

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 326**

51 Int. Cl.:

A61K 38/25 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2005** **PCT/JP2005/015362**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2006** **WO06022301**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2005** **E 05774895 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016** **EP 1800689**

54 Título: **Preparación líquida de péptido fisiológicamente activo**

30 Prioridad:

24.08.2004 JP 2004244339

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

28.06.2017

73 Titular/es:

KANGAWA, KENJI (50.0%)
4-2 Onoharahigashi 6-chome
Osaka 562-0031, JP y
DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

MATSUMOTO, MASARU;
MATSUMOTO, MASAKO;
HANADA, TAKESHI y
WAKABAYASHI, NAOMI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 620 326 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

Preparación líquida de péptido fisiológicamente activo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de una disolución acuosa que comprende grelina.

10 **Antecedentes de la técnica**

Actualmente están disponibles en el mercado preparaciones farmacéuticas de una variedad de péptidos fisiológicamente activos o proteínas fisiológicamente activas. Entre tales péptidos fisiológicamente activos o proteínas fisiológicamente activas están la insulina, las hormonas de crecimiento, el péptido natriurético auricular, la calcitonina, los análogos de LHRH, la hormona paratiroidea y los derivados de hormona adrenocorticotropa. Puesto que estos compuestos se desactivan en el tracto gastrointestinal mediante la acción de proteasas, rara vez se administran en preparaciones orales; la mayoría se formulan como preparaciones parenterales tales como inyecciones para uso clínico.

El tratamiento continuo, a largo plazo de enfermedades mediante inyección requiere que los pacientes visiten un hospital o clínica para recibir tratamiento y supone una carga significativa para los pacientes. Por tanto, se han deseado inyecciones subcutáneas que los pacientes puedan administrarse ellos mismos. Sin embargo, los fármacos administrados mediante inyección subcutánea se descomponen por proteasas durante el proceso de absorción subcutánea y su biodisponibilidad generalmente es menor que la lograda mediante inyección intravenosa.

Para compensar la baja biodisponibilidad de los fármacos, las inyecciones subcutáneas actualmente usadas contienen dosis aumentadas de fármacos o requieren una administración frecuente en comparación con la administración intravenosa. Por tanto, las inyecciones subcutáneas siguen siendo estresantes para los pacientes. Tal como se usa en el presente documento, el término "disponibilidad biológica (*biological availability*, BA)" se refiere a qué cantidad del fármaco administrado alcanza la circulación sanguínea (también denominado grado de biodisponibilidad (EBA)).

La grelina, un secretagogo de hormona de crecimiento endógeno (GHS) que se une al receptor de secretagogo de hormona de crecimiento (GHS-R), es un péptido fisiológicamente activo aislado por primera vez del estómago de rata en 1999 (documento no de patente 1). Se aislaron posteriormente grelinas con estructuras primarias similares de, o se sugirió mediante análisis de ADNc que estaba presente en, otros vertebrados, incluyendo humanos, ratones, cerdos, pollos, anguila, vacas, caballos, ovejas, ranas, trucha arcoiris y perros. Sus estructuras primarias se mostraron en la tabla 1. También se ha aislado grelina de gatos y perros.

(Tabla 1)

Humano	GSS(n-octanoil)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
Rata	GSS(n-octanoil)FLSPEHQVQQRKESKKPPAKLQPR
Ratón	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
Porcino	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
Bovino	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKQVQQRKESKKPAALKPR
Ovino	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQRKEAKKPSGRLLKPR
Cánido	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLLKPR
Anguila	GSS(n-octanoil)FLSPSQRPGKDKKPPRV-NH ₂
Trucha	GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQVRQGKGKPPRV-NH ₂
Pollo	GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQGKGKPPRV-NH ₂
Rana toro	GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQKGTRKPTAR
Tilapia	GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQKDKTRKPTAR
Pez gato	GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQKDKTRKPTARLH
Equino	GLT(n-octanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNM
	GLT(n-decanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNM
	GLT(n-octanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNMN
	GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQNKVKSSRI-NH ₂
	GSS(n-octanoil)FLSPTQKPQNRGDRKPPRV-NH ₂
	GSS(n-octanoil)FLSPTQKPQNRGDRKPPRVG
	GSS(n-butanoil)FLSPEHHINQHRKESKKPPAKLKPR

(En la tabla 1, los residuos de aminoácido se indican mediante los códigos de una sola letra de la IUPAC/IUC).

La grelina endógena encontrada en estos animales es un péptido que tiene una estructura modificada hidrófoba

única en la que el residuo de serina (S) o treonina (T) en la posición 3 está acilado con un ácido graso tal como ácido octanoico y ácido decanoico. La grelina se une al receptor de secretagogo de hormona de crecimiento aumentando el nivel intracelular de iones de calcio. Estudios han revelado que la grelina es un secretagogo de hormona de crecimiento potente que modula la secreción de hormona de crecimiento. Por tanto, los papeles fisiológicos y las posibles aplicaciones farmacéuticas de la grelina han atraído un interés significativo (documento de patente 1). En la presente invención, todos los tipos de grelinas que se producen de manera natural se denominan conjuntamente "grelina".

Los análogos o derivados de grelina obtenidos mediante delección parcial o sustitución de grelina animal natural han atraído también mucha atención como tratamiento para diversas enfermedades (documento de patente 3).

En derivados de grelina, la estructura modificada hidrófoba no contiene un grupo octanoilo (C_8) como en la grelina natural, sino una estructura modificada diferente, tal como la que contiene un ácido graso que tiene de 2 a 20, preferiblemente de aproximadamente 4 a 12 átomos de carbono, incluyendo, por ejemplo, un grupo hexanoilo (C_6), un grupo decanoilo (C_{10}) y un grupo dodecanoilo (C_{12}), la que contiene un ácido graso ramificado o derivados insaturados del mismo, la que contiene un anillo aromático, tal como un grupo fenilpropionilo, y la que contiene una estructura principal de adamantano. Aunque la estructura modificada hidrófoba de la grelina animal natural está unida a la estructura principal del péptido por medio de una unión éster, esta unión puede proporcionarse por una unión éster, éter, tioéter, amida o disulfuro en derivados de grelina (documento de patente 1).

A pesar de las altas expectativas para la aplicación de las grelinas que comprenden grelina, derivados de grelina y análogos de grelina en productos farmacéuticos, no se han diseñado aún composiciones farmacéuticas viables y sigue desconociéndose mucho todavía sobre la farmacocinética de los compuestos.

En lo que respecta a las composiciones farmacéuticas que usan grelinas, el documento de patente 2 describe el efecto del pH sobre disoluciones acuosas de grelinas, así como un método para impedir la descomposición de la estructura modificada hidrófoba de las grelinas. Según el documento de patente 2, las grelinas son estables en una disolución acuosa en un intervalo de pH de 2 a 7. El pH de la disolución puede ajustarse mediante tampones y agentes de ajuste del pH. El tampón se usa para minimizar el cambio de pH de la disolución acuosa durante el almacenamiento. Entre los tampones que se describen en el documento de patente 2 están tampón glicina-ácido clorhídrico, tampón ácido acético, tampón ácido cítrico, tampón ácido láctico, tampón ácido fosfórico, tampón ácido cítrico-ácido fosfórico, tampón ácido fosfórico-ácido acético-ácido bórico y tampón ácido ftálico (documento de patente 2, p. 11, líneas 5-14).

En ejemplos descritos en el documento de patente 2, se somete a prueba la estabilidad de la grelina en tampón de McIlvaine (una mezcla de ácido cítrico acuoso y una disolución acuosa de hidrogenofosfato de disodio), tampón de Britton-Robinson (una mezcla de ácido fosfórico/ácido acético/ácido bórico acuoso y una disolución acuosa de hidróxido de sodio), tampón ácido cítrico, tampón glicina-ácido clorhídrico y tampón ácido acético. Aunque el documento de patente 2 describe que la estabilidad de las grelinas en cada disolución se garantizaba manteniendo el pH de la disolución dentro de un intervalo de 2 a 7, no se menciona nada sobre la cinética del compuesto cuando se administra a los pacientes.

El documento EP 1 506 786 A1 se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen grelina.

El documento EP 0 736 303 A2 se refiere a disoluciones acuosas de interferón.

En el diseño de composiciones farmacéuticas que contienen un péptido o una proteína, es importante garantizar la estabilidad del péptido o la proteína antes de la administración puesto que los péptidos y las proteínas son generalmente inestables en disoluciones acuosas. Sin embargo, es más importante diseñar una preparación que pueda provocar eficazmente la actividad del compuesto administrado.

Documento de patente 1: Publicación de patente internacional n.º WO 01/07475

Documento de patente 2: Publicación de patente internacional n.º WO 03/097083

Documento de patente 3: Traducción japonesa publicada de solicitud PCT n.º 2004-514651

Documento de patente 4: Publicación de patente japonesa n.º Sho 63-40166

Documento de patente 5: Patente japonesa n.º 2643426

Documento de patente 6: Traducción japonesa publicada de solicitud PCT n.º 2004-522803

Documento de patente 7: Publicación de patente japonesa n.º Hei 2-19092

Documento de patente 8: Publicación de patente japonesa n.º 5-24129

Documento de patente 9: Patente japonesa n.º 3120987

Documento no de patente 1: Kojima *et al.*, Nature, vol. 402, págs. 656-660, 1999

Documento no de patente 2: Tokihiro *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., vol. 52, págs. 911-917, 2000

Divulgación de la invención

PROBLEMAS QUE VAN A SOLUCIONARSE MEDIANTE LA INVENCION

Un péptido fisiológicamente activo, grelina, es susceptible a la digestión por proteasas y se administra, por tanto, preferiblemente por vías parenterales, en particular, mediante inyección. Incluso cuando la grelina se administra mediante inyección, en la administración subcutánea todavía es necesario garantizar que la grelina inyectada se absorbe del sitio de inyección y alcanza la circulación sanguínea. Sin embargo, en general, la baja BA de los péptidos inyectados por vía subcutánea hace que sea difícil diseñar inyecciones eficaces.

Están realizándose estudios actualmente para determinar las dosis eficaces de grelina para obtener un efecto farmacológico particular según la relación entre la cantidad administrada de fármacos y el efecto farmacológico obtenido como índice. Es necesario controlar el nivel en sangre de fármacos, así como establecer la tecnología de preparación para aumentar la absorción del fármaco, para lograr una administración segura y eficaz de los fármacos.

Se sabe generalmente que la BA de los péptidos inyectados por vía subcutánea es de aproximadamente el 20 % al 40 %, que es inferior a la BA de otros fármacos. Se examinó la BA de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas y monos y se encontró que la BA de grelina era significativamente inferior a la de otros péptidos inyectados por vía subcutánea: como máximo el 5 % en ratas y como máximo el 3 % en monos. Ningún estudio previo ha notificado este hecho.

Los posibles factores para el cambio en la tasa de BA de un fármaco dado son la eficacia y la tasa de transferencia del fármaco desde el sitio de aplicación hasta la sangre periférica cercana. Estos factores dependen de propiedades del fármaco y el sitio de aplicación, incluyendo el peso molecular, pKa y la solubilidad en grasa y otras propiedades fisicoquímicas que determinan la difusibilidad del fármaco en fluidos corporales y tejidos y la permeabilidad del fármaco a través de membranas biológicas, así como la morfología histológica y las propiedades fisiológicas del sitio de aplicación.

Una BA baja de un fármaco dado debe compensarse aumentando la dosis y la frecuencia de administración para lograr un nivel en plasma eficaz del fármaco. Puesto que esto supone una carga significativa para los pacientes, es necesaria tecnología de preparación para aumentar la BA del fármaco.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es garantizar una alta BA de proteínas o péptidos fisiológicamente activos, incluyendo grelina, administrándose éstos como fármacos, y proporcionar una preparación líquida eficaz de los péptidos o las proteínas. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para mejorar la BA de proteínas o péptidos fisiológicamente activos, incluyendo grelina, inyectándose estos por vía subcutánea en disoluciones acuosas.

MEDIOS PARA SOLUCIONAR LOS PROBLEMAS

En un esfuerzo por lograr estos objetos, los presentes inventores examinaron el nivel en sangre de grelinas tras la administración mediante inyección.

Específicamente, se administró grelina junto con diferentes agentes auxiliares usados en inyecciones y se monitorizó su BA. Los agentes auxiliares usados incluían manitol como agente isotónico, urea como agente de solubilización y un tampón acetato de sodio (pH 4,0). Se mezclaron estos agentes con grelina y se inyectaron por vía subcutánea en ratas. Resultó que el tampón acetato de sodio (pH 4,0) aumentaba significativamente la BA hasta el 35,3 %. No se observaron aumentos significativos en la BA para los otros agentes sometidos a prueba: el mayor aumento fue del 3,4 % mediante la urea.

Entonces se administró grelina con diferentes disoluciones ácidas y se monitorizó su BA. Tal como resultó, la BA aumentó para cada disolución sometida a prueba.

Se demostró, por tanto, que la BA de grelina puede aumentarse significativamente inyectándola por vía subcutánea con una disolución ácida.

Se demostró también que la BA de grelina puede controlarse variando el tipo, la concentración y el pH de la disolución ácida. También se encontró que la BA de grelina puede mejorarse en un grado diferente dependiendo del tipo de la disolución ácida. Esto sugiere que factores distintos del tipo y el pH de la preparación de grelina o

disolución de grelina están implicados en la mejora de la BA de grelina.

También se encontró que la BA de grelina mejora significativamente inyectándola por vía subcutánea con un líquido orgánico polar.

También se encontró que el aumento en la BA de grelina es más significativo cuando la grelina se administra con tanto la disolución ácida como el líquido orgánico polar que cuando se administra con una cualquiera de las dos.

También se encontró que la BA de grelina aumenta significativamente inyectándola por vía subcutánea con la disolución ácida y un azúcar, o con el líquido orgánico polar y un azúcar.

También se encontró que la capacidad de la disolución ácida y/o el líquido orgánico polar y/o el azúcar para aumentar la BA se observa no sólo con grelina, sino también con otras proteínas o péptidos fisiológicamente activos para su uso como fármacos.

