nunca se ha publicado nada sobre la estabilidad de la grelina en el dominio público. Es decir, se desconoce la estabilidad, la estructura química del producto de degradación y el mecanismo de producción del producto de degradación de la grelina. Además, se desconoce el mecanismo de degradación del grupo hidrófobo de modificación de la grelina, así como la degradación secundaria del producto de degradación de la grelina.

En estas circunstancias, el objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que contiene grelina de manera estable y un procedimiento para impedir la degradación del grupo hidrófobo de modificación de la grelina en una grelina disuelta en la solución acuosa contenida en dicha composición basándose en el conocimiento obtenido por la investigación de la estabilidad química de la grelina que tiene un grupo hidrófobo de modificación específico en la molécula.

A través de investigaciones extensas de la influencia del pH en una solución acuosa que contiene grelina y la estructura química del producto de degradación de la grelina, los presentes inventores descubrieron que, en una solución acuosa, la grelina se degradaba produciendo un compuesto desacilado mediante escisión hidrolítica del grupo hidrófobo de modificación específico y, además, se degradaba produciendo el compuesto de deshidroalanina mediante β -eliminación del grupo hidrófobo de modificación, produciendo en consecuencia el producto de degradación secundario debido a la volatilidad del compuesto de deshidroalanina, y estas degradaciones se veían afectadas por el valor del pH de la solución acuosa.

Basándose en los resultados del mecanismo de degradación de la grelina mencionados anteriormente, los presentes inventores descubrieron además que la composición farmacéutica que contenía grelina de manera estable podía obtenerse ajustando el pH de la solución con un agente tamponante o de ajuste del pH y este efecto de estabilización podía obtenerse mediante diversos tipos de agentes tamponantes independientemente de su concentración y de la concentración de grelina, y por tanto completaron la presente invención.

L. M. Seoane *et al.*, European Journal of Endocrinology (2000) 143 R7-A9 divulgan una composición farmacéutica que contiene grelina. Se notifica que la grelina ejerce un marcado efecto estimulador en los niveles de GH en plasma y la grelina puede desempeñar un papel importante en el control fisiológico de la secreción de la GH.

R. Peino *et al.*, European Journal of Endocrinology (2000) 143 R11-R14 divulgan una composición farmacéutica que contiene grelina. Se notifica que la secreción de GH mediada por la grelina mostraba una curva de respuesta a la dosis y la grelina es un liberador potente de la GH en personas normales.

E. Arvat *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, volumen 86, n.º 3, páginas 1169 a 1173 (2001), divulgan una composición farmacéutica. Se notifica que la grelina presenta una actividad de liberación de la GH muy fuerte en humanos, además de un claro efecto estimulador sobre la secreción de lactótrofos y corticotrofos.

El documento EP 1 493 747 A1 divulga un procedimiento para producir un péptido o una proteína en el que una cadena lateral contiene un residuo de aminoácido modificado.

La patente estadounidense n.º 5.503.827 divulga un procedimiento para la producción de preparaciones farmacéuticas de múltiples dosis que contienen proteína humana aislada o producida de manera recombinante inyectables o para infusión.

Divulgación de la invención

Por consiguiente, como un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica acuosa que contiene grelina disuelta en una solución acuosa, en la que el pH de la solución acuosa que disuelve la grelina es de desde 3 hasta 5.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para prevenir la degradación de un grupo hidrófobo de la grelina en una solución que contiene la grelina que comprende ajustar el pH de la solución en el intervalo de 3 a 5.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el cromatograma por HPLC referente a los patrones de degradación del compuesto desacilado desacilado y el compuesto con Dha en una solución acuosa de la grelina en el ejemplo 1.

La figura 2 es el diagrama gráfico que muestra el perfil de la constante cinética de pH-degradación de la grelina.

La figura 3 es el diagrama gráfico que muestra la cantidad de producción del producto de degradación de la grelina en solución acuosa que tiene diversas clases de pH.

La figura 4 es el diagrama gráfico que muestra la estabilidad al pH de la grelina en diversas clases de solución tampón.

Modos de realización preferentes

La composición farmacéutica de la presente invención se explicará más específicamente a continuación. En adelante el término "grelina" según se usa en la presente divulgación se refiere a la grelina que es un secretagogo de la hormona del crecimiento endógeno de la hormona del crecimiento, que es un péptido que tiene un efecto de aumentar la concentración intracelular del ión calcio y de inducir la secreción de la hormona del crecimiento. La grelina adecuada es la obtenida de humano, rata, porcino, pollo, anguila, bovino, equino, ovino, rana, trucha o cánido. En la presente invención, se usa preferentemente la grelina obtenida de ser humano, y más preferentemente, se usa la grelina humana obtenida de humano y que tiene 28 residuos de aminoácido.

El grupo hidrófobo de modificación, que es una característica de la grelina, no se limita a grupo octanoilo (C_8), y es un residuo de ácido graso que tiene de 2 a 20, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono, tal como un grupo hexanoilo (C_6), decanoilo (C_{10}) o dodecanoilo (C_{12}). Además, el grupo hidrófobo es un residuo de ácido graso ramificado, saturado o insaturado, un residuo de ácido graso que tiene un grupo aromático tal como un grupo fenilpropionilo, y un esqueleto de adamantano.

Por tanto, la grelina incluye los péptidos enumerados en la tabla 1 mencionada anteriormente, en los que la secuencia de aminoácidos está modificada mediante la inserción, adición y delección de uno o más aminoácidos, y/o la sustitución por otro aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos, y se modifica químicamente si es necesario. Además, la grelina incluye los péptidos en los que el grupo hidrófobo de modificación está unido a una cadena de aminoácidos mediante un enlace de éster y que tiene la misma actividad fisiológica que la grelina.

La grelina que va a usarse en la composición farmacéutica de la presente invención incluye péptidos en forma libre y

- sales de los mismos. El péptido en forma libre y la sal del mismo pueden convertirse uno en otro. El péptido en forma libre puede convertirse en una sal farmacéuticamente aceptable mediante reacción con un ácido orgánico o inorgánico. Los ejemplos de la sal incluyen las sales con ácidos inorgánicos, tal como carbonato, bicarbonato, clorhidrato, sulfato, nitrato o borato; y las sales con ácidos orgánicos, tal como succinato, acetato, propionato o trifluoroacetato. Además, se incluyen las sales con metales alcalinos tal como la sal de sodio o la sal de potasio; las sales con metales alcalinotérreos tal como la sal de calcio o la sal de magnesio; las sales con aminas orgánicas tal como la sal de trietilamina; y las sales con aminoácidos básicos tal como la sal de ácido alginico. El péptido de la presente invención puede existir como complejo metálico tal como complejo de cobre o complejo de zinc.
- 5
- 10 La forma de la sal tal como se mencionó anteriormente tiene un papel importante para la estabilidad de la grelina. Es decir, los valores de pH de la solución acuosa de las sales anteriores son diferentes entre sí, y por tanto, estas sales desempeñan un papel como agente de ajuste del pH para la solución acuosa de la grelina.
- 15 Los orígenes y los procedimientos de fabricación de las grelinas no están limitados en la presente invención. La grelina obtenida mediante un procedimiento químico, procedimiento semiquímico, procedimiento genético o una combinación de los mismos, y la extracción a partir de un organismo vivo pueden usarse en la presente invención.
- 20 La grelina que va a usarse como material de partida para medicamentos se suministra habitualmente en forma de liofilizado tras purificarse mediante cromatografía de líquidos inversa y así sucesivamente.
- 25 La solución acuosa o solución de la presente invención son soluciones que usan agua como disolvente; sin embargo, puede usarse otro disolvente tal como etanol, 2-propanol y similares dentro de un intervalo farmacéuticamente aceptable.
- 30 La concentración de la grelina en la composición farmacéutica de la presente invención no está limitada, y está preferentemente dentro de un intervalo farmacéuticamente aceptable. El límite inferior de concentración es la concentración en la que la grelina presenta las actividades farmacológicas, y el límite superior de concentración es la concentración en la que la grelina puede disolverse en las soluciones acuosas. Es preferente la concentración que se usa habitualmente en medicamentos por ejemplo de 0,03 nmol/ml a 6 μ mol/ml, y más preferentemente, se usa la concentración de 0,03 nmol/ml a 3 μ mol/ml.
- 35 En la composición fisiológica de la presente invención que contiene la grelina de manera estable, el valor de pH de la solución está en el intervalo de 3 a 5. Se encontró que el valor de pH estable de la solución que contiene la grelina está en el intervalo de 3 a 5. El ajuste del pH de la solución que contiene la grelina se realiza con un agente tamponante o de ajuste del pH.
- 40 Los ejemplos de agente de ajuste del pH incluyen el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido glucónico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco acuoso, ácido cítrico, monoetanolamina, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido málico, ácido propiónico, ácido trifluoroacético, y sales de los mismos.
- 45 Los ejemplos del agente tamponante incluyen glicina, ácido acético, ácido cítrico, ácido bórico, ácido ftálico, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, y sales de los mismos. Entre ellos, se usan preferentemente glicina, ácido acético o ácido succínico como agente tamponante.
- 50 Teniendo en cuenta la estabilidad de la grelina en la solución acuosa, se desea reducir la fluctuación de los valores de pH de la solución. Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención es la solución que tiene capacidad reguladora, es decir, la solución tampón.
- 55 Se usa la solución tampón que tiene un intervalo de pH en el que la degradación de la grelina se inhibe, y se usa la solución que tiene un intervalo de pH de 3 a 5. La solución tampón adecuada es el tampón clorhidrato de glicina, el tampón acetato, el tampón citrato, el tampón lactato, el tampón fosfato, el tampón ácido cítrico-fosfato (incluyendo el tampón de McIlvaine), el tampón fosfato-acetato-borato (incluyendo tampón de Britton-Robinson) y el tampón ftalato. Los ejemplos de los componentes de cada tampón incluyen los agentes tamponantes mencionados anteriormente.
- 60 La concentración de agente de ajuste del pH no está limitada y puede ser la concentración que se usa habitualmente usada para ajustar la solución al intervalo de pH deseado, y en general, se usa la concentración de 0,01 a 100 mM.
- 65 Además la concentración de agente tamponante no está tampoco limitada y puede ser la concentración que mantiene la capacidad tamponante. Generalmente, se usa habitualmente la concentración de 0,01 a 100 mM, preferentemente de 0,1 a 100 mM, más preferentemente de 1 a 100 mM.
- De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que contiene la grelina de manera estable en la solución acuosa. La composición contiene otros aditivos para conseguirla osmolalidad, solubilidad y baja irritación de la solución adecuadas, y para evitar la contaminación y prevenir la absorción del

componente en la solución.