Por consiguiente, la presente invención se define tal como sigue:

1. Una preparación líquida, que es una disolución acuosa, que comprende grelina como principio activo en combinación con tanto una disolución ácida como un líquido orgánico polar, en la que la disolución ácida comprende uno seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido láctico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido butírico y sales de los mismos; en la que el líquido orgánico polar es del grupo que consiste en alcohol bencílico, fenol, terc-butanol, N-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida y dimetilsulfóxido; y en la que la preparación líquida tiene un pH en un intervalo de 3,0 a 7,0 para su uso en un método de inyección subcutánea o inyección intramuscular.

2. La preparación líquida para el uso según el punto 1, en la que la concentración del líquido orgánico polar es de desde el 0,1 hasta el 10 % (p/v).

3. La preparación líquida para el uso según el punto 1 ó 2, que contiene además un azúcar seleccionado del grupo que consiste en manitol, sacarosa, glucosa y ciclodextrina.

4. La preparación líquida para el uso según el punto 3, en la que el azúcar es ciclodextrina.

5. La preparación líquida para el uso según el punto 3 ó 4, en la que la concentración del azúcar es de desde el 0,1 hasta el 20 % (p/v).

6. La preparación líquida para el uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en la que la grelina es grelina humana.

7. La preparación líquida para el uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que la concentración de la grelina es de desde 0,03 nmol/ml hasta 15 µmol/ml.

EFFECTO DE LA INVENCION

Según la presente invención, se proporciona el uso de una preparación líquida eficaz, que es una disolución acuosa, que logra una alta biodisponibilidad (BA) de grelina fisiológicamente activa, que se administra como fármaco.

Por tanto, la presente invención hace posible mantener el nivel en sangre de grelina fisiológicamente activa que se inyecta por vía subcutánea: Hasta la fecha, se ha considerado difícil mantener niveles en plasma terapéuticamente eficaces de grelina inyectada por vía subcutánea. La presente invención es, por tanto, de importancia médica significativa.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La preparación líquida para el uso de la presente invención que contiene como principio activo una grelina fisiológicamente activa, se describirá ahora en detalle, así como, en un aspecto de referencia, el método para mejorar la BA de una proteína o un péptido fisiológicamente activo.

La grelina para su uso en la presente invención son secretagogos de hormona de crecimiento endógenos (GHS): Es un péptido que actúa aumentando el nivel intracelular de iones de calcio e induciendo la secreción de hormona de crecimiento. El término "grelina" tal como se usa en el presente documento abarca todos los derivados de grelina que resultan de la inserción, delección, sustitución y/o adición en la secuencia de aminoácidos de la estructura principal del péptido de grelina que se produce de manera natural en animales y que tienen actividades fisiológicas equivalentes a la grelina natural.

La grelina natural para su uso en la presente invención es preferiblemente una grelina natural derivada de humanos, ratas, cerdos, pollos, anguila, vacas, caballos, ovejas, ranas, trucha arcoíris y perros. Los derivados de grelina

adecuados para su uso en la presente invención incluyen aquellos en los que el residuo de serina en la posición 3 no está acilado con grupo octanoilo, sino con un ácido graso que tiene de 4 a 12 átomos de carbono, o des-octanoilgrelina que no tiene la modificación de octanoilo en el residuo de serina en la posición 3.

- 5 Se usa preferiblemente grelina humana cuando la preparación líquida está destinada para su administración a pacientes humanos.

10 Puede proporcionarse grelina en forma de un péptido libre o una sal. La grelina en forma de péptido libre y en forma de sal pueden convertirse una en otra mediante técnicas comunes. El péptido libre puede convertirse en una sal farmacéuticamente aceptable haciéndolo reaccionar con un ácido inorgánico o un ácido orgánico. Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales formadas con ácidos inorgánicos, tales como carbonatos, bicarbonatos, clorhidratos, sulfatos, nitratos y boratos, y sales formadas con ácidos orgánicos, tales como succinatos, acetatos, propionatos y trifluoroacetatos.

15 El péptido puede formar también sales con bases inorgánicas incluyendo metales alcalinos tales como sodio y potasio y metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, o bases orgánicas incluyendo aminas orgánicas tales como trietilamina, y aminoácidos básicos tales como arginina. El péptido puede formar también un complejo de metal (tal como complejo de cobre y complejo de zinc).

20 La grelina para su uso en la presente invención puede ser de cualquier origen: Puede aislarse de materias primas naturales, o puede obtenerse mediante técnicas comunes tales como síntesis química, semisíntesis química, recombinación génica o combinaciones de estas técnicas. Alternativamente, puede extraerse de organismos vivos. Un ejemplo de tales técnicas se describe en el documento de patente 1.

25 La grelina puede usarse en la preparación líquida para el uso de la presente invención a cualquier concentración adecuada para su uso en productos farmacéuticos. Específicamente, la concentración mínima de grelinas se define como la concentración a la que puede proporcionarse el efecto deseado como productos farmacéuticos mientras que la concentración máxima se define como la concentración a la que puede disolverse completamente en una disolución acuosa. La concentración de grelina en la preparación líquida está preferiblemente en el intervalo comúnmente usado de aproximadamente 0,03 nmol/ml a aproximadamente 15 μ mol/ml, y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,03 nmol/ml a aproximadamente 6 μ mol/ml.

30 La disolución ácida para su uso en la preparación líquida para el uso de la presente invención es una disolución de un compuesto que contiene carboxilo. La disolución ácida comprende uno seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido butírico y ácido fosfórico, y sales de los mismos.

35 La concentración de la disolución ácida puede ser cualquier concentración que pueda aumentar la BA de grelina: Está preferiblemente en el intervalo de 1 mM a 1000 mM y más preferiblemente en el intervalo de 10 mM a 500 mM.

40 Se prefiere que el cambio en el pH de la disolución acuosa se mantenga tan pequeño como sea posible con el fin de garantizar la estabilidad de la grelina durante el almacenamiento. Para este fin, puede usarse un tampón. El tampón tiene preferiblemente un pH en el intervalo de 3,0 a 7,0. Aunque el pH de la preparación líquida se estabiliza tras la adición del tampón, el pH puede variar en de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 debido a la concentración del tampón usado en condiciones específicas. La presente invención también abarca tal variación.

45 Los ejemplos específicos del tampón para su uso en la presente invención incluyen tampón ácido acético (incluyendo tampón acetato de sodio y tampón acetato de amonio), tampón ácido láctico, tampón ácido fosfórico (incluyendo tampón fosfato de sodio), tampón clorhidrato de glicina, tampón ácido cítrico (incluyendo tampón citrato de sodio), tampón ácido cítrico-ácido fosfórico (incluyendo tampón de McIlvaine), tampón ácido fosfórico-ácido acético-ácido bórico (incluyendo tampón de Britton-Robinson), tampón ácido ftálico y tampón ácido propiónico. Estos tampones pueden usarse o bien individualmente o bien en combinación. Tampón ácido acético, tampón ácido butírico, tampón ácido propiónico, tampón ácido láctico y/o tampón ácido fosfórico son particularmente adecuados para su uso en la presente invención.

50 La preparación líquida tiene preferiblemente un pH en el intervalo de 3,0 a 7,0 y más preferiblemente en el intervalo de 4,0 a 7,0. Aunque una preparación líquida con un pH menor de 3,0 puede aumentar la BA de grelina, puede provocar dolor especialmente cuando se usa como inyección y no se desea.

55 Además del tampón descrito anteriormente, puede usarse un agente de ajuste del pH para ajustar el pH de la preparación líquida para el uso de la presente invención. Los ejemplos del agente de ajuste del pH incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bórico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido glucónico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco 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.

60 Se usa un líquido orgánico polar en la presente invención. La adición del líquido orgánico polar sirve para aumentar

la BA de grelina inyectada por vía subcutánea más de lo que lo haría la disolución ácida sola. El hallazgo de los inventores es que la adición de un líquido orgánico polar, tal como un alcohol, a la preparación líquida para el uso de la presente invención puede aumentar la BA de grelina o modular el patrón de absorción de grelina. El líquido orgánico polar usado en la presente invención es del grupo que consiste en alcohol bencílico, fenol, terc-butanol, N-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida y dimetilsulfóxido.

Las inyecciones deben ser estériles. Puede añadirse un conservante o esterilizante a una inyección especialmente cuando la inyección se usa en múltiples usos. Los ejemplos del aditivo usado para este fin incluyen alcohol bencílico, clorobutanol, fenol y paraoxibenzoatos.

Puesto que la administración de inyecciones va acompañada a menudo de dolor, una inyección puede contener un agente de alivio del dolor para aliviar el dolor. Los ejemplos del aditivo usado para este fin incluyen alcohol bencílico, clorobutanol, fenol y anestésicos locales tales como procaína y xilocaína.

El documento de patente 4 describe una inyección que contiene, además de un principio activo, alcohol bencílico o su análogo como agente de alivio del dolor, y ciclodextrina. Se usa alcohol bencílico para reducir el dolor asociado con una inyección. Se usa alcohol bencílico o su análogo para prevenir la hemólisis provocada por el alcohol bencílico.

Se usan a menudo alcoholes como conservantes, esterilizantes o agentes de alivio del dolor. Los presentes inventores han encontrado que los alcoholes y otros líquidos orgánicos polares potencian la capacidad de la disolución ácida para aumentar la BA de grelina en la preparación líquida. Ningún estudio previo ha notificado este fenómeno único.

Estos líquidos orgánicos polares pueden usarse o bien individualmente o bien en combinación. El líquido orgánico polar puede usarse en cualquier cantidad que proporcione su efecto previsto y que no plantee ningún problema durante la producción y el almacenamiento a largo plazo de los fármacos para el uso de la presente invención. La cantidad del líquido orgánico polar es tal que cuando se forma la preparación líquida para dar una disolución para su administración, la concentración del líquido orgánico polar en la disolución está normalmente en el intervalo del 0,001 al 80 % (p/v) y preferiblemente en el intervalo del 0,1 al 20 % (p/v).

También pueden añadirse otros aditivos a la preparación líquida para el uso de la presente invención dependiendo del fin deseado. Entre tales aditivos están agentes isotónicos, tales como cloruro de sodio y manitol, esterilizantes, tales como benzoato de sodio, antioxidantes, tales como bisulfito de sodio, pirosulfito de sodio y ácido ascórbico, y agentes de alivio del dolor, tales como clorhidrato de lidocaína y clorhidrato de mepirilcaína.

Tal como se describe, la presente invención proporciona el uso de la preparación líquida que contiene como principio activo una grelina fisiológicamente activa y que garantiza una alta BA. Pueden añadirse aditivos a la preparación líquida para proporcionar las propiedades requeridas para cada preparación. Por ejemplo, se añaden determinados aditivos a las inyecciones para proporcionar una presión osmótica óptima, solubilidad óptima, baja irritación, alto efecto esterilizante y prevención de la adsorción.

La preparación líquida para el uso según la presente invención está prevista para inyección subcutánea e inyección intramuscular, el aumento en la BA es lo más significativo en inyección subcutánea e inyección intramuscular.

La preparación líquida para el uso de la presente invención puede producirse mediante procedimientos comúnmente usados en la producción de productos farmacéuticos. En un proceso a modo de ejemplo, se disuelve un producto liofilizado de una proteína o un péptido fisiológicamente activo, incluyendo grelina, en agua purificada para formar una disolución de fármaco. Mientras tanto, se disuelven un tampón y otros aditivos en agua purificada para formar una disolución de aditivos. La disolución de fármaco y la disolución de aditivos se mezclan entre sí y la mezcla se procesa según se requiera (por ejemplo, esterilización y filtración). La mezcla procesada se sella en ampollas o viales para obtener un producto terminado de preparación de grelina.

A menudo se preparan inyecciones en forma de una preparación que se forma para dar una disolución con el uso. Este tipo de preparación es deseable cuando es difícil mantener la estabilidad de principios activos en forma de una disolución. La presente invención también abarca el uso de una preparación disuelta con el uso que puede formarse para dar una preparación líquida que contiene como principio activo una grelina fisiológicamente activa. La preparación disuelta con el uso puede producirse mediante cualquiera de los siguientes dos procedimientos: Los aditivos descritos anteriormente se seleccionan y añaden apropiadamente en cantidades deseadas a un producto de grelina sólida, tal como grelina en polvo, para formar una composición sólida, o los aditivos descritos anteriormente se seleccionan y añaden apropiadamente en cantidades deseadas a una disolución acuosa de grelina para formar una composición líquida, que a su vez se seca para preparar una composición sólida. Con el uso, estas composiciones sólidas se disuelven en un disolvente tal como agua para formar una preparación líquida. Pueden usarse también disolventes distintos de agua, tales como etanol y 2-propanol, en cantidades farmacéuticamente aceptables.

También puede añadirse un azúcar a la preparación para el uso de la presente invención cuando la grelina fisiológicamente activa se proporciona en forma de una composición sólida. Se ha encontrado que, cuando se usa conjuntamente con la disolución ácida y/o el líquido orgánico polar, el azúcar sirve para aumentar adicionalmente la BA de la proteína o el péptido fisiológicamente activo, incluyendo grelina.

Los ejemplos del azúcar para su uso en la presente invención incluyen monosacáridos, tales como manitol, glucosa, fructosa, inositol, sorbitol y xilitol; disacáridos, tales como sacarosa, lactosa, maltosa y trehalosa; polisacáridos, tales como almidón, dextrano, pululano, ácido alginico, ácido hialurónico, ácido péctico, ácido fítico, fitina, quitina y quitosano; dextrinas, tales como α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, dextrina, hidroxipropilalmidón e hidroxietilalmidón; y celulosas, tales como metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio. Estos azúcares pueden usarse o bien individualmente o bien en combinación.

De estos azúcares, se prefieren particularmente manitol, sacarosa, glucosa y ciclodextrina para su uso en la presente invención siendo la ciclodextrina la más preferida.

Se ha notificado que, de las diferentes ciclodextrinas, los derivados de sulfobutiléter- β -ciclodextrina (β -CyDs) actúan aumentando la BA de insulina inyectada por vía subcutánea en ratas (documento no de patente 2).