En general, se teme que las soluciones acuosas farmacéuticas que contienen péptidos o proteínas, los péptidos o proteínas se adsorban a los recipientes que se utilizan en el procedimiento para producir la solución o durante la administración de la solución, y por tanto, que la concentración de péptidos o proteínas disminuya. En el caso de la composición farmacéutica de la presente invención, se confirmó que la grelina se adsorbía a los recipientes de vidrio o de polipropileno en el intervalo de la concentración de la grelina para uso médico. Por tanto, es preferible incluir el antiadsorbente para impedir la adsorción de la grelina a los recipientes. Los ejemplos de antiadsorbente incluyen tensioactivos, sacáridos, aminoácidos y proteínas.

El tensioactivo de la presente invención incluye los tensioactivos enumerados en el "Handbook of PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS" así como los compuestos que tienen efectos tensioactivos, y el tensioactivo adecuado se selecciona de entre estos tensioactivos. Los ejemplos incluyen sales de amonio cuaternario, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano, ésteres de ácidos grasos de sorbitano, parabenos, polietilenglicoles, fosfolípidos, ácidos biliares, aceites de ricino de polioxietileno, polioxietilenos, polioxietileno-polioxipropilenos, polialcoholes, tensioactivos aniónicos, polímeros sintéticos o semisintéticos. Entre ellos, se usan preferentemente los ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano y los ésteres de ácidos grasos de sorbitano.

Las sales de amonio cuaternario adecuadas incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y cloruro de cetilpiridinio.

Los ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano adecuados incluyen monolaurato de polioxietilensorbitano (Polisorbate® 20 o Tween® 20), monopalmitato de polioxietilensorbitano (Polisorbate® 40 o Tween® 40), monoestearato de polioxietilensorbitano (Polisorbate® 60 o Tween® 60), triestearato de polioxietilensorbitano (Polisorbate® 65 o Tween® 65), monooleato de polioxietilensorbitano (Polisorbate® 80 o Tween® 80), y trioleato de polioxietilensorbitano (Polisorbate® 85 o Tween® 85).

Los ésteres de ácidos grasos de sorbitano adecuados incluyen monolaurato de sorbitano (Span®20), monopalmitato de sorbitano (Span®40), monoestearato de sorbitano (Span® 60), monooleato de sorbitano (Span® 80), trioleato de sorbitano (Span® 85) y sesquioleato de sorbitano.

Los parabenos adecuados incluyen paraoxibenzoato de metilo, paraoxibenzoato de etilo, paraoxibenzoato de propilo, paraoxibenzoato de butilo y paraoxibenzoato de isobutilo.

Los polietilenglicoles adecuados incluyen glicofurool (gilcofurool 75), Macrogol® 400 (polietilenglicol 400), Macrogol® 600 (polietilenglicol 600) y Macrogol® 4000 (polietilenglicol 4000); los fosfolípidos adecuados incluyen lecitina de soja refinada y lecitina de yema de huevo refinada; y los ácidos biliares adecuados incluyen ácido desoxicólico de sodio.

Los aceites de ricino de polioxietileno adecuados incluyen aceite de ricino de polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 50 y aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 60. Los ejemplos de otros polioxietilenos incluyen polioxietilen oleil éter, polioxietilen estearil éter, polioxietilen cetil éter y sal laurilsulfato de polioxietileno.

Los polioxietileno-polioxipropilenos adecuados incluyen polioxietileno-polioxipropilenglicol (pluronic®) y polioxietileno-polioxipropileno cetil éter.

Los polialcoholes adecuados incluyen glicerina (glicerol), propilenglicol y monoestearato de glicerilo; y los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen alquil éter sulfato tal como cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio y oleilsulfato de sodio; sulfosuccinato de alquilo tal como laurilsulfosuccinato de sodio. Los polímeros sintéticos o semisintéticos adecuados incluyen poli(alcohol vinílico), polímero de carboxivinilo, polivinilpirrolidona y poliacrilato de sodio.

Los ejemplos de sacáridos incluyen monosacáridos tal como manitol, glucosa, fructosa, inositol, sorbitol y xilitol; disacáridos tal como lactosa, sacarosa, maltosa y trehalosa; polisacárido tal como almidón, dextrano, pululano, ácido algínico, ácido hialurónico, ácido pectínico, ácido fítico, fitina, quitina y quitosano. Los ejemplos de dextrinas incluyen α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, dextrina, hidroxipropilalmidón e hidroxilalmidón. Los ejemplos de celulosas incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio.

Los aminoácidos adecuados incluyen glicina y taurina; y poliaminoácidos tal como poli(ácido glutámico), poli(ácido aspártico), poliglicina y polileucina. Los ejemplos de proteínas incluyen albúmina y gelatina.

Puede usarse albúmina sérica no humana como antiadsorbente para la composición farmacéutica de la presente invención cuando la composición se usa como reactivo para examen o como medicamento veterinario; sin embargo, es preferible usar albúmina sérica humana cuando la composición se usa para un medicamento para tratar a un

humano.

Estos antiadsorbentes pueden usarse combinados. La concentración del antiadsorbente está en el intervalo en el que la cantidad del antiadsorbente es farmacéuticamente aceptable y la adsorción de las grelinas al recipiente se inhibe y no se produce agregación de los componentes durante el procedimiento de fabricación o el almacenamiento a largo plazo. Por ejemplo, la concentración del antiadsorbente está en el intervalo del 0,001 al 5%, preferentemente desde el 0,01 hasta el 1%.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener aditivos adicionales para cualquier fin, y los ejemplos de los aditivos se seleccionan del "Handbook of PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS 2000" (Japan Pharmaceutical Excipients Council: Yakuji Nippon Sha). Estos incluyen agentes isotónicos tales como cloruro de sodio y manitol; agentes antisépticos tales como benzoato de sodio; antioxidantes tales como bisulfito de sodio, pirosulfito de sodio y ácido ascórbico; agentes calmantes tales como clorhidrato de lidocaína y clorhidrato de mepivacaína.

La fabricación de la composición farmacéutica de la presente invención se realiza por medio del procedimiento habitual aplicado en el campo farmacéutico. Por ejemplo, en primer lugar, se disuelve grelina liofilizada en el agua purificada, y después, también se disuelven el agente tamponante, el antiadsorbente y otros aditivos en otra cantidad de agua purificada. Entonces se combinan las soluciones acuosas resultantes y se esterilizan por filtración si es necesario, y la solución obtenida se carga en ampollas o viales para obtener la composición farmacéutica que contiene la grelina de la presente invención.

La preparación inyectable puede presentarse en una forma de administración para la reconstitución extemporánea. Esta forma de administración es adecuada para el compuesto, que es inestable en la solución para el almacenamiento a largo plazo. Por tanto, la composición para preparar la solución que contiene la grelina *in situ* es una de las preparaciones inyectables de la presente invención. La composición para preparar la solución que contiene la grelina *in situ* puede contener el material de partida de la grelina para medicamentos y otros aditivos en las cantidades necesarias en un estado sólido. Además, la composición se obtiene secando la solución que contiene la grelina y los otros aditivos en las cantidades necesarias. La técnica de secado de la solución puede ser el procedimiento de liofilización o el procedimiento de secado por pulverización, y se prefiere el procedimiento de liofilización. Estas composiciones sólidas pueden usarse en forma de solución acuosa *in situ*.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse al mamífero (humano, mono, perro, ratón y otros) como medicamento. Las enfermedades a las que puede aplicarse o en las que la composición puede ser eficaz son las enfermedades relacionadas con un déficit o disminución de la hormona del crecimiento (GH) tal como enanismo, activación de osteoblastos u osteogénesis en el adulto normal, aumento de la cantidad de músculo y de la fuerza muscular, mejora de las capacidades físicas en la deficiencia de GH del adulto, esquizofrenia grave en la infancia, uso combinado con la gonadotropina para la inducción de la ovulación, la prevención de trastorno metabólico de proteínas por la administración de prednisona, aceleración de la madurez de los linfocitos T en la inmunodeficiencia grave, pérdida de peso en el anciano y prevención de la hipertrofia del tejido adiposo y la atrofia cutánea.

Otros ejemplos de las enfermedades a las que puede aplicarse o en las que puede ser eficaz son las relacionadas indirectamente con el déficit o la disminución de la hormona del crecimiento (GH) como la enfermedad cardiovascular tal como insuficiencia cardíaca basándose en el efecto de aumento de la frecuencia cardíaca de la composición farmacéutica de la presente invención. Los efectos de la composición farmacéutica de la presente invención no se limitan solo a los humanos, sino que promueven el crecimiento de animales, reducen la grasa, etc., y estos efectos son más fuertes que los obtenidos administrando GH. La composición farmacéutica de la presente invención puede usar un orexígeno para tratar la anorexia o la anorexia nerviosa mediante la administración por vía intravenosa o intracerebroventricular debido a la mejora del apetito. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para tratar los trastornos de la motilidad gastrointestinal tales como apepsia no ulcerosa, la atonía gástrica leve idiopática, la apepsia dinámica y la esofagitis por reflujo.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención acelera la proliferación celular en la médula ósea, el duodeno y el yeyuno, y por tanto, puede usarse como protector para la mucosa intestinal, agente de prevención de lesiones en la mucosa del intestino delgado durante la administración por vía intravenosa de nutrición, y la osteoporosis.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para tratar las siguientes enfermedades, o mejorar las siguientes funciones corporales. Los ejemplos de estas enfermedades incluyen estimulación de la liberación de la hormona del crecimiento en ancianos, prevención del efecto secundario catabólico de los glucocorticoides, tratamiento y prevención de la osteoporosis, estimulación del sistema inmunitario, estimulación de la curación de lesiones, estimulación de la reparación de fracturas óseas, tratamiento del retraso del crecimiento, tratamiento de la insuficiencia o disfunción renal debido al retraso del crecimiento, tratamiento para un estado de ausencia fisiológica que incluye la deficiencia de la hormona del crecimiento en niños y las dolencias crónicas relacionadas, tratamiento para el retraso del crecimiento con adiposidad o retraso del crecimiento relacionado con la