Se sabe bien que, cuando se añaden a productos farmacéuticos, las ciclodextrinas mejoran la solubilidad de compuestos menos solubles en agua y la estabilidad en almacenamiento de los productos farmacéuticos.

El documento de patente 6 describe una preparación que contiene un polipéptido de interferón y sulfoalquiléterciclodextrina. En esta preparación, el derivado de sulfoalquiléterciclodextrina sirve como estabilizador de la composición y ayuda a mantener la actividad biológica del polipéptido de interferón.

El documento de patente 7 describe una preparación nasal que contiene un polipéptido fisiológicamente activo y ciclodextrina mientras que el documento de patente 8 describe una preparación vaginal que contiene un polipéptido fisiológicamente activo y ciclodextrina. La preparación nasal y la preparación vaginal se desarrollan cada una como una preparación no de inyección que facilita la absorción por la mucosa del polipéptido fisiológicamente activo, que de lo contrario se hidroliza por enzimas presentes en la luz o la pared gastrointestinal. En estas preparaciones, la ciclodextrina actúa facilitando la absorción de polipéptidos fisiológicamente activos.

El documento de patente 9 describe un método para solubilizar y estabilizar interferón y otras proteínas con la ayuda de β - y γ -ciclodextrinas. Sin embargo, ninguno de estos documentos sugiere o da a conocer la presente invención para aumentar la BA de proteínas o péptidos fisiológicamente activos inyectados por vía subcutánea.

Estos azúcares pueden usarse o bien individualmente o bien en combinación. El azúcar puede usarse en cualquier cantidad que proporcione su efecto previsto, que no plantee ningún problema durante la producción y el almacenamiento a largo plazo del fármaco, y que proporcione a la preparación líquida una viscosidad apropiada que no plantee ningún problema durante la producción y administración de la preparación líquida. Por ejemplo, la cantidad del azúcar es tal que cuando se forma la preparación líquida para dar una disolución para su administración, la concentración del azúcar en la disolución está en el intervalo del 0,1 al 20 % (p/v).

Tal como se expone, la presente invención demuestra que la adición de una disolución ácida, un líquido orgánico polar o un azúcar a una preparación líquida que contiene una proteína o un péptido fisiológicamente activo puede aumentar significativamente la BA del péptido o la proteína incluso cuando la preparación se inyecta por vía subcutánea. La proteína o el péptido fisiológicamente activo para su uso en la presente invención es grelina y derivados y análogos de la misma. La presente invención ofrece un nuevo modo de administración por vía subcutánea de grelina fisiológicamente activa, que de lo contrario no puede administrarse por vía subcutánea para lograr niveles en plasma farmacéuticamente eficaces.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora en detalle adicional con referencia a los ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención de ningún modo.

Las abreviaturas usadas en los siguientes ejemplos tienen los significados descritos a continuación. A menos que se especifique otra cosa, se usaron los siguientes métodos e instrumentos en las pruebas.

[Instrumentos usados]

(A) Medición del pH

Instrumento: peachímetro CASTANY LAB F-22, Horiba Ltd.

(B) Radioinmunoensayo (RIA)

Instrumento: contador γ COBRA-II, Packard Instruments Co., Ltd.

5 (C) Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Instrumento: Lector de microplacas, Molecular Devices Corp.

10 Ejemplo comparativo 1: Preparación de preparaciones que contienen grelina humana (1)

Se disolvió grelina humana en una disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v), solución salina fisiológica o una disolución acuosa de sacarosa al 10 % (p/v) a diferentes concentraciones tal como se muestra en la tabla 2 a continuación para preparar las preparaciones n.º 1 a 5 y n.º 34 y 35.

15 (Tabla 2)

Preparación n.º	Disoluciones	Concentración de grelina humana
1	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	5 $\mu\text{g/ml}$
2	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	20 $\mu\text{g/ml}$
3	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	50 $\mu\text{g/ml}$
4	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	1.000 $\mu\text{g/ml}$
5	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	2.000 $\mu\text{g/ml}$
34	Solución salina fisiológica	50 $\mu\text{g/ml}$
35	Disolución acuosa de sacarosa al 10 % (p/v)	50 $\mu\text{g/ml}$

Ejemplo 1: Preparación de preparaciones que contienen grelina humana (2)

20 Se prepararon los siguientes tampones tal como se describe a continuación: tampón acetato de sodio 0,5 M, tampón acetato de amonio 0,5 M, tampón ácido acético 0,5 M, tampón fosfato de sodio 0,5 M, tampón ácido cítrico 0,5 M, tampón clorhidrato de glicina 0,5 M, tampón ácido láctico 1 M, tampón ácido propiónico 0,06 M y tampón ácido n-butírico 0,06 M. El pH de cada tampón se muestra entre paréntesis.

25 (1) Tampón acetato de sodio 0,5 M (pH 7,0)

Se añadió agua purificada a 8,20 g de acetato de sodio (PM = 82,03) hasta un volumen de 100 ml. A esta disolución, se le añadió ácido clorhídrico 1 M hasta un pH de 7,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 200 ml.

30 (2) Tampón acetato de sodio 0,5 M (pH 4,0)

Se añadió agua purificada a 8,20 g de acetato de sodio (PM = 82,03) hasta un volumen de 100 ml. A esta disolución, se le añadió ácido clorhídrico 1 M hasta un pH de 4,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 200 ml.

(3) Tampón acetato de sodio 0,5 M (pH 5,0)

Se añadió agua purificada a 8,20 g de acetato de sodio (PM = 82,03) hasta un volumen de 100 ml. A esta disolución, se le añadió ácido clorhídrico 1 M hasta un pH de 5,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 200 ml.

(4) Tampón acetato de sodio 0,5 M (pH 6,0)

45 Se añadió agua purificada a 8,20 g acetato de sodio (PM = 82,03) hasta un volumen de 100 ml. A esta disolución, se le añadió ácido clorhídrico 1 M hasta un pH de 6,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 200 ml.

50 (5) Tampón acetato de amonio 0,5 M (pH 4,0)

Se añadió agua purificada a 7,71 g de acetato de amonio (PM = 77,08) hasta un volumen de 100 ml. A esta disolución, se le añadió ácido clorhídrico 1 M hasta un pH de 4,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 200 ml.

55 (6) Tampón ácido acético 0,5 M (pH 4,0)

Se añadió agua purificada a 6,01 g de ácido acético (PM = 60,05) hasta un volumen de 100 ml. A esta disolución, se

le añadió hidróxido de sodio 1 M hasta un pH de 4,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 200 ml.

(7) Tampón fosfato de sodio 0,5 M (pH 4,0)

Se añadió agua purificada a 15,60 g de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado (PM = 156,01) hasta un volumen de 100 ml. A esta disolución, se le añadió ácido clorhídrico 1 M hasta un pH de 4,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 200 ml.

(8) Tampón fosfato de sodio 0,5 M (pH 5,0)

Se añadió agua purificada a 15,60 g de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado (PM = 156,01) hasta un volumen de 100 ml. A esta disolución, se le añadió hidróxido de sodio 1 M hasta un pH de 5,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 200 ml.

(9) Tampón ácido cítrico 0,5 M (pH 4,0)

Se añadió agua purificada a 10,51 g de ácido cítrico monohidratado (PM = 210,14) para preparar 100 ml de ácido cítrico acuoso. Mientras tanto, se añadió agua purificada a 14,71 g de citrato de trisodio (PM = 294,10) para preparar 100 ml de disolución acuosa de citrato de trisodio. Se mezclaron entre sí el ácido cítrico acuoso y la disolución acuosa de citrato de trisodio para obtener el tampón deseado con un pH de 4,0.

(10) Tampón clorhidrato de glicina 0,5 M (pH 4,0)

Se añadió agua purificada a 7,51 g de glicina (PM = 75,07) hasta un volumen de 100 ml. A esta disolución, se le añadió ácido clorhídrico 1 M hasta un pH de 4,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 200 ml.

(11) Tampón ácido láctico 1 M (pH 4,0)

Se añadió agua purificada a 45,04 g de ácido láctico (PM = 90,08) hasta un volumen de 250 ml. A esta disolución, se le añadió hidróxido de sodio 1 M hasta un pH de 4,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 500 ml.

(12) Tampón ácido propiónico 0,06 M (pH 4,0)

Se añadió agua purificada a 2,22 g de ácido propiónico (PM = 74,08) hasta un volumen de 250 ml. A esta disolución, se le añadió hidróxido de sodio 1 M hasta un pH de 4,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 500 ml.

(13) Tampón ácido n-butírico 0,06 M (pH 4,0)

Se añadió agua purificada a 2,64 g de ácido butírico (PM = 88,11) hasta un volumen de 250 ml. A esta disolución, se le añadió hidróxido de sodio 1 M hasta un pH de 4,0. Se añadió además agua purificada hasta un volumen final de 500 ml.

Se usaron estos tampones o disoluciones obtenidas diluyendo los tampones como disoluciones ácidas. Se mezclaron entre sí las disoluciones ácidas, grelina humana y aditivos opcionales para preparar las preparaciones n.º 6 a 33, n.º 51 a 59, n.º 73 y n.º 81 a 97, que contienen grelina humana a las concentraciones mostradas en la tabla 3.

(Tabla 3.1)

Prep. n.º	Disoluciones ácidas (pH)	Conc. de grelina humana	Aditivos
6*	Tampón acetato de sodio 0,5 M (7,0)	50	Ninguno
7*	Tampón acetato de sodio 0,5 M (4,0)	50	Ninguno
8*	Tampón acetato de amonio 0,5 M (4,0)	50	Ninguno
9*	Tampón ácido cítrico 0,5 M (4,0)	50	Ninguno
10*	Tampón glicina/ácido clorhídrico 0,5 M (4,0)	50	Ninguno
11*	Tampón fosfato de sodio 0,5 M (4,0)	50	Ninguno
12*	Tampón acetato de sodio 0,5 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
13*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
14*	Tampón acetato de sodio 0,03 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)

15*	Tampón acetato de sodio 0,01 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
16*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (5,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
17*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (6,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
18*	Tampón fosfato de sodio 0,5 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
19*	Tampón fosfato de sodio 0,25 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
20*	Tampón fosfato de sodio 0,1 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
21*	Tampón fosfato de sodio 0,5M (5,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
22*	Tampón fosfato de sodio 0,25 M (5,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
23*	Tampón fosfato de sodio 0,1 M (5,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)
24*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	50	Ninguno
25*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	50	Sacarosa al 20 % (p/v)
26*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	10	Sacarosa al 10 % (p/v)
27*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	250	Sacarosa al 10 % (p/v)
28*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	2000	Sacarosa al 10 % (p/v)
29	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
30	Tampón acetato de sodio 0,03 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
31	Tampón acetato de sodio 0,03 M (4,0)	1000	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
32	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)	1000	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
33	Tampón acetato de sodio 0,03 M (4,0)	2000	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
*Ejemplos de referencia			

(Tabla 3.2)

Prep. n.º	Disoluciones ácidas (pH)	Conc. de gelatina humana	Aditivos
55	Tampón ácido láctico 0,03 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
56	Tampón ácido láctico 0,1 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
57	Tampón ácido láctico 0,5 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
58	Tampón ácido propiónico 0,03 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
59	Tampón ácido n-butírico 0,03 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
73*	Ácido benzoico 16 mM	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/
81	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 0,1 % (p/v)
82	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 3 % (p/v)
83	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)/N-metil-2-pirrolidona al 10 % (p/v)
84	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)	50	Glucosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
85	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)	50	Dextrano 70 al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
86*	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)	50	Sacarosa al 10 % (p/v)/clorobutanol al 0,5 % (p/v)
87*	Tampón fosfato de sodio 0,25 M (4,0)	50	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 10 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)
88*	Tampón acetato de sodio 0,01 M (4,0)	50	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 1 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)

89*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	50	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 1 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)
90*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	50	2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina al 1 % (p/v)
91*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	1000	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 1 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)
*Ejemplos de referencia			

(Tabla 3.3)

Prep. n.º	Disoluciones ácidas (pH)	Conc. de grelina humana	Aditivos
92*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	1000	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 1 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)
93*	Tampón acetato de sodio 0,01 M (4,0)	1000	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 10 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)
94*	Tampón acetato de sodio 0,1 M (4,0)	1000	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 10 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)
95*	Tampón acetato de sodio 0,03 M (4,0)	1000	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 1 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)/sacarosa al 10 % (p/v)
96*	Tampón acetato de sodio 0,03 M (4,0)	1000	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 4 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)/sacarosa al 10 % (p/v)
97	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)	50	Sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina al 10 % (p/v) (nombre comercial: Captizol)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)
*Ejemplos de referencia			

- 5 Se usaron los tampones anteriores o las disoluciones obtenidas diluyendo los tampones como disoluciones ácidas. Se mezclaron entre sí las disoluciones ácidas, diferentes péptidos y aditivos opcionales para preparar las preparaciones n.º 36 a 50 y n.º 98 a 107, que contienen péptidos a las concentraciones mostradas en la tabla 4.

(Tabla 4.1)

Prep. n.º	Disoluciones	Tipos de péptido	Conc. de péptido
36*	Solución salina fisiológica	Grelina de rata	20 µg/ml
37*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	Grelina de rata	50 µg/ml
38*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	Des-octanoilgrelina humana	10 µg/ml
39*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	Des-octanoilgrelina humana	50 µg/ml
40*	Solución salina fisiológica	[Ácido L-2-aminododecanoico ³]grelina humana	20 µg/ml
41*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	[Ácido L-2-aminododecanoico ³]grelina humana	50 µg/ml
42*	Solución salina fisiológica	Péptido-1 de tipo glucagón humano (hGLP-1)	30 µg/ml
43*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	Péptido-1 de tipo glucagón humano (hGLP-1)	50 µg/ml
44*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	Péptido natriurético auricular humano (hANP)	100 µg/ml
45*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	Péptido natriurético auricular humano (hANP)	100 µg/ml
46*	Disolución acuosa de glucosa al 5 % (p/v)	Adrenomedulina humana	75 µg/ml
47*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	Adrenomedulina humana	150 µg/ml
48*	Solución salina fisiológica	Hormona paratiroidea humana (hPTH(1-34))	50 µg/ml

49*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	Hormona paratiroidea humana (hPTH(1-34))	50 µg/ml
50*	Disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v)	Insulina humana	50 µg/ml
*Ejemplos de referencia			

(Tabla 4.2)

Prep. n.º	Disoluciones	Tipos de péptido	Conc. de péptido
98	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)/sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)	Grelina de rata	50 µg/ml
99*	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)/sacarosa al 10 % (p/v)/	Des-octanoilgrelina humana	50 µg/ml
100*	Sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)	Des-octanoilgrelina humana	50 µg/ml
101	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)/sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)	Des-octanoilgrelina humana	50 µg/ml
102	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)/sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)	[Ácido L-2-aminododecanoico ³]grelina humana	50 µg/ml
103*	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)/sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)	Péptido-1 de tipo glucagón humano (hGLP-1)	50 µg/ml
104*	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)/sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)	Péptido natriurético auricular humano (hANP)	100 µg/ml
105*	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)/sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)	Adrenomedulina humana	150 µg/ml
106*	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)/sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)	Hormona paratiroidea humana (hPTH(1-34))	50 µg/ml
107*	Tampón ácido acético 0,03 M (4,0)/sacarosa al 10 % (p/v)/alcohol bencílico al 1 % (p/v)	Insulina humana	50 µg/ml
*Ejemplos de referencia			

- 5 Se mezclaron entre sí grelina humana y aditivos sin disoluciones ácidas para preparar las preparaciones n.º 60 a 68, n.º 70 a 72, n.º 74, n.º 76 y n.º 78 a n.º 80.

(Tabla 5)

Prep. n.º	Azúcares	Concent. de grelina humana (µg/ml)	Aditivos
60*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Etanol al 1 % (p/v)
61*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Etanol al 10 % (p/v)
61*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Etanol al 20 % (p/v)
63*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Terc-butanol al 1 % (p/v)
64*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	N-metil-2-pirrolidona al 1 % (p/v)
65*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	N-metil-2-pirrolidona al 10 % (p/v)
66*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	N-metil-2-pirrolidona al 20 % (p/v)
67*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Dimetilformamida al 10 % (p/v)
68*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Dimetilsulfóxido al 10 % (p/v)
70*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Dodecilsulfato de sodio al 1 % (p/v) (SDS)
71*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Fenol al 0,2 % (p/v)
72*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Fenol al 1 % (p/v)
74*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Metilparabeno al 0,2 % (p/v)
76*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Propilenglicol al 1 % (p/v)
78*	Sacarosa al 10 % (p/v)	50	Alcohol bencílico al 0,1 % (p/v)

79*	Sacarosa al 10% (p/v)	50	Alcohol bencílico al 1% (p/v)
80*	Manitol al 5% (p/v)	50	Alcohol bencílico al 1% (p/v)
*Ejemplos de referencia			

Algunos de los aditivos farmacéuticos usados en las preparaciones descritas anteriormente se enumeran en la Farmacopea Japonesa. Todos estos aditivos cumplen las normas especificadas en la Farmacopea Japonesa.

5 Ejemplo comparativo 2: Farmacocinética de grelina inyectada por vía intravenosa y por vía subcutánea en ratas

Se administraron a ratas por vía intravenosa y por vía subcutánea las preparaciones n.º 2 y n.º 3 obtenidas en el ejemplo comparativo 1 y se midieron los niveles en plasma de grelina.

10 Se usaron ratas SD macho, de 7 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan Inc.). Se usó un grupo de tres ratas para las pruebas. Para administración intravenosa, se les insertó a estos animales un tubo de polietileno (PE-50, Clay Adams Co., Ltd.) en la arteria femoral. Se administró la preparación n.º 2 a través de la cola a una dosis de 0,5 ml/kg usando una jeringa y una aguja 26G (cada una disponible de Terumo Co., Ltd.). Se recogieron muestras de sangre a partir del tubo de polietileno en la arteria femoral antes de la administración y 1, 3, 15 5, 10, 20, 30, 60 y 90 minutos tras la administración.

De manera similar, se usaron estos animales con inserción de un tubo de polietileno en la arteria femoral para la administración subcutánea de la preparación n.º 3 en la piel dorsal a una dosis de 1 ml/kg usando una jeringa y una aguja 26G. Se recogieron muestras de sangre a partir del tubo de polietileno en la arteria femoral antes de la administración y 5, 10, 20 y 30 minutos tras la administración.

A cada muestra, se le añadieron una centésima parte como mucho de una disolución de EDTA·2Na·2H₂O y una cincuentaava parte como mucho de una disolución de AEBSF inmediatamente tras la recogida de la muestra. Se centrifugó entonces la muestra para separar el plasma, al que se le añadió inmediatamente una décima parte como mucho de ácido clorhídrico 1 N. Se mezcló la muestra y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Entonces se analizaron las muestras de plasma para determinar los niveles de grelina mediante radioinmunoensayo (RIA) usando un anticuerpo anti-grelina. Específicamente, se añadieron el anticuerpo anti-grelina y luego [¹²⁵I-Tyr²⁹]grelina a cada muestra de plasma para determinar la competición. Posteriormente, se añadió un anticuerpo secundario para precipitar el complejo de anticuerpo-grelina. Se separó el sobrenadante y se analizó para determinar la radioactividad mediante un contador γ (Packard Instruments Co., Ltd.). Puesto que el anticuerpo anti-grelina usado en el ensayo reconoce específicamente grelina, pero no des-acilgrelina (una forma inactiva de grelina que no tiene un grupo octanoilo), el ensayo puede detectar específicamente la grelina activa.

35 La figura 1 muestra los cambios en las concentraciones de grelina en plasma a lo largo del tiempo. Se usaron los resultados mostrados en la figura 1 para determinar los siguientes parámetros farmacocinéticos para cada vía de inyección: la concentración de grelina en plasma máxima (C_{máx}) y el tiempo que tardó en alcanzarse la concentración en plasma máxima (T_{máx}). Se extrapola la concentración (C₀) a tiempo 0 para la administración intravenosa. Usando el método trapezoidal, también se calculó el área bajo la curva de concentración (AUC) para cada vía de inyección. Entonces se usaron las AUC para determinar la biodisponibilidad (BA) de grelina. Los resultados se muestran en la tabla 6. Se obtuvieron estos valores como promedios de los datos obtenidos para las tres ratas en cada grupo.

Tabla 6: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía intravenosa o por vía subcutánea a ratas con una disolución acuosa de manitol al 5 %

(Tabla 6)

Prepar. n.º Vía de administración	Volumen de dosis (ml/kg)	C ₀ o C _{máx} . (ng/ml)	T _{máx} . (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
2 i.v.	0,5	40,69 ± 4,28	-	205,98 ± 14,69	-
3 s.c.	1	1,70 ± 0,69	6,67 ± 2,89	25,72 ± 9,50	2,5 ± 0,9

50 Tal como puede observarse a partir de los resultados mostrados en la tabla 6, se determinó que la AUC para la administración intravenosa de la preparación n.º 2 a una dosis de 10 µg/kg era de 205,98 ng·min/ml, mientras que se determinó que la AUC para la administración subcutánea de la preparación n.º 3 a una dosis de 50 µg/kg era de 25,72 ng·min/ml. Por tanto, se determinó que la BA de grelina humana disuelta en una disolución acuosa de manitol al 5 % era del 2,5 %.

55 Ejemplo de referencia 2: Efectos de tampones acetato de sodio sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía

subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 34, n.º 6 y n.º 7 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los resultados se muestran en la figura 2. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de tampón acetato de sodio)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
34	1	3,35 ± 1,28	5,00 ± 0,00	51,94 ± 21,60	5,0 ± 2,1
6	1	12,57 ± 1,62	5,00 ± 0,00	235,38 ± 22,59	22,9 ± 2,2
7	1	22,29 ± 8,97	8,33 ± 2,89	363,38 ± 16,64	35,3 ± 1,6

Tal como puede observarse a partir de los resultados de la tabla 7, las BA obtenidas para las preparaciones n.º 6 y n.º 7 fueron del 22,9 % y el 35,3 %, respectivamente. Eran sorprendentemente altas en comparación con la BA para la preparación n.º 34 con solución salina fisiológica (5,0 %) y la BA para la preparación n.º 3 con una disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v) (2,5 %): Independientemente del pH del tampón acetato de sodio 0,5 M, la BA de grelina aumentó notablemente mediante la adición del tampón acetato de sodio. Con el tampón acetato de sodio, la BA era de 9 a 14 veces superior que la BA obtenida para la disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v).

Ejemplo de referencia 3: Efectos del tipo de disolución de ácido sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron las preparaciones n.º 7, n.º 8, n.º 9, n.º 10 y n.º 11 por vía subcutánea a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 8 a continuación.

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de los tipos de disolución de ácido)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
7	1	22,29 ± 8,97	8,33 ± 2,89	363,38 ± 16,64	35,3 ± 1,6
8	1	13,29 ± 4,74	6,67 ± 2,89	214,93 ± 41,01	20,9 ± 4,0
9	1	3,70 ± 1,09	13,33 ± 5,77	72,02 ± 10,33	7,0 ± 1,0
10	1	6,12 ± 3,60	6,67 ± 2,89	91,68 ± 76,60	8,9 ± 7,4
11	1	10,99 ± 5,40	5,00 ± 0,00	167,50 ± 61,11	16,3 ± 5,9

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 7, n.º 8, n.º 9, n.º 10 y n.º 11 fueron del 35,3 %, el 20,9 %, el 7,0 %, el 8,9 % y el 16,3 %, respectivamente. Por tanto, la BA de grelina aumentó notablemente en cualquiera de las disoluciones de tampón ácido, teniendo cada una un pH de 4,0, en comparación con la BA para la disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v).

Ejemplo de referencia 4: Efectos de la concentración de disolución de ácido sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 12, n.º 13, n.º 14 y n.º 15 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 9 a continuación.

Tabla 9: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de la concentración de disolución de ácido)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
12	1	20,84 ± 6,82	5,00 ± 0,00	350,53 ± 51,36	34,0 ± 5,0

13	1	16,47 ± 2,82	6,67 ± 2,89	289,90 ± 57,30	28,1 ± 5,6
14	1	9,08 ± 2,76	6,67 ± 2,89	142,04 ± 32,17	13,8 ± 3,1
15	1	3,04 ± 0,85	5,00 ± 0,00	49,38 ± 15,82	4,8 ± 1,5

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 12, n.º 13, n.º 14 y n.º 15 fueron del 34,0 %, el 28,1 %, el 13,8 % y el 4,8 %, respectivamente. Por tanto, la BA de grelina aumentó notablemente en cualquiera de las disoluciones ácidas (pH 4,0) y una concentración de acetato de sodio en el intervalo de 0,01 M a 0,5 M, en comparación con la BA para la disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v).

Ejemplo de referencia 5: Efectos del pH de la preparación líquida sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 13, n.º 16 y n.º 17 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos del pH de la preparación líquida)

(Tabla 10)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
13	1	16,47 ± 2,82	6,67 ± 2,89	289,90 ± 57,30	28,1 ± 5,6
16	1	9,49 ± 2,27	6,67 ± 2,89	170,56 ± 56,93	16,6 ± 5,5
17	1	5,59 ± 1,70	5,00 ± 0,00	93,23 ± 28,88	9,1 ± 2,8

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 13, n.º 16 y n.º 17 fueron del 28,1 %, el 16,6 % y el 9,1 %, respectivamente. Por tanto, la BA de grelina aumentó notablemente en cualquiera de las preparaciones líquidas, cada una formulada con una disolución de acetato de sodio 0,1 M que sirve como disolución ácida y teniendo un pH en el intervalo de 4,0 a 6,0, en comparación con la BA para la disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v).

Ejemplo de referencia 6: Efectos de la concentración y el pH de tampón ácido fosfórico sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 18, n.º 19, n.º 20, n.º 21, n.º 22 y n.º 23 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 11 a continuación.

Tabla 11: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de la concentración y el pH de tampón ácido fosfórico)

(Tabla 11)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
18	1	8,38 ± 1,45	11,67 ± 7,64	182,55 ± 22,06	17,7 ± 2,1
19	1	5,00 ± 0,91	8,33 ± 2,89	82,65 ± 2,78	8,0 ± 0,3
20	1	3,36 ± 1,66	5,00 ± 0,00	54,11 ± 25,62	5,3 ± 2,5
21	1	8,74 ± 0,31	6,67 ± 2,89	154,73 ± 19,02	15,0 ± 1,8
22	1	6,68 ± 3,01	8,33 ± 2,89	109,58 ± 52,62	10,6 ± 5,1
23	1	3,16 ± 1,26	6,67 ± 2,89	55,23 ± 28,90	5,4 ± 2,8

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 18, n.º 19, n.º 20, n.º 21, n.º 22 y n.º 23 fueron del 17,7 %, el 8,0 %, el 5,3 %, el 15,0 %, el 10,6 % y el 5,4 %, respectivamente. Por tanto, la BA de grelina aumentó notablemente en cualquiera de las preparaciones líquidas, cada una formulada con un tampón ácido fosfórico (pH 4,0 a 5,0), en comparación con la BA para la disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v).

Ejemplo 7: Efectos del tipo y la concentración de alcohol sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 14 (ejemplo de referencia), n.º 30, n.º 81, n.º 82 y n.º 86 (ejemplo de referencia) a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 12 a

continuación.

Tabla 12: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos del tipo y la concentración de alcohol)

(Tabla 12)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
14	1	9,08 ± 2,76	6,67 ± 2,89	142,04 ± 32,17	13,8 ± 3,1
30	1	15,99 ± 3,66	5,00 ± 0,00	259,89 ± 43,08	25,2 ± 4,2
81	1	13,94 ± 5,21	10,00 ± 0,00	265,31 ± 104,94	25,8 ± 10,2
82	1	11,77 ± 5,13	5,00 ± 0,00	141,91 ± 46,62	13,8 ± 4,5
86	1	14,30 ± 1,50	6,67 ± 2,89	231,96 ± 43,06	22,5 ± 4,2

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 14, n.º 30, n.º 81, n.º 82 y n.º 86 fueron del 13,8 %, el 25,2 %, el 25,8 %, el 13,8 % y el 22,5 %, respectivamente. La preparación n.º 14 contenía una disolución ácida y un azúcar, pero ningún alcohol. La preparación n.º 30 contenía la misma disolución ácida y azúcar que la preparación n.º 14 y además contenía alcohol bencílico. La BA de grelina en la preparación n.º 30 era dos veces más alta que en la preparación n.º 14 libre de alcohol. También se demostró que la presencia de un alcohol da como resultado un aumento en la BA de grelina independientemente del tipo y la concentración del alcohol.