- adiposis, tratamiento para el retraso del crecimiento relacionado con síndrome de Prader-Willi y el síndrome de Turner, estimulación de la recuperación de lesiones por quemaduras y disminución del tiempo de ingreso en el hospital, retraso del crecimiento intrauterino, displasia ósea, tratamiento del hipercortisolismo y síndrome de Cushing, inducción de la hormona del crecimiento sistémica, sustitución de la hormona del crecimiento en pacientes con estrés, displasia cartilaginosa, síndrome de Noonan, esquizofrenia, anhedonia, enfermedad de Alzheimer, sanación de daños diferidos y terapia de las carencias psicosociales, tratamiento de la insuficiencia pulmonar y síndrome de dependencia respiratoria, declive de la reacción de catabolismo de las proteínas tras la cirugía mayor, pérdida de proteínas y disminución de la caquexia debida a enfermedades crónicas tales como el cáncer o el SIDA, terapia de la hiperinsulinemia incluyendo la nesidioblastosis, terapia adyuvante para la inducción de la ovulación, estimulación para el desarrollo del timo, prevención de la atrofia relacionada con la edad de la función del timo, terapia para pacientes con inmunodeficiencias, fuerza del músculo, mejora de la movilidad, engrosamiento de la piel de personas ancianas, homeostasis metabólica, mantenimiento de la homeostasis renal, estimulación de los osteoblastos, osteogénesis y condrogénesis.
- Además, en animales la composición farmacéutica de la presente invención es eficaz para estimular el crecimiento de animales, aumentar la producción de leche y pelo de los animales, activar los sistemas inmunológicos de las mascotas, tratar las enfermedades relacionadas con la edad de las mascotas, estimular el crecimiento de animales de granja y aumentar la producción de lana de las ovejas.
- La composición farmacéutica de la presente invención se administra por las distintas vías de administración de una solución acuosa. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se administra en forma de una solución inyectable tal como inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular o goteo intravenoso. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por la vía parenteral tal como la vía nasal, la vía transpulmonar, la vía transdérmica o la vía transmucosa. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral en forma de solución oftálmica o cápsula rellena con la solución.

Ejemplo:

- La estabilidad de la grelina de la presente invención se ilustra en más detalle mediante los siguientes ensayos y ejemplos, pero ha de indicarse que la presente invención no está limitada en modo alguno por estos ensayos y ejemplos.

- En la descripción a continuación se usan los siguientes símbolos con los significados concretos que se indican y los siguientes procedimientos de ensayo e instrumentos salvo que se indique lo contrario.

[Símbolos]

- Dha: deshidroalanina
- TFA: ácido trifluoroacético
- HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio
- HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
- TIPS: tri-isopropilsilano
- DIPEA: diisopropiletilamina
- Fmoc: fluorenilmetoxycarbonilo
- Boc: t-butiloxycarbonilo
- tBu: t-butilo
- Trt: tritilo
- DMAP: 4-dimetilaminopiridina
- EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- Pmc: 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo

- [Instrumentos]

ES 2 615 484 T3

(A) Sintetizador de péptidos automático

Applied Biosystems: Sintetizador de péptidos automático 433A

5 (B) Sistemas de HPLC para el análisis

Instrumento: Sistema Shimadzu LC-10A

10 Columna: YMC-Pack PROTEIN-RP (4,6 mm de Φ x 150 mm) o YMC-Pack ODS-AM (4,6 mm de Φ x 250 mm)

Temperatura de la columna: 40°C

Eluyente: acetonitrilo en TFA al 0,1%, con gradiente lineal de una concentración máxima del 50 %.

15 CaudalCaudal: 1 ml/min

Detección: UV (210 nm)

Volumen cargado: de 10 a 500 μ l

20

(C) Sistemas de HPLC para alícuotas

Instrumento: Sistema Waters 600 Multidissolvent Delivery

25 Columna: YMC-Pack ODS-A (20 mm de Φ x 250 mm) o YMC-Pack PROTEIN-RP (20 mm de Φ x 250 mm)

Eluyente: acetonitrilo en TFA al 0,1% o ácido acético al 5%, con gradiente lineal.

CaudalCaudal: 10 ml/min

30

Detección: UV (210 y 260 nm)

Volumen cargado: de 1 a 2 ml (más de 2 ml, cargado mediante bomba)

35 (D) Cámara de almacenamiento

Cámara de temperatura y humedad constantes LH-30 (Nagano Kagaku) 5 °C/40 °C

Cámara de temperatura y humedad constantes de tipo prefab. LH-20 (Nagano Kagaku) 25°C

40

(E) Espectrometría de masas

Instrumento: Finnigan MAT TSQ700

45 Fuente de iones: ESI

Modo de ión de detección: positivo

Voltaje de pulverización: 4,5kV

50

Temperatura capilar: 250°C

Fase móvil: ácido acético al 0,2% en H₂O/metanol (1/1)

55 Caudal: 0,2 ml/min

Área de barrido: m/z 300 a 1500

60 (F) Análisis de la secuencia de aminoácidos

Instrumento: Secuenciador Applied Biosystem 477A (Perkin-Elmyer)

(G) Análisis de la composición de aminoácidos

65 Instrumento: Analizador de aminoácidos L-8500 (Hitachi)

Muestra: Hidrolizada con HCl 6 M que contiene fenol al 0,1% en un tubo sellado a 110 °C durante 24 horas.

Ejemplo de referencia: Síntesis de grelina humana

5 Usando el sintetizador de péptidos automático, se sintetizó la resina Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OtBu)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP a partir de la resina Fmoc-Arg(Pmc)-HMP (Applied Biosystems Japón; 472 mg, 0,25 mmol) mediante delección repetida de Fmoc e inserción de Fmoc-aminoácido (siempre que se use Boc-glicina en el caso de la glicina N-terminal) mediante HBTU/HOBt. Se trató el péptido-resina protegido (1,7 g) con solución del 1 % de TFA/ 5 % de TIPS/cloruro de metileno (15 ml) durante 30 minutos. Se recogió el péptido-resina y se lavó con cloruro de metileno (30 ml) varias veces, y con DIPEA al 1% (30 ml) y luego con cloruro de metileno (30 ml). Se hinchó el péptido-resina con Trt deleccionado obtenido en N-metilpirrolidona (10 ml) y se hizo reaccionar la mezcla con ácido octanoico (144,2 mg, 1,0 mmol) y EDC-HCl (192 mg, 1,0 mmol) en presencia de DNAP (31 mg, 0,25 mmol) durante 16 horas. Se recogió la resina resultante mediante filtración y se lavó con N-metilpirrolidona y cloruro de metileno respectivamente, y se secó a vacío para obtener el péptido-resina protegido en el que se sustituyó la cadena lateral de la serina en la posición 3 por un grupo octanoilo. Entonces, se añadió reactivo de desprotección que consistía en el 88 % de TFA/el 5 % de fenol/el 2 % de TIPS/el 5 % de H₂O (15 ml) a la resina obtenida y se agitó la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente. Se eliminó la resina por filtración y se concentró el filtrado. Se trató el residuo obtenido con éter para dar el precipitado, y se recogió por filtración. Se secó el precipitado para dar 900 mg de péptido en bruto. Se disolvieron 200 mg del péptido en bruto obtenido en 10 ml de agua y se añadió la solución a la columna YMC-Pack ODS-A (20 mm de Φ x 250 mm) y se eluyó mediante TFA al 5% con gradiente lineal del 0 al 60 % de acetonitrilo durante 60 minutos (caudal: 10 ml/min). Se recogieron las fracciones eluidas objetivo y se liofilizaron para dar 60 mg de péptido diana (sal del ácido acético de grelina humana: contenido en ácido: 10,9%).

25 ESI-EM: 3371 (calculada: 3370,9).

30 Composición de aminoácidos con patrón de Leu: Ser: 3,43 (4), Glx: 5,93 (6), Gly: 1,01 (1), Ala: 1,00 (1), Val: 0,98 (1), Leu: 2 (2), Phe: 1,00 (1), Lys: 4,02 (4), His: 1,00 (1), Arg: 2,98 (3), Pro: 3,93 (4) (volumen teórico entre paréntesis).

35 Análisis de la secuencia de aminoácidos: El péptido obtenido se identifica como grelina humana (no se detecta octanoil-Ser en la posición 3).

Se obtuvieron grelina de rata u otras grelinas usando el mismo procedimiento mencionado anteriormente.

En el siguiente ejemplo, se usaron las grelinas obtenidas mediante el ejemplo de referencia.

Ejemplo 1: Análisis estructural de los productos de degradación de la grelina

40 Es necesario conocer la reacción de degradación de la grelina en solución acuosa para garantizar la estabilidad de la grelina en la solución acuosa. Por tanto, el procedimiento de degradación de la grelina se estimó mediante el análisis estructural de los productos de degradación de las grelinas usando grelina humana, que es una de las grelinas.

45 Se obtuvo la solución acuosa que contenía aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (0,5 mg/ml) de grelina humana disolviendo aproximadamente 5,0 μmol (17 mg) de grelina humana en solución tampón de Britton-Robinson (pH 7,0: ajustada mediante solución de fosfato/ácido acético/ácido bórico 0,04 M) y solución acuosa de hidróxido de sodio 0,2 M. Se llenaron ampollas de vidrio ámbar con la solución obtenida y se termosellaron. Se almacenó cada una de las ampollas a 40 ± 1 °C durante 4 y 14 días. Se detectaron los productos de degradación en las soluciones acuosas tras el almacenamiento mediante el procedimiento de la HPLC y los resultados se muestran en las figuras 1 (a) y (b).

55 Tal como se muestra en la figura 1 (a), se observaron 2 picos principales (producto de degradación B y producto de degradación C) a entre 24 y 28 minutos en las soluciones tras el almacenamiento a 40°C durante 4 días. Se recogieron los dos productos de degradación B y C y se llevó a cabo el análisis estructural de estos productos de degradación de la grelina humana como se indica a continuación.

Producto de degradación B:

60 La masa de este producto fue de 3245 mediante el análisis por ESI-EM, y se identificó como la masa de la grelina humana desacilada (en lo sucesivo denominada "compuesto desacilado") obtenida a partir de la escisión hidrolítica del grupo octanoilo de la grelina humana. Además, a partir de los resultados de la secuencia de aminoácidos y el análisis de la composición de aminoácidos del producto de degradación B, se determinó que la composición de aminoácidos y la secuencia de aminoácidos correspondían al volumen teórico del compuesto desacilado. En conclusión, se confirmó que el producto de degradación B era el compuesto desacilado.

65 Producto de degradación C:

La masa de este producto fue de 3227 mediante el análisis por ESI-EM, y se identificó como la masa de la [3-deshidroalanina]grelina humana (en lo sucesivo denominada “compuesto de Dha”) obtenida a partir de la β -eliminación del grupo octanoílo de la grelina humana. Además, a partir de los resultados de la ESI-EM, la secuencia de aminoácidos y el análisis de la composición de aminoácidos del producto de degradación C que se hizo reaccionar con etanotiol en exceso en una solución acuosa neutralizada con solución acuosa de hidróxido de sodio 0,05 M, se identificó el producto como [3-etilcisteína]grelina humana. Es decir, se identificó la masa de 3289 mediante ESI-EM como el valor calculado de la suma del compuesto de Dha (3227) y el etanotiol (62), y se detectó la etilcisteína a partir del análisis de la secuencia de aminoácidos y de la composición de aminoácidos. Se obtuvo el producto, [3-etilcisteína]grelina humana, a partir del compuesto de Dha mediante reacción nucleófila del etanotiol. En conclusión, se confirmó que el producto de degradación C era el compuesto de Dha.

A partir de los resultados anteriormente mencionados, se confirmó que los productos de degradación en la solución acuosa neutralizada de grelina humana, que es una de las grelinas, eran el compuesto desacilado por escisión hidrolítica del grupo octanoílo de la grelina humana y el compuesto de Dha obtenido por la β -eliminación del grupo octanoílo de la grelina humana.

Tal como se muestra en la figura 1 (b), en los resultados de la HPLC de la solución almacenada durante 14 días, se observaron varios picos (producto de degradación D, E, etc.) además de los picos de los productos de degradación B y C. Entonces, se almacenaron el compuesto desacilado (producto de degradación B) y el compuesto de Dha (producto de degradación C) en solución acuosa para examinar el mecanismo de producción de estos productos de degradación.

Se disolvió el compuesto desacilado o el compuesto de Dha en solución tampón de Britton-Robinson (pH 7,0) para preparar una solución acuosa que contenía aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (0,5 mg/ml) del compuesto desacilado o del compuesto de Dha de la misma manera descrita anteriormente. Se llenaron ampollas de vidrio ámbar con la solución obtenida y se termosellaron. Se almacenaron las ampollas llenadas con compuesto desacilado a $40\pm 1^\circ\text{C}$ durante 14 días, y se almacenaron las ampollas llenadas con compuesto de Dha a $40\pm 1^\circ\text{C}$ durante 3 días. Se detectaron los productos de degradación de las soluciones acuosas tras el almacenamiento mediante el procedimiento HPLC y los resultados se muestran en las figuras 1 (c) y (d).

Tal como se muestra en la figura 1 (c), se observó un pico principal en el mismo tiempo de retención (26 minutos) que el del producto de degradación D de la figura 1 (b) en las soluciones que contenían el compuesto desacilado, tras el almacenamiento a 40°C durante 14 días. Se recogió el producto de degradación de este pico y se realizaron análisis de ESI-EM, secuencia de aminoácidos y composición de aminoácidos. A partir de los resultados de estos análisis, se identificó este producto como grelina humana desacilada (3-28).

ESI-EM: 3101 (valor calculado: 3100,5).

Además, tal como se muestra en la figura 1 (d), se observó un pico ancho en el mismo tiempo de retención (36 minutos) que el del producto de degradación E de la figura 1 (b) en las soluciones que contenían compuesto de Dha, tras el almacenamiento a 40°C durante 3 días. Se recogió el producto de degradación de este pico y se realizaron análisis de ESI-EM, secuencia de aminoácidos y composición de aminoácidos. A partir de los resultados de estos análisis, se estimó que este producto era $[\text{N}^G\text{-CO-C(=CH}_2\text{)-OH}]$ grelina humana (4-28) (en lo sucesivo denominada “2º producto de degradación del compuesto de Dha”).

ESI-EM: 3083 (valor calculado: 3083,5),

Composición de aminoácidos: Identificada como la composición de aminoácidos estimada.

Secuencia de aminoácidos: Sin reacción a partir del primer residuo de aminoácido.

Además, en la figura 1 (d), se observaron varios picos pequeños a aproximadamente entre 30 y 35 minutos. También se observaron estos picos en la figura 1 (b), y se estimó que estos productos de degradación provenían de la grelina humana y del compuesto de Dha intermedio.

A partir de los resultados mencionados anteriormente, se confirmó que en el procedimiento de degradación de la solución acuosa que contenía grelina humana se producía el compuesto desacilado o el compuesto de Dha a partir de la grelina humana al principio, y después, se producía la grelina humana desacilada (3-28) por fragmentación del compuesto desacilado y el 2º producto de degradación del compuesto de Dha y se producían otros productos por fragmentación del compuesto desacilado, respectivamente.

Por tanto, se confirmó que para conseguir una grelina estable en una solución acuosa, era necesario evitar los diversos tipos de reacciones de escisión en el grupo hidrófobo, que era la estructura característica de la grelina.

Ejemplo 2: Estabilidad de la grelina en soluciones tampón con distinto pH (ensayo de estabilidad 1)

Se llevó a cabo un ensayo sobre la influencia del pH de la solución que contiene la grelina usando grelina humana, que es una de las grelinas.

5 Se disolvió grelina humana en las siguientes soluciones acuosas a una concentración de aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (0,5 mg/ml).

10 Solución acuosa de HCl 0,1 M (pH: 1,1)

Soluciones tampón de Mclvain (pH: 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0)

Se ajustó el pH con ácido cítrico acuoso 0,1 M y solución acuosa de fosfato de sodio dibásico 0,2 M.

15 Cada solución se almacenó a $25\pm 2^\circ\text{C}$ durante 8, 24, 48 y 72 horas respectivamente, y las soluciones obtenidas se analizaron por HPLC y se compararon con las soluciones antes del almacenamiento. Se calculó la razón entre el área del pico de la grelina humana, del compuesto desacilado y del compuesto de Dha y el área total. No se observaron cambios significativos de pH en la solución antes del almacenamiento y después del almacenamiento. Los resultados se muestran en la tabla 2.

20 Tabla 2:

		pH observado	Razón entre el área del pico y el área total de los picos (%)		
			Grelina humana ^{a)}	Compuesto desacilado ^{b)}	Compuesto de Dha ^{b)}
pH 1	Antes	1,1	98,89	0,27	0,21
	8 h después	1,2	94,40	4,88	0,15
	24 h después	1,2	86,00	13,31	0,09
	48 h después	1,2	74,62	24,63	0,04
	72 h después	1,2	65,04	34,17	0,00
pH 2	Antes	2,0	99,07	0,10	0,20
	8 h después	2,0	98,82	0,34	0,20
	24 h después	2,0	98,24	0,89	0,23
	48 h después	2,0	97,35	1,76	0,24
	72 h después	2,0	96,46	2,59	0,25
pH 3	Antes	3,0	99,07	0,10	0,20
	8 h después	3,1	98,98	0,20	0,20
	24 h después	3,1	98,77	0,38	0,23
	48 h después	3,1	98,40	0,67	0,24
	72 h después	3,1	98,03	0,98	0,25
pH 4	Antes	4,0	99,07	0,09	0,20
	8 h después	4,0	99,07	0,12	0,20
	24 h después	4,0	98,92	0,21	0,21
	48 h después	4,0	98,69	0,37	0,22
	72 h después	4,0	98,44	0,51	0,23
pH 5	Antes	5,0	99,06	0,10	0,21
	8 h después	5,0	99,04	0,14	0,21
	24 h después	5,0	98,91	0,24	0,21
	48 h después	5,0	98,59	0,45	0,23
	72 h después	5,0	98,37	0,61	0,24
pH 6	Antes	6,0	99,07	0,10	0,20
	8 h después	6,0	98,87	0,28	0,21
	24 h después	6,0	98,28	0,70	0,26
	48 h después	6,0	97,64	1,33	0,31
	72 h después	6,0	96,92	1,97	0,35
pH 7	Antes	7,0	98,97	0,16	0,22
	8 h después	7,0	98,15	0,92	0,25
	24 h después	7,0	96,18	2,70	0,43
	48 h después	7,0	93,44	5,22	0,61
	72 h después	7,0	90,75	7,67	0,79
pH 8	Antes	8,0	98,61	0,47	0,24
	8 h después	7,9	94,73	3,92	0,68
	24 h después	7,9	87,32	10,57	1,39
	48 h después	7,9	76,95	19,54	2,39

	72 h después	7,9	68,30	27,26	3,12
--	--------------	-----	-------	-------	------

a) Cuando la razón del área del pico de grelina humana está por debajo del 98 % el número aparece subrayado.

5 b) Cuando la razón del área del pico del compuesto desacilado o del compuesto de Dha está por debajo del 1 % el número aparece subrayado.

10 Tal como se muestra en la tabla 2 anterior, se producía más del 3 % del compuesto desacilado en la solución acuosa de grelina humana a pH 1,0 y 8,0 en el tiempo más corto de almacenamiento: 8 horas. Además, se producía más del 1 % del compuesto desacilado en la solución acuosa de grelina humana a pH 7,0 almacenada durante 24 horas y a pH 2,0 y 6,0 almacenada durante 48 horas, y la razón de la grelina humana era de menos del 98 %. Por el contrario, la producción del compuesto desacilado y el compuesto de Dha se inhibió en la solución que tenía el intervalo de pH de 3,0 a 5,0.

15 Se entiende que la solución acuosa que tenía el intervalo de pH de 2 a 7, preferentemente de 3 a 6 era adecuada para inhibir la producción del compuesto desacilado y el compuesto de Dha. Por tanto, se confirmó que para obtener la estabilidad de la grelina en una solución acuosa, era necesario ajustar el pH de la solución en el intervalo de 2 a 7, preferentemente de 3 a 6 para impedir los diversos tipos de reacciones de escisión en el grupo hidrófobo, que es la estructura característica de las grelinas.

20 Ejemplo 3: Estabilidad de la grelina en soluciones tampón de distinto pH (ensayo de estabilidad 2)

Usando una solución tampón diferente de la solución tampón del ejemplo 2, se realizó un ensayo de la estabilidad de la grelina en la solución tampón de distinto pH.