Ejemplo de referencia 8: Efectos de la concentración de sacarosa sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 24, n.º 13 y n.º 25 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los resultados se muestran en la figura 3 y los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 13 a continuación.

Tabla 13: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de la concentración de sacarosa)

(Tabla 13)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)	T1/2 (min)
24	1	22,15 ± 2,10	8,33 ± 2,89	393,84 ± 62,46	38,2 ± 6,1	9,74 ± 1,65
13	1	16,47 ± 2,82	6,67 ± 2,89	289,90 ± 57,30	28,1 ± 5,6	13,11 ± 1,85
25	1	8,99 ± 0,86	7,50 ± 3,54	199,76 ± 6,67	19,4 ± 0,6	27,47 ± 15,69

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 24, n.º 13 y n.º 25 fueron del 38,2 %, el 28,1 % y el 19,4 %, respectivamente. Por tanto, la BA de grelina era notablemente superior en cualquiera de las preparaciones líquidas que contienen el tampón acetato de sodio que sirve como disolución ácida y el 0, el 10 o el 20 % (p/v) de sacarosa que en la disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v). La presencia de sacarosa dio como resultado un aumento en el T1/2 de grelina en las preparaciones n.º 13 y n.º 25 que en la preparación n.º 24 libre de sacarosa.

Ejemplo 9: Efectos del tipo de azúcar sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 35 (ejemplo de referencia), n.º 53, n.º 84 y n.º 85 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 14 a continuación.

Tabla 14: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos del tipo de azúcar)

(Tabla 14)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
35	1	1,82 ± 0,20	5,00 ± 0,00	30,49 ± 5,03	3,0 ± 0,5
53	1	13,59 ± 3,72	5,00 ± 0,00	230,71 ± 43,38	22,4 ± 4,2
84	1	14,45 ± 2,88	5,00 ± 0,00	219,06 ± 23,27	21,3 ± 2,3
85	1	5,49 ± 3,66	6,67 ± 2,89	89,38 ± 53,97	8,7 ± 5,2

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 35, n.º 53, n.º 84 y n.º 85 fueron del 3,0 %, el 22,4 %, el 21,3 % y el 8,7 %, respectivamente. Aunque la BA de grelina aumentó en la preparación n.º 35 que contenía sólo sacarosa, el aumento fue relativamente pequeño (3,0 %). Se demostró que la BA de grelina aumentó notablemente en cualquiera de las preparaciones líquidas que contenían la misma disolución ácida y el mismo alcohol, pero diferentes azúcares, en comparación con la BA para la disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v). El aumento en la BA era superior para sacarosa y glucosa que para dextrano 70.

Ejemplo 10: Efectos de ciclodextrina sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 87 a n.º 96 (ejemplos de referencia) y la preparación n.º 97 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 15 a continuación.

Tabla 15: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de ciclodextrina como azúcar)

(Tabla 15)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
87	1	10,87 ± 2,07	23,33 ± 5,77	257,40 ± 34,41	25,0 ± 3,3
88	1	8,29 ± 1,10	10,00 ± 0,00	356,44 ± 11,79	34,6 ± 1,1
89	1	18,64 ± 1,79	10,00 ± 0,00	857,01 ± 253,30	83,2 ± 24,6
90	1	18,82 ± 4,04	10,00 ± 0,00	861,52 ± 176,63	83,6 ± 17,1
91	0,05	7,79 ± 2,63	8,33 ± 2,89	185,26 ± 61,90	18,0 ± 6,0
92	0,05	27,69 ± 7,03	8,33 ± 2,89	671,73 ± 122,02	65,2 ± 11,8
93	0,05	11,79 ± 7,41	25,00 ± 30,41	650,88 ± 242,71	63,2 ± 23,6
94	0,05	17,21 ± 8,52	25,00 ± 30,41	977,79 ± 208,78	94,9 ± 20,3
95	0,05	11,25 ± 4,79	6,67 ± 2,89	242,38 ± 116,53	23,5 ± 11,3
96	0,05	19,65 ± 3,04	5,00 ± 0,00	511,84 ± 66,67	49,7 ± 6,5
97	1	11,87 ± 1,34	40,00 ± 17,32	1078,71 ± 86,68	104,7 ± 8,4

La BA aumentó notablemente en cualquiera de las preparaciones n.º 87 a n.º 97. Las BA de grelina en la preparación n.º 53 que contenía sacarosa y en la preparación n.º 84 que contenía glucosa fueron del 22,4 % y el 21,3 %, respectivamente. El aumento en la BA de grelina era comparablemente alto en cualquiera de las preparaciones líquidas que usan ciclodextrina.

Ejemplo de referencia 11: Efectos de la dosis de grelina sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 26, n.º 13, n.º 27 y n.º 28 a una dosis de 1 ml/kg. Las dosis de grelina administrada mediante estas preparaciones líquidas fueron de 10, 50, 250 y 2.000 µg/kg, respectivamente. Se recogieron las muestras de sangre de la misma manera que en el ejemplo 2 y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los resultados se muestran en las figuras 4 y 5. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 16 a continuación.

Tabla 16: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de la dosis de grelina)

(Tabla 16)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
26	1	2,41 ± 0,18	10,00 ± 0,00	49,28 ± 4,04	23,9 ± 2,0
13	1	16,47 ± 2,82	6,67 ± 2,89	289,90 ± 57,30	28,1 ± 5,6
27	1	81,36 ± 19,60	8,33 ± 2,89	1580,28 ± 351,83	30,7 ± 6,8
28	1	653,86 ± 96,82	15,00 ± 8,66	15050,59 ± 2720,50	36,5 ± 6,6

Las AUC para las preparaciones n.º 26, n.º 13, n.º 27 y n.º 28 fueron de 49,28 ng·min/ml, 289,90 ng·min/ml, 1580,28 ng·min/ml y 15050,59 ng·min/ml, respectivamente. Las BA de grelina para estas preparaciones fueron del 23,9 %, el 28,1 %, el 30,7 % y el 36,5 %, respectivamente. Esta observación indica que la absorción de grelina no alcanza la saturación y se mantiene creciente a medida que la dosis de grelina aumenta desde 10 µg/kg hasta 2.000 µg/kg.

Ejemplo 12: Efectos del alcohol bencílico sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 13 (ejemplo de referencia), n.º 14 (ejemplo de referencia), n.º 29 y n.º 30 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 17 a continuación.

Tabla 17: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de alcohol bencílico)

(Tabla 17)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
13	1	16,47 ± 2,82	6,67 ± 2,89	289,90 ± 57,30	28,1 ± 5,6
14	1	9,08 ± 2,76	6,67 ± 2,89	142,04 ± 32,17	13,8 ± 3,1
29	1	19,59 ± 2,58	8,33 ± 2,89	404,34 ± 80,11	39,3 ± 7,8
30	1	15,99 ± 3,66	5,00 ± 0,00	259,89 ± 43,08	25,2 ± 4,2

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 13, n.º 14, n.º 29 y n.º 30 fueron del 28,1 %, el 13,8 %, el 39,3 % y el 25,2 %, respectivamente. Por tanto, la presencia de alcohol bencílico al 1 % (p/v) dio como resultado un notable aumento en la BA de grelina en cada una de las preparaciones líquidas que contenían tampón acetato de sodio 0,1 M o 0,03 M que servían como disolución ácida, en comparación con sus homólogos libres de alcohol bencílico. Esto indica la capacidad del alcohol bencílico para aumentar la BA de grelina.

Ejemplo 13: Efectos de la concentración de grelina sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 30 y n.º 31. Se administró la preparación n.º 30 en un volumen de 1 ml/kg y la preparación n.º 31 en un volumen de 50 µl/kg (se usó una microjeringa (SGE. Co., Ltd.) para administrar 50 µl/kg), de modo que se administraría la misma dosis de 50 µg/kg de grelina mediante las dos preparaciones. Se recogieron las muestras de sangre de la misma manera que en el ejemplo comparativo 2 y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 18 a continuación.

Tabla 18: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de la concentración de grelina)

(Tabla 18)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
30	1	15,99 ± 3,66	5,00 ± 0,00	259,89 ± 43,08	25,2 ± 4,2
31	0,05	21,19 ± 1,47	6,67 ± 2,89	238,83 ± 32,09	23,2 ± 3,1

La BA de grelina en la preparación n.º 30 (25,2 %) era tan alta como la de la preparación n.º 31 (23,2 %). Esto indica que la presencia de un tampón acetato de sodio y alcohol bencílico aumenta la absorción de grelina independientemente de la concentración y la dosis de grelina.

Ejemplo 14: Efectos del proceso de preparación de tampón ácido acético sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 31 y n.º 32 a una dosis de 50 µl/kg, de modo que se administraría la misma dosis de grelina mediante las dos preparaciones (50 µg/kg). Se recogieron muestras de sangre de la misma manera que en el ejemplo comparativo 2 y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 19 a continuación.

Tabla 19: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos del procedimiento de preparación de tampón ácido acético)

(Tabla 19)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
31	0,05	21,19 ± 1,47	6,67 ± 2,89	238,83 ± 32,09	23,2 ± 3,1

32	0,05	38,39 ± 28,38	5,00 ± 0,00	445,28 ± 262,56	43,2 ± 25,5
----	------	---------------	-------------	-----------------	-------------

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 31 y n.º 32 fueron del 23,2 % y el 43,2 %, respectivamente. Se preparó el tampón ácido usado en la preparación n.º 31 añadiendo ácido clorhídrico a una disolución acuosa de acetato de sodio hasta un pH de 4,0, mientras que se preparó el tampón ácido usado en la preparación n.º 32 añadiendo una disolución acuosa de hidróxido de sodio a ácido acético hasta un pH de 4,0. La BA de grelina aumentó notablemente en cada una de las dos preparaciones líquidas en comparación con la BA obtenida para la disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v). Esto indica que la presencia de un tampón ácido aumenta la BA de grelina independientemente del procedimiento de preparación de la disolución ácida.

Ejemplo 15: Efectos del tampón ácido acético sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 32, n.º 51, n.º 52 y n.º 53 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 20 a continuación.

Tabla 20: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de la concentración y el pH de tampón ácido acético)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
32	0,05	21,19 ± 1,47	6,67 ± 2,89	238,83 ± 32,09	23,2 ± 3,1
51	1	14,52 ± 1,32	5,00 ± 0,00	234,78 ± 71,01	22,8 ± 6,9
52	1	11,55 ± 1,62	6,67 ± 2,89	185,48 ± 24,32	18,0 ± 2,4
53	1	13,59 ± 3,72	5,00 ± 0,00	230,71 ± 43,38	22,4 ± 4,2

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 32, n.º 51, n.º 52 y n.º 53 fueron del 23,2 %, el 22,8 %, el 18,0 % y el 22,4 %, respectivamente. Las preparaciones n.º 32 y n.º 51 a n.º 53 contienen cada una alcohol bencílico, un alcohol que puede aumentar la BA de grelina, y sacarosa, junto con un tampón ácido acético que sirve como disolución ácida. Cada una de estas preparaciones líquidas logró una BA superior a la lograda mediante la preparación n.º 79 (14,2 %), que contenía alcohol bencílico y sacarosa, pero no tampón ácido acético. Esto indica que una preparación líquida de grelina que contiene una disolución ácida, un alcohol y un azúcar puede lograr una alta BA de grelina.

Ejemplo 16: Efectos de otras disoluciones ácidas sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 54 a n.º 59 y n.º 73 (ejemplo de referencia) a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 21 a continuación.

Tabla 21: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de otras disoluciones ácidas)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
54	1	13,66 ± 4,85	5,00 ± 0,00	204,81 ± 48,86	19,9 ± 4,7
55	1	13,97 ± 5,00	5,00 ± 0,00	178,41 ± 42,96	17,3 ± 4,2
56	1	12,16 ± 3,84	6,67 ± 2,89	229,86 ± 77,72	22,3 ± 7,5
57	1	11,48 ± 4,49	6,67 ± 2,89	204,27 ± 87,60	19,8 ± 8,5
58	1	15,10 ± 0,60	5,00 ± 0,00	274,07 ± 11,37	26,6 ± 1,1
59	1	13,52 ± 3,41	5,00 ± 0,00	238,52 ± 39,24	23,2 ± 3,8
73	1	8,70 ± 0,96	5,00 ± 0,00	147,75 ± 25,47	14,3 ± 2,5

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 54 a n.º 59 y n.º 73 fueron del 19,9 %, el 17,3 %, el 22,3 %, el 19,8 %, el 26,6 %, el 23,2 % y el 14,3 %, respectivamente. Las preparaciones n.º 54 a 59 contienen cada una alcohol bencílico, un alcohol que puede aumentar la BA de grelina, y sacarosa, junto con una disolución ácida. Cada una de estas preparaciones líquidas logró una BA superior a la lograda mediante la preparación n.º 79 (14,2 %), que contenía alcohol bencílico y sacarosa, pero no disolución ácida. Esto indica que una preparación líquida de grelina que contiene un tampón ácido, un alcohol y un azúcar puede lograr una alta BA de grelina. La presencia de una

disolución ácida dio como resultado un aumento en la BA de grelina independientemente de la constitución de la disolución ácida.

Ejemplo de referencia 17: Efectos del alcohol y el azúcar en ausencia de disolución ácida sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 78 a n.º 80 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 22 a continuación.