25 Se disolvió grelina humana, que es una de las grelinas, en las soluciones tampón de Britton-Robinson que se ajustaron combinando una solución acuosa de ácido fosfórico-ácido acético-ácido bórico 0,04 M y una solución acuosa de hidrato de sodio 0,2 M en la proporción apropiada, con un pH de 2,1, 3,1, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 y 7,9 para obtener una solución acuosa que contiene la grelina humana en la concentración de aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (0,5 mg/ml). Se llenaron ampollas de vidrio ámbar con la solución obtenida y se termosellaron. Para el cálculo de la constante cinética, es necesario que se produzca un determinado grado de degradación en la solución acuosa de la grelina, y por tanto, las ampollas se almacenaron a 40 ± 1 °C, que eran condiciones extremas de almacenamiento. El cálculo de la concentración (concentración residual) de la grelina humana se llevó a cabo mediante HPLC en función del tiempo. Al mismo tiempo, se midió el pH de la solución y se confirmó que no había cambios significativos de pH en la solución.

35 Se calcularon las constantes cinéticas de cada solución de pH a partir del cambio secuencial de la concentración residual, y los resultados se muestran en la figura 2.

40 Además, en la figura 3 se muestran las razones entre el área del pico del compuesto desacilado y del compuesto de Dha y el área total en cada solución con distinto pH, tras el almacenamiento a 40 °C durante 1 día.

45 Tal como se muestra en la figura 2, se confirmó que el intervalo de pH de la solución que contenía la grelina humana de manera estable estaba entre 3 y 6. Las concentraciones residuales de la grelina en las soluciones que tenían el pH de 3,1, 4,0, 5,0 y 6,0 fueron de más del 87 %, y estos valores superaron el valor objetivo (85 %).

Además, tal como se muestra en la figura 3, se inhibió la producción del compuesto desacilado en la solución que tenía el intervalo de pH de 3 a 6, y se inhibió la producción de compuesto de Dha en la solución que tenía el intervalo de pH de 2 a 7.

50 A partir de los resultados mencionados anteriormente, se entiende que en caso de usar solución tampón de Britton-Robinson, la solución acuosa que tenía el intervalo de pH de 2 a 7, preferentemente de 3 a 6 era adecuada para inhibir la producción del compuesto desacilado y el compuesto de Dha. Por tanto, se confirmó que para obtener la estabilidad de la grelina en una solución acuosa, era necesario ajustar el pH de la solución a de 2 a 7, preferentemente de 3 a 6 para impedir los diversos tipos de reacciones de escisión en el grupo hidrófobo, que era la estructura característica de las grelinas.

55 Ejemplo 4: Influencia de las variedades de la solución tampón en la estabilidad de la grelina (ensayo 1)

60 Se examinó la estabilidad de la grelina usando solución tampón citrato.

Se disolvió grelina humana, que es una de las grelinas, en las soluciones tampón citrato que tenían un pH de 3,6, 4,0, 4,5 y 5,0 para obtener una solución acuosa que contenía grelina humana en la concentración de aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (0,5 mg/ml). Se llenaron ampollas de vidrio ámbar con las soluciones obtenidas y se termosellaron, entonces, se almacenó cada una de las ampollas a 40 ± 1 °C durante 2 semanas. Tras el

almacenamiento durante 2 semanas, se llevó a cabo el análisis por HPLC de las soluciones para calcular la concentración residual a partir de la concentración de grelina humana. También se midió el cambio del valor de pH.

Los resultados se resumen en la tabla 3 siguiente.

5

Tabla 3:

pH de la solución tampón		Justo tras la preparación	Tras el almacenamiento a 40 °C/2 semanas
3,5	Concentración residual (%)	100	89
	pH (observado)	3,6	3,5
4,0	Concentración residual (%)	100	88
	pH (observado)	4,0	4,0
4,5	Concentración residual (%)	100	86
	pH (observado)	4,5	4,4
5,0	Concentración residual (%)	100	85
	pH (observado)	5,0	4,9

10 Tal como se muestra en la tabla 3, las concentraciones residuales de la grelina humana estuvieron entre el 85 y el 89 % cuando se disolvió grelina humana en soluciones tampón citrato que tenían el intervalo de pH de 3,5 a 5,0, y estos valores superaron el valor objetivo (85 %). Además, tampoco se observaron cambios significativos de pH en la solución antes del almacenamiento y después del almacenamiento. Por tanto, se confirmó la estabilidad de las grelinas en la solución tampón citrato en el intervalo de pH de entre 3,5 y 5,0.

15 Ejemplo 5: Influencia de las distintas soluciones tampón en la estabilidad de la grelina (ensayo 2)

Se examinó la estabilidad de la grelina usando solución tampón clorhidrato de glicina o solución tampón acetato.

20 Se disolvió grelina humana, que es una de las grelinas, en las soluciones tampón clorhidrato de glicina 0,05 M que tenían un pH de 2,5, 3,1, 3,6, 4,2, 4,6 y 4,8, o en las soluciones tampón acetato 0,05 M que tenían un pH de 3,1, 3,5, 4,0, 4,5 y 5,0, para obtener una solución acuosa que contenía grelina humana a una concentración de aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (0,5 mg/ml). Se llenaron ampollas de vidrio ámbar con las soluciones obtenidas y se termosellaron, entonces, se almacenó cada una de las ampollas a 40 ± 1 °C durante 2 semanas. Tras el almacenamiento durante 2 semanas, se llevó a cabo el análisis por HPLC de las soluciones para calcular la pureza.

25 También se examinó el cambio del valor de pH para confirmar que no se producían cambios significativos de pH en la solución.

30 En la figura 4 se resumen las concentraciones residuales de la grelina humana en cada una de las soluciones tampón de diversos pH tras el almacenamiento durante 2 semanas.

Tal como se muestra en la figura 4, las concentraciones residuales de la grelina humana fueron de entre el 87 y el 97 % cuando se disolvió la grelina humana en una solución tampón clorhidrato de glicina o solución tampón acetato que tenía un intervalo de pH de 2,5 a 5,0, y estos valores superaron el valor objetivo (85 %).

35 A partir de los resultados del ejemplo 2 (estabilidad en solución tampón de McIlvaine), el ejemplo 3 (estabilidad en solución tampón de Britton-Robinson), el ejemplo 4 (estabilidad en solución tampón citrato) y el ejemplo 5 (estabilidad en solución tampón clorhidrato de glicina o acetato), se confirmó que el ajuste de pH de la solución era importante para la estabilidad de las grelinas en solución acuosa, y que el tipo de solución tampón no tenía efecto sobre la estabilidad de las grelinas en solución acuosa.

40

Ejemplo 6: Estabilidad de la grelina en solución acuosa a distintas concentraciones

Se examinó la estabilidad de la grelina en solución acuosa a distintas concentraciones.

45 Se disolvió grelina humana, que es una de las grelinas, en las soluciones tampón clorhidrato de glicina 0,05 M (pH 3,5) para obtener una solución acuosa que contenía grelina humana con las cinco concentraciones siguientes, que son aplicables para uso médico.

50 0,03 nmol/ml (0,1 $\mu\text{g/ml}$); 0,3 nmol/ml (1,0 $\mu\text{g/ml}$); 3,0 nmol/ml (10,0 $\mu\text{g/ml}$); 0,3 mmol/ml (1,0 $\mu\text{g/ml}$); 3 $\mu\text{mol/ml}$ (10 mg/ml).

Se almacenó cada una de las soluciones a 25±2 °C durante 24 horas, y tras el almacenamiento, se realizaron análisis por HPLC de cada una de las soluciones para calcular las concentraciones residuales a partir de la concentración de grelina humana. También se examinaron los cambios del valor de pH para confirmar que no se producían cambios significativos de pH en las soluciones.

La concentración residual de la solución antes del almacenamiento se define como el 100%, y la concentración residual de cada solución tras el almacenamiento y los cambios del valor de pH de cada solución se resumen en la tabla 4 siguiente.

Tabla 4:

Concentración de grelina h.		Justo tras la preparación	Tras el almacenamiento a 25 °C/24 horas
0,03 nmol/ml	Concentración residual (%)	100	62
	pH	3,4	3,5
0,3 nmol/ml	Concentración residual (%)	100	98
	pH	3,5	3,5
3,0 nmol/ml	Concentración residual (%)	100	98
	pH	3,5	3,6
0,3 μmol/ml	Concentración residual (%)	100	101
	pH	3,4	3,3
3 μmol/ml	Concentración residual (%)	100	101
	pH	3,4	3,3

Tal como se muestra en la tabla 4, las soluciones con alta concentración de grelina humana (0,3 nmol/ml, 3,0 nmol/ml, 0,3 μmol/ml y 3 μmol/ml) mantuvieron la estabilidad de la grelina humana en las soluciones acuosas durante el almacenamiento a 25 °C durante 24 horas, y no se observó ninguna disminución de las concentraciones residuales y los cambios del valor de pH.

Por el contrario, en el caso de la solución con baja concentración de grelina humana (0,03 nmol/ml), la concentración residual de la solución tras el almacenamiento era del 62%; sin embargo, no se observó cambio significativo del valor de pH y no se encontraron productos de degradación como el compuesto desacilado o de Dha en el análisis por HPLC. Por tanto, se confirmó que la disminución de la concentración residual de la grelina humana en la solución podría deberse a su adsorción en la pared del recipiente. Por consiguiente, se decidió que las soluciones con baja concentración de grelina humana (0,03 nmol/ml) mantenían también la estabilidad de la grelina humana en solución acuosa durante el almacenamiento a 25 °C durante 24 horas.

En conclusión, se confirmó que la grelina estaba contenida de manera estable en la solución tampón con pH ajustado en el intervalo de concentración de aproximadamente 0,03 nmol/ml a aproximadamente 3 μmol/ml.

Ejemplo 7: Estabilidad de la grelina en solución acuosa de distinto pH (ensayo 1)

La estabilidad de la grelina en solución acuosa con distinto pH se llevó a cabo usando grelina humana, que es una de las grelinas.

Se disolvió grelina humana en el agua purificada con aproximadamente 0,03 μmol/ml (0,1 mg/ml). El pH de esta solución era de 4,7. Se dividió esta solución en cuatro partes y una de ellas no se modificó. Se ajustó el pH de las tres partes restantes a pH 1,8 (con ácido clorhídrico 17 mM), pH 3,9 (con ácido clorhídrico 0,20 mM) y pH 7,8 (con hidróxido de sodio 0,24 mM) respectivamente, añadiendo una solución acuosa de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio.

Se almacenaron estas cuatro soluciones a 25±2 °C durante 1 y 3 días, y tras el almacenamiento, se realizaron análisis por HPLC de cada una de las soluciones para calcular la razón entre el área del pico de la grelina humana, del compuesto desacilado y del compuesto de Dha y el área total de los picos.

En la tabla 5 siguiente se resumen los resultados.

Tabla 5:

	Razón entre el área de pico y el área total de los picos (%)
--	--

		Grelina humana ^{a)}	Compuesto desacilado ^{b)}	Compuesto de Dha ^{b)}
pH 1,8	Antes	99,16	0,12	0,20
	1 día después	<u>97,68</u>	<u>1,46</u>	0,31
	3 días después	95,01	4,08	0,34
pH 3,9	Antes	99,21	0,07	0,20
	1 día después	99,19	0,09	0,20
	3 días después	99,14	0,14	0,19
pH 4,7	Antes	99,20	0,06	0,20
	1 día después	99,12	0,15	0,21
	3 días después	98,94	0,28	0,21
pH 7,8	Antes	98,85	0,33	0,24
	1 día después	<u>94,78</u>	<u>3,65</u>	0,86
	3 días después	87,84	9,84	1,65

a) Cuando la razón de área de pico de grelina humana está por debajo del 98 % el número aparece subrayado.

5 b) Cuando la razón de área del pico del compuesto desacilado o compuesto de Dha por debajo del 1 % el número aparece subrayado.

10 Tal como se muestra en la tabla 5, se produjo más del 1 % del compuesto desacilado en la solución acuosa de pH 1,8 y 7,8, y la razón de la grelina humana era de menos del 98 %, con solo un día de almacenamiento. Además, la razón del compuesto de Dha era de más del 1 % en la solución acuosa de pH 1,8 y 7,8 tras un almacenamiento de 3 días. Por el contrario, se inhibió la formación del compuesto desacilado y del compuesto de Dha en la solución acuosa de pH 3,9 y 4,7.

15 Por consiguiente, quedó claro que la solución acuosa que tenía el intervalo de pH de 2 a 7 era adecuada para inhibir la producción del compuesto desacilado y el compuesto de Dha. Por tanto, se confirmó que para que las grelinas fueran estables en una solución acuosa, era necesario ajustar el pH de la solución a entre 2 y 7 para impedir los diversos tipos de reacciones de escisión en el grupo hidrófobo, que era la estructura característica de la grelina.

Ejemplo 8: Estabilidad de la grelina en solución con distintos pH (ensayo 2)

20 Se analizó la estabilidad de la grelina en solución acuosa con distintos pH usando grelina humana-(1-7)-amida, que es una de las grelinas.

25 La grelina humana-(1-7)-amida es una secuencia de aminoácidos común de las grelinas de mamíferos, aves o peces (véase la tabla 1), y presenta la misma actividad biológica que la grelina humana (publicación de patente internacional WO 01/07475).

30 Se disolvió grelina humana-(1-7)-amida en agua purificada con aproximadamente 0,12 $\mu\text{mol/ml}$ (0,1 mg/ml). El pH de esta solución era de 5,0. Se dividió esta solución en cuatro partes, y una de ellas no se modificó. Se ajustó el pH de las tres partes restantes a pH 1,8 (con ácido clorhídrico 17 mM), pH 3,9 (con ácido clorhídrico 0,20 mM) y pH 7,8 (con hidróxido de sodio 0,24 mM) respectivamente, añadiendo una solución acuosa de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio.

35 Se almacenaron estas cuatro soluciones a 25 ± 2 °C durante 1 y 3 días, y tras el almacenamiento, se realizaron análisis por HPLC de cada una de las soluciones para calcular la razón entre el área del pico de la grelina humana-(1-7)-amida, la grelina humana-(1-7)-amida, desacilada y la [3-deshidroalanina]-grelina humana-(1-7)-amida, y el área total de los picos.

En la tabla 6 siguiente se resumen los resultados.

Tabla 6:

40

		Razón entre el área de pico y el área total de los picos (%) (%)		
		grelina humana-(1-7)-amida, ^{a)}	grelina humana-(1-7)-amida, desacilada ^{b)}	[3-deshidroalanina]-grelina humana-(1-7)-amida, ^{b)}
pH 1,8	Antes	98,39	0,98	0,02
	1 día después	<u>95,40</u>	<u>3,75</u>	0,07
	3 días después	90,11	8,89	0,10
pH 4,1	Antes	98,76	0,72	0,00
	1 día después	98,68	0,73	0,03
	3 días después	98,60	0,77	0,01

pH 5,0	Antes	98,69	0,70	0,00
	1 día después	98,57	0,73	0,02
	3 días después	98,51	0,79	0,06
pH 7,9	Antes	98,22	<u>1,12</u>	0,03
	1 día después	<u>95,89</u>	<u>3,21</u>	0,23
	3 días después	92,54	6,21	0,54

a) Cuando la razón del área del pico de la grelina humana-(1-7)-amida está por debajo del 98 % el número aparece subrayado.

5 b) Cuando la razón del área del pico de la grelina humana-(1-7)-amida o de la [3-deshidroalanina]- grelina humana-(1-7)-amida está por debajo del 1 % el número aparece subrayado.

10 Tal como se muestra en la tabla 6, la razón de la grelina humana-(1-7)-amida era de menos del 98 % en la solución acuosa de pH 1,8 y 7,9, solo con un día de almacenamiento. Por el contrario, se inhibió la producción de los productos de degradación en la solución acuosa de pH 4,1 y 5,0.

15 Por consiguiente, quedó claro que las soluciones acuosas que estaban en el intervalo de pH de entre 2 y 7 eran las adecuadas para la solución acuosa que contenía grelina humana-(1-7)-amida, que es una de las grelinas. Por tanto, se confirmó que para obtener la estabilidad de la grelina en una solución acuosa, era necesario ajustar el pH de la solución a entre 2 y 7 para impedir los diversos tipos de reacciones de escisión en el grupo hidrófobo, que era la estructura característica de la grelina.

20 Ejemplo 9: Efecto de inhibición de la adsorción mediante la adición de antiadsorbentes a la solución acuosa que contiene la grelina con baja concentración

En el ejemplo 6, se observó que la grelina de la solución que tenía una concentración médicamente aplicable de grelina se adhiere a la pared del recipiente. Por consiguiente, se examinó el efecto de inhibición de la adsorción de los antiadsorbentes en la solución acuosa que contenía la grelina.

25 Como antiadsorbente se seleccionó el tensioactivo, es decir, monooleato de polioxietilensorbitano (en lo sucesivo denominado Tween® 80), y cloruro de benzalconio.

30 Se disolvió grelina humana en solución tampón de manitol al 5 %-clorhidrato de glicina 0,05 M (pH 3,5) con una concentración de aproximadamente 0,3 nmol/ml (1,0 µg/ml), que es la concentración médicamente aplicable de las grelinas. Se añadió el antiadsorbente a esta solución con una concentración del 0,01 % o el 0,1 %.

35 Se midió la concentración de grelina humana de cada solución mediante HPLC justo tras la preparación, y estas soluciones se trasvasaron a tubos de ensayo de vidrio. Después de eso, cada solución se volvió a trasvasar a otros tubos de ensayo de vidrio nuevos, y se repitió la misma operación 5 y 10 veces. Entonces, se midió la concentración de grelina humana de cada solución tratada por HPLC. Como control, se examinó la solución que no contenía antiadsorbente.

40 Se repitió el mismo procedimiento usando tubos de ensayo de polipropileno en lugar de los tubos de ensayo de vidrio.

En la tabla 7 siguiente se resumen los resultados.

Tabla 7:

Antiadsorbente		Conc. inicial	Tubo de vidrio ^{a)}		Tubo de polipropileno ^{b)}	
Compuesto	Conc.		5 veces	10 veces	5 veces	10 veces
Ninguno	-	100	0	0	51	19
Tween 80	0,01 %	100	17	0	90	90
	0,1 %	100	20	5	93	91
Cloruro de benzalconio	0,01 %	100	81	64	97	96
	0,1 %	100	99	99	99	101

45 a) Asahi Techno-glass Co., Ltd.: 10 ml

b) CORNING Co., Ltd.: 15 ml

50 Tal como se muestra claramente en la tabla 7, se redujeron en gran medida las concentraciones de grelina humana de las soluciones tras los trasvases de la solución en ambos casos usando tubos de vidrio y tubos de polipropileno. Particularmente, en el caso de los tubos de vidrio, se redujo la concentración de la grelina humana de la solución

hasta un nivel indetectable mediante el análisis por HPLC.

Por el contrario, se observó un alto efecto de inhibición de la adsorción con los tubos de polipropileno cuando se añadió Tween® 80 a la solución con una concentración del 0,01 % o del 0,1 %, como antiadsorbente, y también se observó un alto efecto de inhibición de la adsorción tanto con los tubos de vidrio como con los tubos de polipropileno cuando se añadió cloruro de benzalconio a la solución con una concentración del 0,01 % o del 0,1 %, como antiadsorbente.

Por consiguiente, quedó claro que Tween® 80 y el cloruro de benzalconio tienen un efecto beneficioso sobre la inhibición de la adsorción de grelina a la pared del recipiente, de la solución que contenía la grelina con la concentración médicamente aplicable. Por tanto, se confirmó que el antiadsorbente era eficaz para impedir la adsorción de la grelina durante el procedimiento de fabricación, el almacenamiento a largo plazo y el procedimiento de administración.

Ejemplo 10: Efecto de inhibición de la adsorción mediante la adición de sacáridos a la solución acuosa que contiene la grelina con baja concentración

En el ejemplo 9, se mostró que la adsorción de la grelina a la pared del recipiente de la solución se inhibía usando antiadsorbente. En este ejemplo, se examinó el efecto de inhibición de la adsorción de los sacáridos.

Como solución acuosa de sacárido, se usó una solución acuosa de manitol al 5 %. Se disolvió grelina humana en solución acuosa de manitol al 5 % con una concentración de aproximadamente 3 nmol/ml (10 µg/ml) y aproximadamente 30 nmol/ml (100 µg/ml), que es la concentración médicamente aplicable de la grelina.

La concentración de grelina humana de cada solución se midió por HPLC justo después de prepararla y estas soluciones se trasvasaron a un tubo de ensayo de polipropileno. Después de eso, cada solución se volvió a trasvasar a un tubo de ensayo de polipropileno nuevo, y se repitió la misma operación 5 veces en total. Luego, se midió la concentración de grelina humana de cada solución tratada por HPLC. Como control, se examinaron las soluciones salinas fisiológicas que contenían grelina humana con una concentración de aproximadamente 3 nmol/ml (10 µg/ml) y aproximadamente 30 nmol/ml (100 µg/ml).