Tabla 22: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de alcohol y azúcar en ausencia de disolución ácida)

(Tabla 22)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
78	1	4,84 ± 1,60	6,67 ± 2,89	85,88 ± 11,43	8,3 ± 1,1
79	1	9,17 ± 3,65	5,00 ± 0,00	146,27 ± 30,58	14,2 ± 3,0
80	1	12,11 ± 6,21	5,00 ± 0,00	174,20 ± 69,76	16,9 ± 6,8

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 78 a n.º 80 fueron del 8,3 %, el 14,2 % y el 16,9 %, respectivamente. La BA de grelina en la preparación n.º 35 es del 3,0 %, que contiene sólo sacarosa, y se confirmó que la adición de un alcohol puede aumentar la BA de grelina incluso en ausencia de una disolución ácida.

Ejemplo de referencia 18: Efectos del alcohol en ausencia de disolución ácida sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 60 a n.º 63, n.º 71 y n.º 72 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 23 a continuación.

Tabla 23: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de alcohol en ausencia de disolución ácida)

(Tabla 23)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
60	1	4,96 ± 1,60	5,00 ± 0,00	78,95 ± 20,93	7,7 ± 2,0
61	1	7,48 ± 3,20	8,33 ± 2,89	168,30 ± 82,00	16,3 ± 8,0
62	1	1,59 ± 0,47	13,33 ± 5,77	31,39 ± 15,09	3,0 ± 1,5
63	1	10,95 ± 2,91	5,00 ± 0,00	202,97 ± 47,31	19,7 ± 4,6
71	1	10,16 ± 3,54	5,00 ± 0,00	164,08 ± 51,45	15,9 ± 5,0
72	1	8,57 ± 2,96	5,00 ± 0,00	129,60 ± 51,53	12,6 ± 5,0

Las BA de las preparaciones n.º 60 a n.º 63, n.º 71 y n.º 72 fueron en su mayoría superiores a la de la preparación n.º 34 (5,0 %), que usaba solución salina fisiológica, y la de la preparación n.º 35 (3,0 %), que usaba una disolución acuosa de sacarosa al 10 % (p/v). Estos resultados indican que la presencia de un alcohol solo puede aumentar la BA de grelina incluso en ausencia de una disolución ácida.

Ejemplo de referencia 19: Efectos de líquidos orgánicos polares no alcohólicos en ausencia de disoluciones ácidas sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 64 a n.º 68, n.º 70, n.º 74 y n.º 76 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 24 a continuación.

Tabla 24: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de líquidos orgánicos polares no alcohólicos en ausencia de disoluciones ácidas)

(Tabla 24)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
64	1	4,12 ± 2,18	5,00 ± 0,00	75,76 ± 17,40	7,4 ± 1,7
65	1	9,85 ± 0,57	23,33 ± 11,55	591,33 ± 66,15	57,4 ± 6,4
66	1	6,95 ± 1,46	30,00 ± 0,00	418,55 ± 50,13	40,6 ± 4,9
67	1	10,47 ± 3,04	13,33 ± 5,77	655,33 ± 82,39	63,6 ± 8,0
68	1	9,54 ± 4,00	6,67 ± 2,89	304,04 ± 144,01	29,5 ± 14,0
70	1	2,14 ± 1,45	15,00 ± 13,23	29,59 ± 15,19	2,9 ± 1,5
74	1	5,07 ± 2,27	6,67 ± 2,89	89,20 ± 36,34	8,7 ± 3,5
76	1	3,72 ± 2,21	5,00 ± 0,00	61,51 ± 33,12	6,0 ± 3,2

Las BA de las preparaciones n.º 64 a n.º 68, n.º 70, n.º 74 y n.º 76 fueron en su mayoría superiores a las de la preparación n.º 34 (5,0 %), que usaba solución salina fisiológica, y la de la preparación n.º 35 (3,0 %), que usaba una disolución acuosa de sacarosa al 10 % (p/v). Estos resultados indican que la presencia de un líquido orgánico polar solo puede aumentar la BA de grelina incluso en ausencia de una disolución ácida. El aumento en la BA era el más prominente para N-metil-2-pirrolidona.

Ejemplo 20: Efectos de N-metil-2-pirrolidona sobre la farmacocinética de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 83 y n.º 65 (ejemplo de referencia) a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 25 a continuación.

Tabla 25: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía subcutánea a ratas (efectos de N-metil-2-pirrolidona)

(Tabla 25)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
83	1	16,22 ± 3,13	10,00 ± 0,00	697,53 ± 102,00	67,7 ± 9,9
65	1	9,85 ± 0,57	23,33 ± 11,55	591,33 ± 66,15	57,4 ± 6,4

Las preparaciones n.º 83 y n.º 65 lograron ambas BA considerablemente altas del 65,7 % y el 57,4 %, respectivamente. La BA de grelina era superior en la preparación n.º 83, que contenía una disolución ácida, que en la preparación n.º 65, que no contenía una disolución ácida. Esto indica que la capacidad de N-metil-2-pirrolidona para aumentar la BA, aunque alta por sí misma, puede aumentarse adicionalmente mediante la adición de una disolución ácida.

Ejemplo de referencia 21: Farmacocinética de grelina inyectada por vía intramuscular en ratas

Como con los ejemplos de administración subcutánea, a estas ratas, en las que se insertó un tubo de polietileno en la arteria femoral, se les administró por vía intramuscular las preparaciones n.º 3 y n.º 13 en el músculo femoral a una dosis de 1 ml/kg, usando una jeringa y una aguja 26G. Se recogieron las muestras de sangre de la misma manera que en el ejemplo comparativo 2 y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante el método de RIA. Los resultados se muestran en la figura 6. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 26 a continuación.

Tabla 26: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía intramuscular a ratas (efectos de tampón acetato de sodio)

(Tabla 26)

Prepar. n.º	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
3	1	9,93 ± 3,64	5,00 ± 0,00	111,92 ± 39,98	10,9 ± 3,9
13	1	16,82 ± 3,39	8,33 ± 2,89	293,78 ± 89,38	28,5 ± 8,7

Las BA obtenidas para las preparaciones n.º 3 y n.º 13 administradas por vía intramuscular fueron del 10,9 % y el 28,5 % con respecto al caso en el que se administraron por vía intravenosa, respectivamente. Por tanto, la BA de grelina en presencia del tampón acetato de sodio era 2,6 veces superior a la BA de grelina obtenida para la disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v). Esto indica que los tampones acetato de sodio pueden aumentar la absorción de grelina en administración intramuscular tan eficazmente como lo hacen en administración subcutánea.

Ejemplo 22: Farmacocinética de grelina en monos cynomolgus

Se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 5 (ejemplo de referencia) y n.º 33 a grupos separados de monos cynomolgus y se midieron los niveles de grelina en plasma. Además, se administró por vía intravenosa la preparación n.º 1 (ejemplo de referencia) a otro grupo de monos cynomolgus. Se midieron los niveles de grelina en plasma.

Cada grupo consistía en tres monos macho (importados de China) con edades de 4 a 6 años. Se inyectaron por vía subcutánea las preparaciones n.º 5 y n.º 33 en la piel dorsal a una dosis de 0,2 ml/cuerpo usando una jeringa y una aguja 26G (cada una disponibles de Terumo Co., Ltd.).

Usando una jeringa y una aguja 26G (cada una disponibles de Terumo Co., Ltd.), se inyectó por vía intravenosa la preparación n.º 1 en la vena cefálica del antebrazo a una dosis de 2 ml/kg.

En cada caso, se recogieron muestras de sangre de la vena cefálica del antebrazo antes de la administración y 5, 10, 15, 30, 40, 60, 90 y 120 minutos tras la administración. A cada muestra, se le añadieron una centésima parte como mucho de una disolución de EDTA·2Na·2H₂O y una cincuentaava parte como mucho de una disolución de AEBSF inmediatamente tras la recogida de la muestra. Se centrifugó entonces la muestra para separar el plasma, al que se le añadió inmediatamente una décima parte como mucho de ácido clorhídrico 1 N. Se mezcló la muestra y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Entonces se analizaron las muestras de plasma para determinar los niveles de grelina mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando el kit de ELISA para grelina activa (n.º de cat. MM-401, Mitsubishi Kagaku Iatron Inc.). De manera similar a RIA, este ensayo puede detectar específicamente la grelina activa.

La figura 7 muestra los cambios en las concentraciones de grelina en plasma a lo largo del tiempo. Se usaron los resultados mostrados en la figura 7 para determinar $C_{máx.}$ y $T_{máx.}$ para cada preparación líquida. Usando el método trapezoidal, se calculó también la AUC para cada preparación. Entonces se usaron las AUC para determinar la BA de grelina. Los resultados se muestran en la tabla 27. Se obtuvieron estos valores como promedios de los datos obtenidos para los tres monos cynomolgus en cada grupo.

Tabla 27: Parámetros farmacocinéticos de preparaciones de grelina administradas por vía intravenosa o por vía subcutánea a monos cynomolgus

(Tabla 27)

Prepar. n.º Vía de administ.	Volumen de dosis	Dosificación (µg/kg)	C_0 o $C_{máx.}$ (ng/ml)	$T_{máx.}$ (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
1 i.v.	2 ml/kg	10	126,53 ± 27,67	-	1290,83 ± 165,21	-
5 s.c.	0,2 ml/cuerpo	108 ± 3	39,66 ± 8,22	6,67 ± 2,89	684,33 ± 47,00	4,9 ± 0,5
33 s.c.	0,2 ml/cuerpo	100 ± 14	66,31 ± 9,68	6,67 ± 2,89	1586,10 ± 646,73	12,8 ± 5,8

Las BA obtenidas para las preparaciones subcutáneas n.º 5 y n.º 33 fueron del 4,9 % y el 12,8 % con respecto al caso en el que se administraron por vía intravenosa, respectivamente. Por tanto, la BA de grelina era 2,6 veces superior en la preparación líquida formulada con un tampón acetato de sodio y alcohol bencílico al 1 % (p/v) que en la preparación líquida formulada con una disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v). Esto indica que el tampón acetato de sodio que contiene alcohol bencílico puede aumentar la absorción de grelina en monos cynomolgus tan eficazmente como puede hacerlo en ratas.

Ejemplo 23: La capacidad de la preparación de grelina para aumentar los niveles de hormona de crecimiento en plasma en ratas

Se usaron las preparaciones n.º 4 (ejemplo de referencia) y n.º 31 para examinar la capacidad de las preparaciones de grelina para aumentar la concentración en plasma de hormona de crecimiento (GH) en ratas.

Se usaron ratas SD macho, de 7 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan Inc.). Se administró cada preparación a un grupo de estas ratas en las que se insertó un tubo de polietileno (PE-50, Clay Adams Co., Ltd.) en la arteria femoral.

Usando una jeringa y una aguja 26G (disponibles de Terumo Co., Ltd.), se administró por vía subcutánea cada preparación en la piel dorsal a una dosis de 50 µl/kg. Se recogieron muestras de sangre a partir del tubo de polietileno en la arteria femoral antes de la administración y 5, 10, 20, 30 y 60 minutos tras la administración.

- 5 A cada muestra, se le añadió una centésima parte como mucho de una disolución de EDTA·2Na·2H₂O inmediatamente tras la recogida de la muestra. Entonces se centrifugaron las muestras para separar el plasma, que a su vez se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

10 Se analizaron las muestras de plasma para determinar las concentraciones de GH mediante radioinmunoensayo (RIA) usando un sistema de ensayo de hormona de crecimiento de rata (rGH) [¹²⁵I] (Amersham Bioscience Co., Ltd.: n.º de cat. RPA551). La figura 8 muestra los cambios en las concentraciones de GH en plasma a lo largo del tiempo. Se obtuvieron estos valores como promedios de los datos obtenidos para las tres ratas en cada grupo.

15 Tal como puede observarse a partir de los resultados mostrados en la figura 8, la concentración de GH en plasma aumentó ligeramente desde el valor inicial (113 ng/ml) y alcanzó su valor pico (208 ng/ml) 5 minutos tras la administración subcutánea de la preparación n.º 4. En comparación, la concentración de GH en plasma alcanzó un pico (316 ng/ml) 20 minutos tras la administración subcutánea de la preparación n.º 31. El valor pico fue 3,3 veces superior al valor inicial (96 ng/ml). Estos resultados indican que el aumento en la concentración de GH en plasma es más prominente para la preparación que usa acetato de sodio y alcohol bencílico.

20 Ejemplo 24: Farmacocinética de otros tipos de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

25 Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 37 (ejemplo de referencia), n.º 39 (ejemplo de referencia), n.º 41 (ejemplo de referencia), n.º 98, n.º 99 (ejemplo de referencia), n.º 100 (ejemplo de referencia), n.º 101 y n.º 102 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 28 a continuación. Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía intravenosa las preparaciones n.º 36 (ejemplo de referencia), n.º 38 (ejemplo de referencia) y n.º 40 (ejemplo de referencia) a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles de grelina en plasma mediante RIA. Se usaron las concentraciones en plasma para determinar la BA para cada tipo de grelina.

30 Se midieron los niveles en plasma de grelina de rata de la misma manera que con grelina humana. Se midieron los niveles en plasma de des-octanoilgrelina humana mediante radioinmunoensayo (RIA) usando un anticuerpo anti-grelina. Específicamente, se añadieron el anticuerpo anti-grelina y luego [¹²⁵I]-Tyr-grelina(13-28) a cada muestra de plasma para determinar la competición. Posteriormente, se añadió un anticuerpo secundario para precipitar el complejo de anticuerpo-grelina. Se separó el sobrenadante y se analizó para determinar la radioactividad mediante un contador γ (Packard Instruments Co., Ltd.). El anticuerpo anti-grelina usado en el ensayo puede reconocer des-octanoilgrelina así como grelina.

35 Se midieron los niveles en plasma de aminododecanogrelina humana (grelina Adod) mediante radioinmunoensayo (RIA) usando un anticuerpo anti-grelina Adod. Específicamente, se añadieron el anticuerpo anti-grelina Adod y luego antígeno marcado con ¹²⁵I a cada muestra de plasma para determinar la competición. Posteriormente, se añadió un anticuerpo secundario para precipitar el complejo de anticuerpo-grelina Adod. Se separó el sobrenadante y se analizó para determinar la radioactividad mediante un contador γ (Packard Instruments Co., Ltd.).