Los resultados se resumen en la tabla 8.

Tabla 8:

Antiadsorbente		Conc. inicial	Tubo de polipropileno ^{b)}
Especie	Conc. de grelina humana		5 veces
Solución salina fisiológica	10 µg/ml	100	32
	100 µg/ml	100	89
Solución acuosa de manitol al 5%	10 µg/ml	100	98
	100 µg/ml	100	99

b) CORNING Co., Ltd.: 15 ml

Tal como se muestra claramente en la tabla 8, las concentraciones de grelina humana de las soluciones salinas fisiológicas se redujeron en gran medida después de trasvasar la solución usando tubos de ensayo de polipropileno. Especialmente en el caso de la solución salina fisiológica que contenía grelina humana con una concentración de 10 µg/ml, dicha concentración se redujo al 32 %.

Por el contrario, se observó un efecto de inhibición de la adsorción alto con los tubos de polipropileno en el caso de la solución acuosa de manitol al 5 % que contenía grelina humana tanto con una concentración de 10 µg/ml como de 100 µg/ml.

Por consiguiente, quedó claro que los sacáridos mostraban un efecto beneficioso sobre la inhibición de la adsorción de la grelina a la pared del recipiente, en la solución que contenía las grelinas a la concentración médicamente aplicable, y por tanto, se confirmó que los sacáridos eran eficaces impidiendo la adsorción de la grelina durante el procedimiento de fabricación, el almacenamiento a largo plazo y el procedimiento de administración.

Ejemplo 11: Fabricación de la preparación extemporánea para la disolución y su estabilidad

Como en la preparación *in situ* para la composición farmacéutica de la presente invención, se preparó polvo liofilizado y se estimó la solubilidad del polvo.

Se disolvió grelina humana en solución tampón de manitol al 5 %-clorhidrato de glicina 0,05 M (pH 3,5) con una concentración de aproximadamente 0,3 nmol/ml (1,0 µg/ml), y se midió la concentración de grelina humana de esta solución justo después de la preparación mediante el procedimiento de HPLC, y también se midió el pH de esta

solución. Los resultados fueron que la concentración de grelina humana era de 1,0 µg/ml, y el pH era de 3,5. Entonces, se liofilizó esta solución a -25°C durante 24 horas a vacío, y el polvo obtenido se siguió secando a 20 °C durante 24 horas a vacío. El polvo liofilizado obtenido era un sólido blanco que tenía un buen aspecto.

5 Entonces, se disolvió este polvo liofilizado en agua purificada, cuya cantidad que era igual que la cantidad eliminada desde el comienzo de la liofilización, y se examinaron la solubilidad del polvo liofilizado y el pH de la solución obtenida.

10 Se observó que la solubilidad del polvo liofilizado era excelente y no aparecía materia insoluble en la solución, y la solubilidad del polvo era adecuada para la preparación extemporánea de la solución. La concentración de la grelina humana era de 1,0 µg/ml, que es la misma concentración de grelina humana de la solución justo después de la preparación o antes de la liofilización, por tanto, no se observó disminución del contenido de la preparación por la liofilización. Además, el valor de pH de la solución era de 3,5, que era el mismo valor de pH de la solución justo después de la preparación o antes de la liofilización. Por tanto, puede obtenerse la solución acuosa que contiene grelina humana de manera estable a partir del polvo liofilizado de la presente invención.

15 Por consiguiente, puede obtenerse el polvo liofilizado que contiene la grelina usando la solución que contiene la grelina ajustando el pH de la solución mediante liofilización, y la preparación de polvo liofilizado obtenida es útil para la preparación *in situ* de la composición farmacéutica de la presente invención.

20 Ejemplo de fabricación 1: Preparación de una composición farmacéutica que contiene grelina humana y ajuste del pH

25 Se disolvió grelina humana, que es una de las grelinas, en agua purificada para obtener una solución acuosa que contiene grelina humana con aproximadamente 0,15 µmol/ml (0,5 mg/ml). Se ajustó el pH de esta solución a 4,0 añadiendo solución de ácido clorhídrico 0,1 M, para obtener la composición farmacéutica que contiene grelina humana como preparación de la solución.

30 Ejemplo de fabricación 2: Preparación de una composición farmacéutica que contiene grelina de rata en una solución tampón clorhidrato de glicina

35 Se disolvió grelina de rata, que es una de las grelinas, en solución tampón clorhidrato de glicina 0,05 M (pH 3,5) con aproximadamente 0,15 µmol/ml (0,5 mg/ml) para obtener la composición farmacéutica que contiene grelina de rata como preparación de la solución. El pH de esta solución era de 3,5.

40 Ejemplo de fabricación 3: Preparación de una composición farmacéutica que contiene [3-serina(acetil)]grelina humana en solución tampón clorhidrato de glicina

45 Se disolvió [3-serina(acetil)]grelina humana, que es una de las grelinas, en solución tampón clorhidrato de glicina 0,05 M (pH 3,5) con aproximadamente 0,15 µmol/ml (0,1 mg/ml) para obtener la composición farmacéutica que contiene [3-serina(acetil)]grelina humana como preparación de la solución. El pH de esta solución era de 3,5.

50 Ejemplo de fabricación 4: Preparación de una composición farmacéutica que contiene [3-serina(fenilpropionil)]grelina humana en solución tampón clorhidrato de glicina

55 Se disolvió [3-serina(fenilpropionil)]grelina humana, que es una de las grelinas, en solución tampón clorhidrato de glicina 0,05 M (pH 3,5) con aproximadamente 0,15 µmol/ml (0,5 mg/ml) para obtener la composición farmacéutica que contiene [3-serina(fenilpropionil)]grelina humana como preparación de la solución. El pH de esta solución era de 3,5.

60 Ejemplo de fabricación 3: Preparación de una composición farmacéutica que contiene grelina humana-(1-5)-amida en solución tampón clorhidrato de glicina

65 Se disolvió grelina humana-(1-5)-amida, que es una de las grelinas, en solución tampón clorhidrato de glicina (pH 3,5) con aproximadamente 0,15 µmol/ml (0,5 mg/ml) para obtener la composición farmacéutica que contiene grelina humana-(1-5)-amida como preparación de la solución. El pH de esta solución era de 3,5.

Aplicabilidad industrial

60 Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene grelina de manera estable, y la preparación de la presente invención impide la adsorción de la grelina a la pared del recipiente. Por tanto, la presente invención proporciona la composición farmacéutica sin disminución de la grelina, durante la fabricación, el almacenamiento a largo plazo y la administración.

65

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
 20 25

5 <210> 4
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1).. (27)
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de rata de un secretagogo de la hormona del crecimiento

<400> 4
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
 20 25

15 <210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1).. (28)
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de ratón de secretagogo de la hormona del crecimiento

25 <400> 5
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
 20 25

30 <210> 6
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1).. (28)
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos porcinos de un secretagogo de la hormona del crecimiento

40 <400> 6
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg
 20 25

45 <210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(27)

<223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos bovinos (27 aminoácidos) de un secretagogo de la hormona del crecimiento

5

<400> 7

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu
 1 5 10 15

Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
 20 25

<210> 8

10 <211> 27

<212> PRT

<213> *Ovis aries*

<220>

15 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(27)

<223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos ovinos (27 aminoácidos) de un secretagogo de la hormona del crecimiento

20 <400> 8

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu
 1 5 10 15

Pro Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
 20 25

<210> 9

25 <211> 28

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<220>

30 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(28)

<223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de perro de un secretagogo de la hormona del crecimiento

<400> 9

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
 20 25

35

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

40 <213> *Anguilla japonica*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(21)

45 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de anguila de un secretagogo de la hormona del crecimiento. Este péptido está amidado en el extremo C.

<400> 10

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys

1 5 10 15

Lys Pro Pro Arg Val
20

5 <210> 11
<211> 23
<212> PRT
<213> *Oncorhynchus mykiss*

10 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1).. (23)
<223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de trucha arcoiris (23 aminoácidos) de un secretagogo de la hormona del crecimiento. Este péptido está amidado en el extremo C.

15 <400> 11

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

Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val
20

20 <210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> *Oncorhynchus mykiss*

25 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1).. (20)
<223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de trucha arcoiris (20 aminoácidos) de un secretagogo de la hormona del crecimiento. Este péptido está amidado en el extremo C.

30 <400> 12

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly Lys
1 5 10 15

Pro Pro Arg Val
20

35 <210> 13
<211> 24
<212> PRT
<213> *Gallus domesticus*

40 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1).. (24)
<223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de pollo de un secretagogo de la hormona del crecimiento

<400> 13

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg
 20

5 <210> 14
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Gallus domesticus*

10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1).. (24)
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de pollo de un secretagogo de la hormona del crecimiento

<400> 14
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys
 1 5 10 15

Asp Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg
 20

15 <210> 15
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Gallus domesticus*

20 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(26)
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de pollo de un secretagogo de la hormona del crecimiento

25 <400> 15
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys
 1 5 10 15

Asp Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg Leu His
 20 25

30 <210> 16
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Rana catesbeiana*

35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1).. (27)
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de rana de un secretagogo de la hormona del crecimiento

<400> 16
 Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg
 1 5 10 15

40 Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met
 20 25

<210> 17

<211> 28
 <212> PRT
 <213> *Rana catesbeiana*

5 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(28)
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de rana de un secretagogo de la hormona del crecimiento

10 <400> 17
 Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg
 1 5 10 15
 Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met Asn
 20 25

<210> 18
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Tilapia nilotica*

15 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(20)
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de tilapia de un secretagogo de la hormona del crecimiento. Amidación

20 <400> 18
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Asn Lys Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Arg Ile
 20 25

<210> 19
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Silurus asotus*

30 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(22)
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de siluro de un secretagogo de la hormona del crecimiento. Este péptido está amidado en el extremo C.