45 Tabla 28: Parámetros farmacocinéticos de diferentes tipos de grelina inyectada por vía subcutánea en ratas

(Tabla 28)

Prepar. n.º Vía de administ.	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
36 i.v.	1	188,34 ± 180,25	-	478 ± 198	-
37 s.c.	1	3,94 ± 1,71	5,00 ± 0,00	55,58 ± 12,99	4,7 ± 1,1
98 s.c.	1	20,34 ± 2,99	6,67 ± 2,89	332,40 ± 64,97	27,8 ± 5,4
38 i.v.	1	45,15 ± 4,04	-	584,69 ± 71,77	-
39 s.c.	1	24,79 ± 5,56	16,67 ± 5,77	636,02 ± 139,77	21,7 ± 4,8
99 s.c.	1	44,35 ± 5,56	16,67 ± 5,77	1047,20 ± 185,63	35,8 ± 6,3
100 s.c.	1	47,12 ± 4,39	16,67 ± 5,77	1212,94 ± 91,19	41,5 ± 3,1
101 s.c.	1	52,67 ± 8,45	16,67 ± 5,77	1252,98 ± 115,29	42,8 ± 3,9
40 i.v.	1	154,65 ± 10,13	-	2991,13 ± 173,15	-
41 s.c.	1	6,67 ± 3,30	20,00 ± 10,00	291,67 ± 124,33	3,9 ± 1,7
102 s.c.	1	52,27 ± 5,43	10,00 ± 0,00	2194,50 ± 341,83	29,3 ± 4,6

Los resultados demuestran que preparaciones líquidas que contienen un líquido orgánico polar, una disolución ácida, un azúcar y un alcohol pueden aumentar notablemente no sólo la BA de grelina inyectada por vía subcutánea, sino también las BA de otras grelinas inyectadas por vía subcutánea, incluyendo grelina de rata, des-octanoilgrelina (grelina humana que no tiene la modificación de octanoilo en Ser3) y [ácido L-2-aminododecanoico³]grelina humana.

Ejemplo de referencia 25: Farmacocinética de otras proteínas y péptidos fisiológicamente activos inyectados por vía subcutánea en ratas

Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía subcutánea las preparaciones n.º 43, 45, 47, 49, 50 y 103 a 107 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles en plasma de los péptidos y las proteínas mediante RIA. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 29 a continuación. Como en el ejemplo comparativo 2, se administraron por vía intravenosa las preparaciones n.º 42, 44, 46 y 48 a una dosis de 1 ml/kg y se midieron los niveles en plasma de los péptidos y proteínas mediante RIA. Se usaron las concentraciones en plasma para determinar la BA para cada péptido o proteína.

Se midieron los niveles en plasma de hormona paratiroidea humana (1-34) (hPTH) mediante radioinmunoensayo (RIA) usando un anticuerpo anti-PTH. Específicamente, se añadieron el anticuerpo anti-PTH y luego [¹²⁵I-Tyr34]PTH(1-34) a cada muestra de plasma para determinar la competición. Posteriormente, se añadió un anticuerpo secundario para precipitar el complejo de anticuerpo-PTH(1-34). Se separó el sobrenadante y se analizó para determinar la radioactividad mediante un contador γ (Packard Instruments Co., Ltd.).

Se midieron los niveles en plasma de péptido-1 de tipo glucagón humano (GLP-1) mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando el kit de ELISA para péptido-1 de tipo glucagón (Active) (LINCO Research Inc.).

Se midieron los niveles en plasma de adrenomedulina humana mediante radioinmunoensayo (RIA) usando AM mature RIA Shionogi (Shionogi Co., Ltd.).

Se midieron los niveles en plasma de insulina humana mediante radioinmunoensayo (RIA) usando Insulin-RIA-bead II (Yamasa Co., Ltd.).

Se midieron los niveles en plasma de péptido natriurético auricular humano (hANP) mediante radioinmunoensayo (RIA) usando Shiono RIA ANP (Shionogi Co., Ltd.).

Tabla 29: Parámetros farmacocinéticos de otras proteínas y péptidos fisiológicamente activos administrados por vía subcutánea a ratas

(Tabla 29)

Prepar. n.º Vía de administ.	Volumen de dosis (ml/kg)	C _{máx.} (ng/ml)	T _{máx.} (min)	AUC (ng·min/ml)	BA (%)
42 i.v.	1	413 ± 291	-	294 ± 184	-
43 s.c.	1	1,74 ± 0,86	5,00 ± 0,00	24,00 ± 7,26	4,9 ± 1,5
103 s.c.	1	5,74 ± 0,47	5,00 ± 0,00	68,50 ± 6,95	14,0 ± 1,4
44 i.v.	1	995 ± 178	-	1136 ± 142	-
45 s.c.	1	5,46 ± 3,55	5,00 ± 0,00	71,64 ± 51,00	6,3 ± 4,5
104 s.c.	1	11,89 ± 1,95	5,00 ± 0,00	162,37 ± 19,63	14,3 ± 1,7
46 i.v.	1	30,90 ± 19,33	-	201,8 ± 4,0	-
47 s.c.	1	0,89 ± 0,92	16,67 ± 5,77	30,10 ± 30,93	7,5 ± 7,7
105 s.c.	1	1,81 ± 0,38	6,67 ± 2,89	42,29 ± 12,98	10,5 ± 3,2
48 i.v.	1	216,36 ± 19,31	-	2423,3 ± 288,7	-
49 s.c.	1	11,66 ± 8,98	11,67 ± 5,77	320,77 ± 133,23	13,2 ± 5,5
106 s.c.	1	16,34 ± 1,77	15,00 ± 0,00	626,68 ± 48,25	25,9 ± 2,0
50 s.c.	1	8,17 ± 1,74	20,00 ± 8,66	388,04 ± 113,97	18,5 ± 5,4
107 s.c.	1	27,30 ± 3,95	15,00 ± 0,00	1254,64 ± 397,47	59,8 ± 18,9

Los resultados demuestran que las preparaciones líquidas de péptidos que contienen un azúcar, un alcohol y una disolución ácida pueden aumentar notablemente no sólo la BA de grelina humana inyectada por vía subcutánea, sino también las BA de otros péptidos inyectados por vía subcutánea, incluyendo grelina de rata, des-octanoilgrelina (grelina humana que no tiene la modificación de octanoilo en Ser3), [ácido L-2-aminododecanoico³]grelina humana, péptido-1 de tipo glucagón humano (GLP-1), péptido natriurético auricular humano (hANP), adrenomedulina humana, hormona paratiroidea humana (hPTH(1-34)) e insulina humana.

Ejemplo de producción de referencia 1: Preparación de una composición farmacéutica con pH ajustado que contiene grelina humana

5 Se disolvió grelina humana, que es una de las grelinas, en agua purificada para formar una disolución acuosa que contiene grelina humana aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (= 0,5 mg/ml). Mientras se monitorizaba el pH de esta disolución, se añadió ácido clorhídrico acuoso 0,1 M en pequeñas cantidades hasta un pH final de 4,0. Esto dio una composición farmacéutica como una disolución acuosa que contiene grelina humana.

10 Ejemplo de producción de referencia 2: Preparación de una composición farmacéutica que consiste en grelina de rata disuelta en tampón ácido acético

Se disolvió grelina de rata, que es una de las grelinas, en tampón ácido acético 0,05 M (pH 4,0) para formar una composición farmacéutica como una disolución acuosa que contiene grelina de rata aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (= 0,5 mg/ml). Se determinó que la disolución acuosa tenía un pH de 4,0.

Ejemplo de producción 3: Preparación de una composición farmacéutica que contiene grelina humana

20 Se añadieron grelina humana, que es una de las grelinas, y alcohol bencílico a tampón ácido acético 0,05 M (pH 4,0) para formar una composición farmacéutica como una disolución acuosa que contiene grelina humana aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (= 0,5 mg/ml) y alcohol bencílico a aproximadamente el 1 % (p/v). Se determinó que la disolución acuosa tenía un pH de 4,0.

Ejemplo de producción de referencia 4: Preparación de una composición farmacéutica que contiene grelina humana

25 Se añadieron grelina humana, que es una de las grelinas, alcohol bencílico y sacarosa a agua purificada para formar una composición farmacéutica como una disolución acuosa que contiene grelina humana aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (= 0,5 mg/ml), alcohol bencílico a aproximadamente el 1 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v). Se determinó que la disolución acuosa tenía un pH de 4,7.

Ejemplo de producción 5: Preparación de una composición farmacéutica que contiene grelina humana

30 Se añadieron grelina humana, que es una de las grelinas, alcohol bencílico y sacarosa a tampón ácido acético 0,1 M (pH 4,0) para formar una composición farmacéutica como una disolución acuosa que contiene grelina humana aproximadamente 0,15 $\mu\text{mol/ml}$ (= 0,5 mg/ml), alcohol bencílico a aproximadamente el 1 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v). Se determinó que la disolución acuosa tenía un pH de 4,0.

Aplicabilidad industrial

40 Tal como se expone, la presente invención proporciona el uso de una preparación líquida eficaz que logra una alta biodisponibilidad (BA) de grelina fisiológicamente activa, que se administra como fármaco.

En general, las proteínas y los péptidos fisiológicamente activos administrados por vía subcutánea se digieren por proteasas, de modo que su BA se vuelve menor de la que se logra mediante inyección intravenosa. La preparación líquida para el uso de la presente invención que contiene una grelina fisiológicamente activa puede inyectarse por vía subcutánea para mantener niveles en sangre eficaces del péptido o la proteína. Por tanto, la presente invención es de importancia médica significativa.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 es un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo en los niveles en plasma de grelina humana administrada por vía intravenosa o por vía subcutánea a ratas, estando la grelina humana disuelta en una disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v) (ejemplo comparativo 2).

55 La figura 2 es un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo en los niveles en plasma de grelina humana administrada por vía subcutánea a ratas, estando la grelina humana disuelta en un tampón acetato de sodio (ejemplo 2).

60 La figura 3 es un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo en los niveles en plasma de grelina humana administrada por vía subcutánea a ratas, estando la grelina humana disuelta en un tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 4,0) que contiene del 0 al 20 % (p/v) de sacarosa (ejemplo 7).

65 La figura 4 es un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo en los niveles en plasma de grelina administrada por vía subcutánea a ratas a una dosis de 10, 50, 250 ó 2.000 $\mu\text{g/kg}$ (ejemplo 8). La preparación contiene tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 4,0) y sacarosa al 10 % (p/v).

La figura 5 es un gráfico que muestra la relación entre la dosis de grelina administrada a ratas a una dosis de 10, 50, 250 ó 2.000 µg/kg y las AUC (ejemplo 8).

- 5 La figura 6 es un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo en los niveles en plasma de grelina humana administrada por vía intramuscular a ratas, estando la grelina humana disuelta en una disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v) o en un tampón acetato de sodio (ejemplo 12).

- 10 La figura 7 es un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo en los niveles en plasma de grelina humana administrada por vía intravenosa o por vía subcutánea a monos cynomolgus, estando la grelina humana disuelta en una disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v) o en un tampón acetato de sodio (ejemplo 13).

- 15 La figura 8 es un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo en los niveles en plasma de hormona de crecimiento en ratas tras la administración subcutánea de grelina humana disuelta en una disolución acuosa de manitol al 5 % (p/v) o en un tampón acetato de sodio (ejemplo 14).

Listado de secuencias

- 20 <110> DAIICHI SUNTORY PHARMA CO., LTD.
- <120> Preparación líquida que contiene péptidos fisiológicamente activos
- <130> DSP461
- 25 <160> 21
<170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
<211> 28
30 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- <220>
<221> PÉPTIDO
35 <222> (1)..(28)
<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos humanos de secretagogo de hormona de crecimiento
- <400> 1
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15
- Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25
- 40 <210> 2
<211> 27
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 45 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(27)
<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos humanos (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona de crecimiento
- 50 <400> 2
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15
- Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25
- 55 <210> 3

<211> 28
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(28)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de rata de secretagogo de hormona de crecimiento

10 <400> 3
 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

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

15 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(27)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de rata de secretagogo de hormona de crecimiento

20 <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

25 <210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(28)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de ratón de secretagogo de hormona de crecimiento

35 <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

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

40 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(28)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos porcinos de secretagogo de hormona de crecimiento

45 <400> 6

ES 2 620 326 T3

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

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

<220>
<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(27)
<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos bovinos (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona de crecimiento

<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
<211> 27
<212> PRT
<213> *Ovis aries*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(27)

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos ovinos (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona de crecimiento

<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
<211> 28
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(28)

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de perro de secretagogo de hormona de 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

<210> 10

<211> 21
 <212> PRT
 <213> *Anguilla japonica*

5 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de anguila de secretagogo de hormona de crecimiento. Este péptido está amidado en el extremo C.

10 <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

15 <210> 11
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Oncorhynchus mykiss*

20 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(23)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de trucha arcoíris (23 aminoácidos) de secretagogo de hormona de crecimiento. Este péptido está amidado en el extremo C.

25 <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

30 <210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Oncorhynchus mykiss*

35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(20)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de trucha arcoíris (20 aminoácidos) de secretagogo de hormona de crecimiento. Este péptido está amidado en el extremo C.

40 <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

45 <210> 13
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Gallus domesticus*

<220>
 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(24)

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de pollo de secretagogo de hormona de 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

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> *Gallus domesticus*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(24)

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de pollo de secretagogo de hormona de 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

<210> 15

<211> 26

<212> PRT

<213> *Gallus domesticus*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(26)

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de pollo de secretagogo de hormona de crecimiento

<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

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

<213> *Rana catesbeiana*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(27)

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de rana de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 16

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
20 25

<210> 17
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Rana catesbeiana*
 5
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(28)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de rana de secretagogo de hormona de 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
 15
 <210> 18
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Tilapia nilotica*
 20
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(20)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de tilapia de secretagogo de hormona de crecimiento.
 Este péptido está amidado en el extremo C. Amidación
 25
 <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
 30
 <210> 19
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Silurus asotus*
 35
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(22)
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de pez gato de secretagogo de hormona de
 crecimiento. Este péptido está amidado en el extremo C.
 <400> 19
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Gln Lys Pro Gln Asn Arg Gly Asp
 1 5 10 15
 40
 Arg Lys Pro Pro Arg Val
 20
 45
 <210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Silurus asotus*
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(23)
 50
 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de pez gato de secretagogo de hormona de crecimiento

ES 2 620 326 T3

<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

<213> *Equus caballus*

10 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(28)

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos equinos de secretagogo de hormona de crecimiento

15 <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

1. Preparación líquida, que es una disolución acuosa, que comprende grelina como principio activo en combinación con tanto una disolución ácida como un líquido orgánico polar, en la que la disolución ácida comprende uno seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido láctico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido butírico y sales de los mismos; en la que el líquido orgánico polar es del grupo que consiste en alcohol bencílico, fenol, terc-butanol, N-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida y dimetilsulfóxido; y en la que la preparación líquida tiene un pH en un intervalo de 3,0 a 7,0 para su uso en un método de inyección subcutánea o inyección intramuscular.
2. Preparación líquida para el uso según la reivindicación 1, en la que la concentración del líquido orgánico polar es desde el 0,1 hasta el 10 % (p/v).
3. Preparación líquida para el uso según la reivindicación 1 ó 2, que contiene además un azúcar seleccionado del grupo que consiste en manitol, sacarosa, glucosa y ciclodextrina.
4. Preparación líquida para el uso según la reivindicación 3, en la que el azúcar es ciclodextrina.
5. Preparación líquida para el uso según la reivindicación 3 ó 4, en la que la concentración del azúcar es desde el 0,1 hasta el 20 % (p/v).
6. Preparación líquida para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la grelina es grelina humana.
7. Preparación líquida para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la concentración de la grelina es desde 0,03 nmol/ml hasta 15 μ mol/ml.

Fig. 1

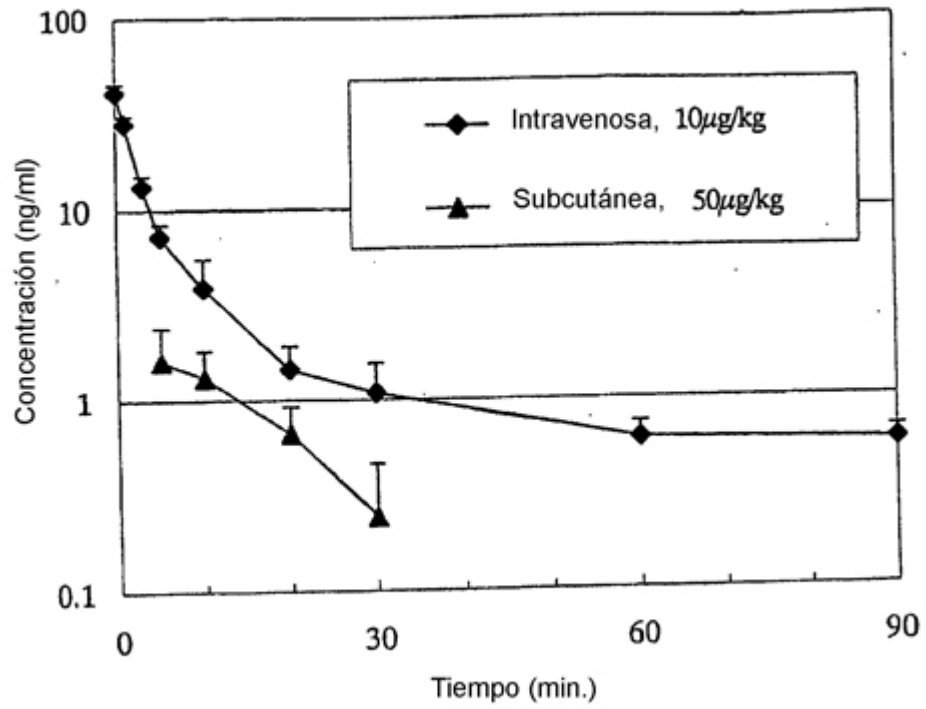


Fig. 2

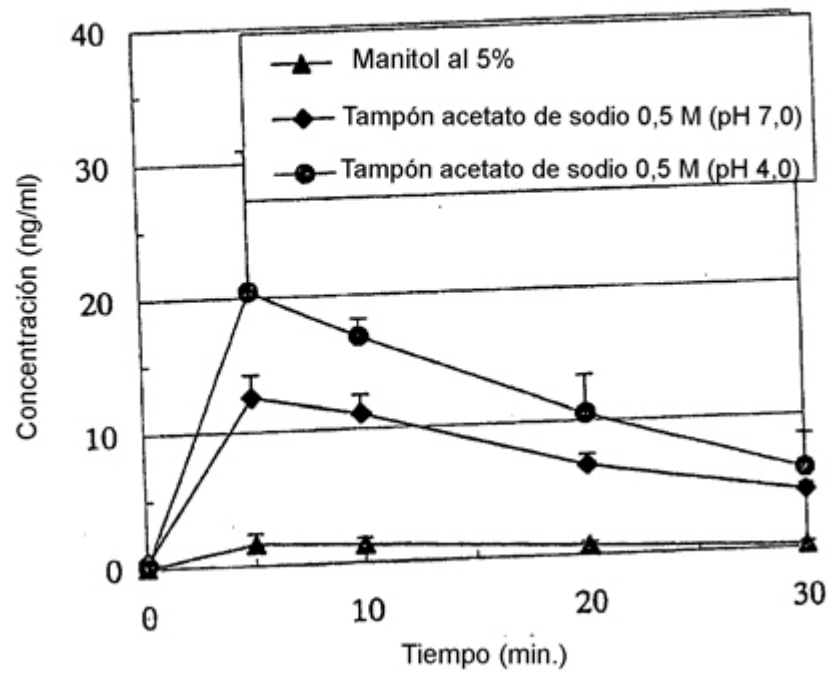


Fig. 3

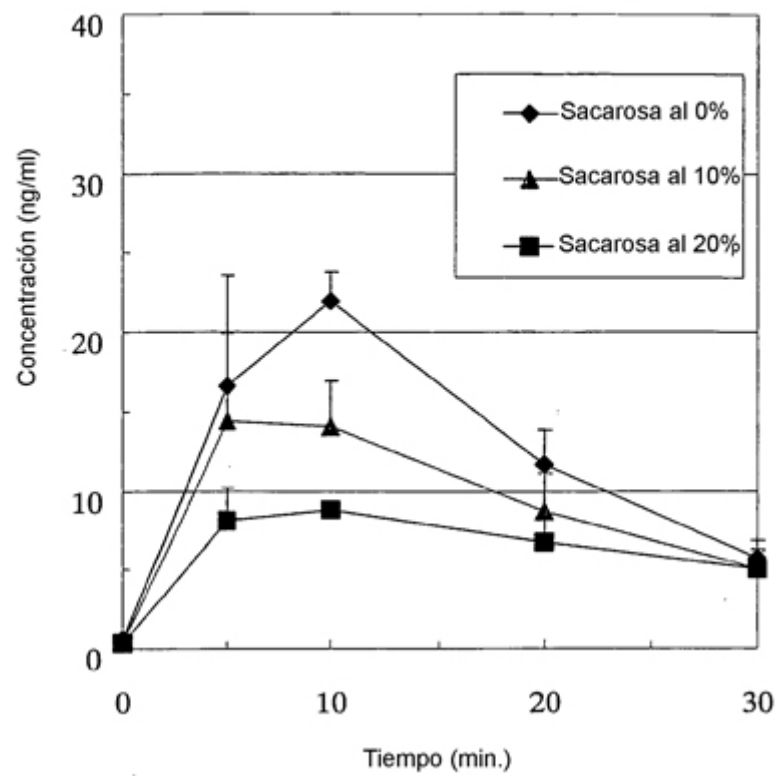


Fig. 4

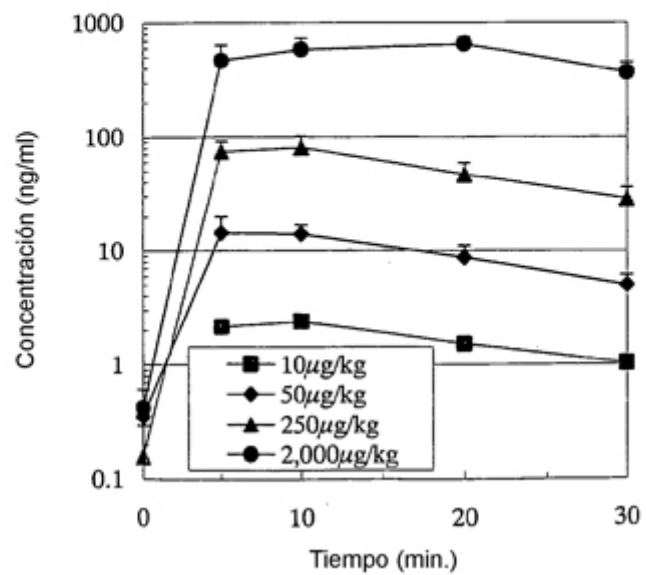


Fig. 5

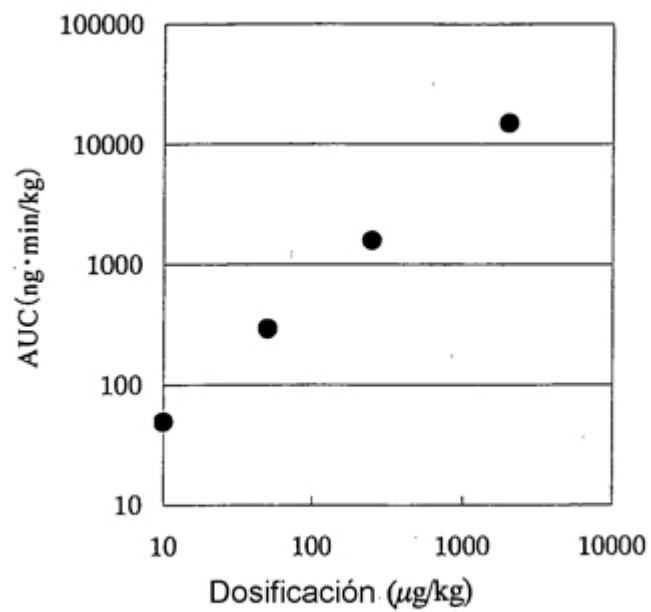


Fig. 6

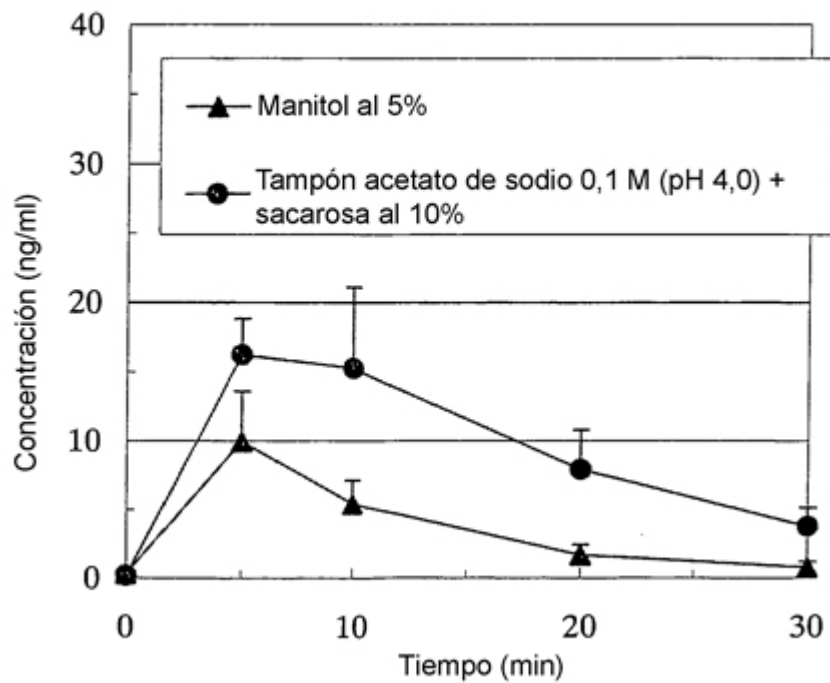


Fig. 7

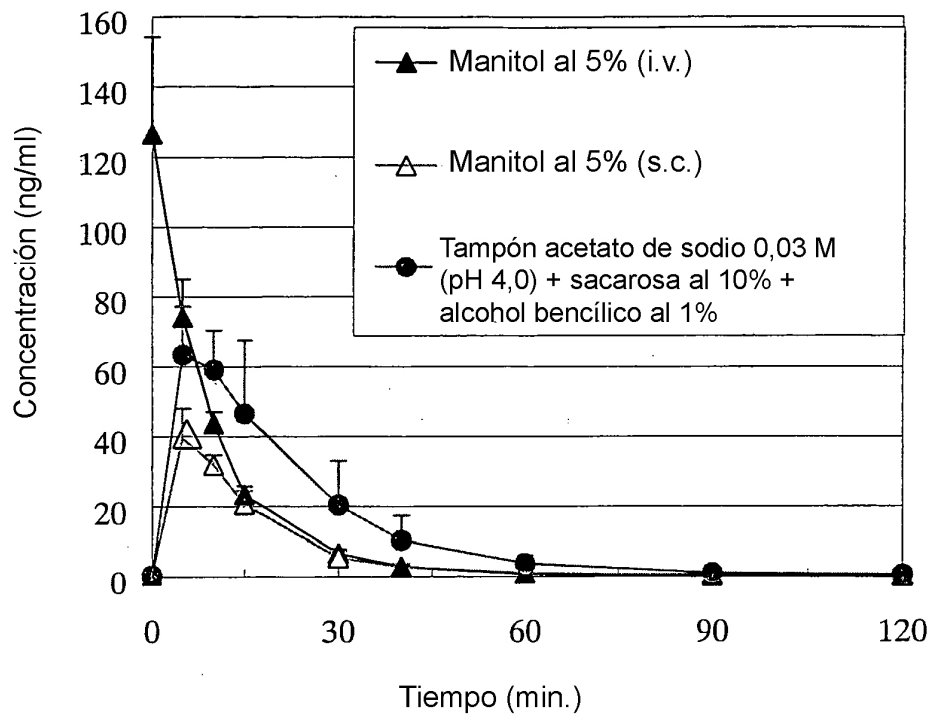


Fig. 8