35 <400> 19
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Gln Lys Pro Gln Asn Arg Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Lys Pro Pro Arg Val
 20 40

<210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Silurus asotus*

45 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(23)

ES 2 615 484 T3

<223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos de siluro de un secretagogo de la hormona del crecimiento

<400> 20

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Gln Lys Pro Gln Asn Arg Gly Asp
1 5 10 15

Arg Lys Pro Pro Arg Val Gly
20

5

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

10 <213> *Equus caballus*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(28)

15 <223> Secuencia de aminoácidos de péptidos endógenos equinos de un secretagogo de la hormona del crecimiento

<400> 21

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

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Lys Pro Arg
20 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que contiene grelina, en la que dicha composición comprende una solución acuosa, caracterizada porque la solución acuosa que tiene la grelina disuelta en ella tiene un pH de entre 3 y 5.
2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que además contiene un agente tamponante o de ajuste del pH.
- 10 3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el agente de ajuste del pH es uno o más que se seleccionan del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido glucónico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco acuoso, ácido cítrico, monoetanolamina, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido málico, ácido propiónico, ácido trifluoroacético y sus sales.
- 15 4. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el agente tamponante es uno o más que se seleccionan del grupo que consiste en glicina, ácido acético, ácido cítrico, ácido bórico, ácido ftálico, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y sus sales.
- 20 5. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que concentración del agente tamponante o de ajuste del pH en la solución está en el intervalo de entre 0,01 mM y 1000 mM.
- 25 6. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la solución es una solución tampón.
- 30 7. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la solución tampón es tampón clorhidrato de glicina, tampón acetato, tampón citrato, tampón lactato, tampón fosfato, tampón ácido cítrico-fosfato, tampón fosfato-acetato-borato o tampón ftalato.
- 35 8. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la concentración de la grelina en la solución está en el intervalo de 0,03 nmol/ml a 6 μ mol/ml.
9. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la grelina es la sal del ácido acético.
- 40 10. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la grelina es grelina humana.
11. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además contiene un antiadsorbente.
- 45 12. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la concentración del antiadsorbente está en el intervalo de entre el 0,001% y el 5%.
13. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en la que el antiadsorbente es un tensioactivo.
- 50 14. Composición farmacéutica que contiene la grelina en la que está contenido el polvo obtenido mediante secado de una solución de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 55 15. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el polvo es un polvo liofilizado.
16. Procedimiento para impedir la degradación del grupo hidrófobo de la grelina en una solución que contiene la grelina que comprende ajustar el pH de la solución en el intervalo de entre 3 y 5.
- 60 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que también se incluye un agente tamponante o de ajuste del pH.
- 65 18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que se incluye uno o más agentes de ajuste del pH que se seleccionan del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido glucónico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco acuoso, ácido cítrico, monoetanolamina, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido málico, ácido propiónico, ácido

trifluoroacético y sus sales.

- 5 19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, que incluye uno o más agentes tamponantes que se seleccionan del grupo que consiste en glicina, ácido acético, ácido cítrico, ácido bórico, ácido ftálico, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y sus sales.
- 10 20. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que la concentración del agente tamponante o de ajuste del pH en la solución está en el intervalo de 0,01 mM a 1000 mM.
- 15 21. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que la solución es una solución tampón.
- 20 22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la solución tampón es tampón clorhidrato de glicina, tampón acetato, tampón citrato, tampón lactato, tampón fosfato, tampón ácido cítrico-fosfato, tampón fosfato-acetato-borato o tampón ftalato.
- 25 23. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que la concentración de la grelina en la solución está en el intervalo de entre 0,03 nmol/ml y 6 μ mol/ml.
24. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que la grelina es la sal del ácido acético.
- 25 25. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en el que la grelina es grelina humana.

FIGURA 1

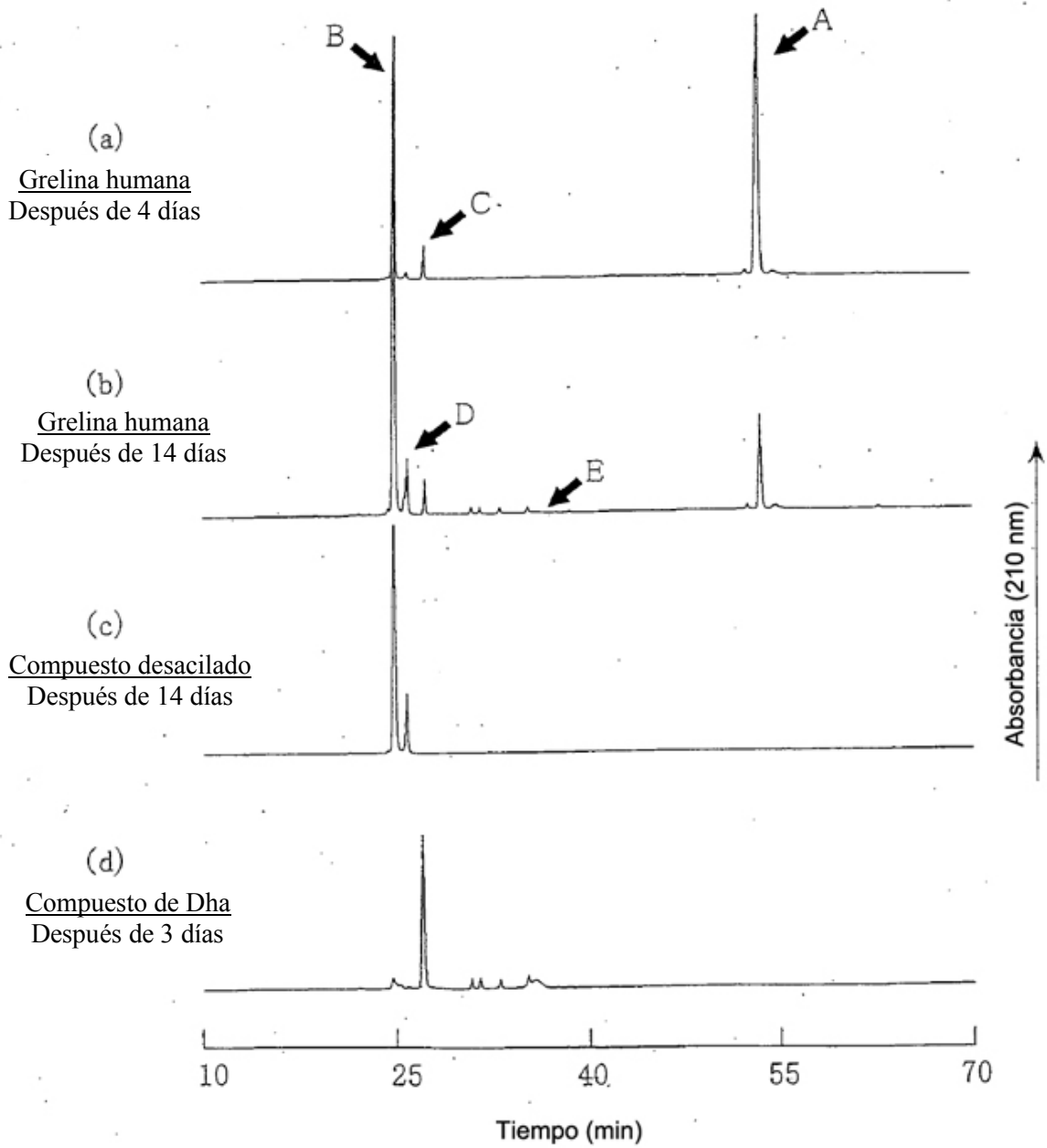


FIGURA 2

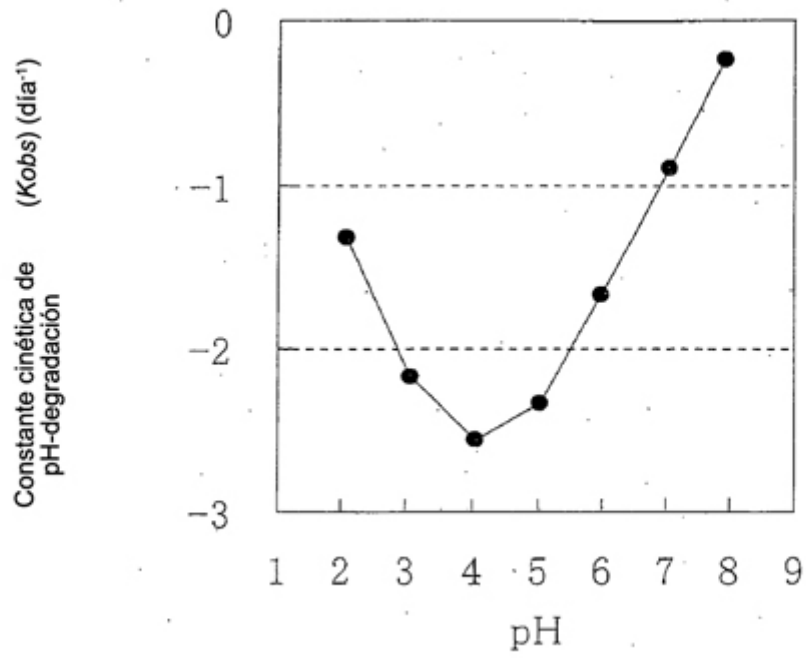


FIGURA 3

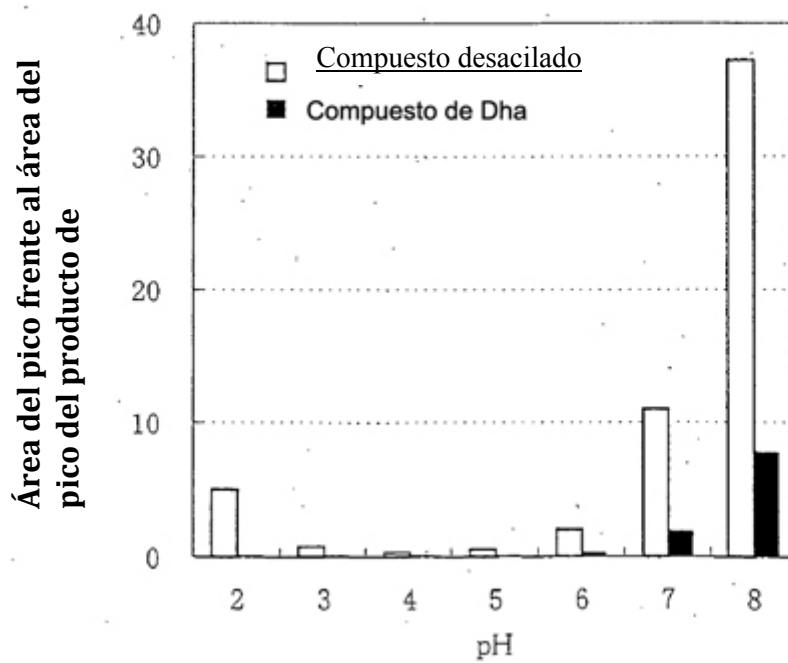


FIGURA 4

