



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0607475-8 B1



(22) Data do Depósito: 23/02/2006

(45) Data de Concessão: 11/02/2020

(54) Título: PROMOTOR DE REGENERAÇÃO DE CÉLULA SS PANCREÁTICA, E PROMOTOR DE PRODUÇÃO DE INSULINA EM CÉLULA SS PANCREÁTICA

(51) Int.Cl.: A61K 38/22; A61P 3/10; A61P 43/00; C07K 14/575.

(30) Prioridade Unionista: 11/01/2006 JP 2006-003219; 23/02/2005 JP 2005-046562.

(73) Titular(es): KYOTO UNIVERSITY; DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED.

(72) Inventor(es): KANGAWA, KENJI; AKAMIZU, TAKASHI; IRAKO, TAIGA; KODA, SHUICHI; WAKABAYASHI, NAOMI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2006303243 de 23/02/2006

(87) Publicação PCT: WO 2006/090767 de 31/08/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/08/2007

(57) Resumo: PROMOTOR DE REGENERAÇÃO DE CÉLULA 225> PANCREÁTICA, E PROMOTOR DE PRODUÇÃO DE INSULINA EM CÉLULA 225> PANCREÁTICA. A presente invenção refere-se a um fármaco para promover neogênese ou regeneração de células 225> pancreáticas que produzem e secretam insulina e para promover a produção de insulina em células 225>, compreendendo grelina ou um derivado desta como um componente efetivo.

PROMOTOR DE REGENERAÇÃO DE CÉLULA β PANCREÁTICA, E PROMOTOR
DE PRODUÇÃO DE INSULINA EM CÉLULA β PANCREÁTICA

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção refere-se a um fármaco para a promoção de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas produtoras de insulina. A presente invenção refere-se também a um método para a supressão ou tratamento de hiperglicemia pela promoção de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas.

TÉCNICA ANTERIOR

15 A diabetes, também chamada de hiperglicemia, é uma anomalia metabólica que se refere principalmente com o metabolismo de glicose, a qual é provocada, por exemplo, por secreção insuficiente de insulina ou redução da sensibilidade à insulina das células alvo, e é caracterizada por nível alto de açúcar no sangue. Quando este nível alto de açúcar no sangue é mantido por um período longo, podem ocorrer complicações sérias em vários órgãos e nervos tais como retinopatia, nefropatia e neuropatia, principalmente devido à angiopatia. Por esta razão, atualmente é muito importante no tratamento de diabetes o controle e manutenção do nível de açúcar no sangue dentro da faixa normal, e meios para o controle dos níveis de açúcar no sangue têm sido convenientemente estudados.

20 Um teste para tolerância à glicose (uma carga oral de 75 g de glicose) é utilizado para o diagnóstico da diabetes (hiperglicemia). Para este diagnóstico, é retirado sangue

em jejum para se determinar os valores de insulina e açúcar no sangue, e é retirado sangue novamente após um certo período de tempo da ingestão de água contendo 75 g de glicose dissolvidos, de maneira a se determinar os valores de insulina e açúcar no sangue. Quando um valor ($\Delta\text{IRI}/\Delta\text{BG}$) de "uma diferença nos valores de insulina no sangue 30 minutos depois da carga e antes da carga" (ΔIRI) dividida por "uma diferença nos valores de açúcar no sangue 30 minutos depois e antes da carga" (ΔBG) não é maior que 0,4, é determinado que há um alto risco de exacerbação séria de hiperglicemia.

A diabetes é principalmente classificada nos tipos 1 e 2. A diabetes tipo 1 é desenvolvida com déficit absoluto de secreção de insulina provocada por debilitação ou morte de células β pancreáticas levando a nenhuma ou baixa secreção de insulina. Isto pode ser provocado por infecção viral e anomalia auto-imune originária da infecção viral. A diabetes tipo 2 é desenvolvida quando a secreção de insulina pelas células β pancreáticas é reduzida (insuficiência quantitativa de insulina), ou quando a ação da insulina sobre as células que absorvem insulina é reduzida (resistência à insulina) e, na medida em que a resistência à insulina aumenta, a insulina se torna relativamente quantitativamente insuficiente e os níveis de açúcar no sangue começa a aumentar. Neste último caso, a secreção de insulina pelas células β pancreáticas se torna excessiva para suprir a insuficiência quantitativa relativa de insulina, elemento quando a secreção excessiva de insulina alcança um nível máximo e é mantido por um tempo

longo, as células β pancreáticas são finalmente exauridas e a secreção de insulina pelas células é reduzida.

Desta forma, é assumido que uma causa fundamental da diabetes (hiperglicemia) é um déficit em células β pancreáticas e uma redução na produção ou insuficiência de secreção de insulina nas células.

Embora uma formulação de insulina, agentes de biguanida, agentes de sulfoniluréia, agentes de tiazolidinodiona e semelhantes, sejam atualmente utilizados para melhorar os níveis de açúcar no sangue, os agentes hiperglicêmicos atualmente utilizados não são ainda satisfatórios em termos dos efeitos colaterais e outros. Além disto, uma vez que estes agentes são desenvolvidos para o propósito de reduzir os níveis de açúcar no sangue, os agentes podem ser utilizados para tratamento sintomático para o controle dos níveis de açúcar no sangue, mas não são ainda satisfatórios sob o ponto de vista de um tratamento curativo para melhorar a causa fundamental da diabetes como descrita acima, isto é, o déficit em células β pancreáticas em si e redução da produção ou insuficiência de secreção de insulina nas células.

Do ponto de vista descrito acima, o desenvolvimento de um agente capaz de promover a neogênese ou regeneração de células β pancreáticas, suprimir a exaustão ou morte de células β pancreáticas, e adicionalmente, promover a produção de insulina em células β pancreáticas, é altamente desejável para a supressão ou tratamento da hiperglicemia.

Por outro lado, a grelina é um hormônio descoberto em estômago de rato em 1999, que é um peptídeo apresentando uma estrutura química bem característica onde o 3°

aminoácido do terminal N é acilado por um ácido graxo (Nature, 402, pp. 656-660, 1999). Mostrou-se que a grelina tem uma função de estímulo da secreção do hormônio de crescimento a partir da glândula pituitária, e foi mostrado

5 também em um estudo recente que tem uma função de estímulo da ingestão de alimentos, ou acúmulo de gordura para o aumento do peso corporal e melhorar a função cardíaca (Nature, 409, pp.194-198, 2001; Endocr. Rev., 25, pp.426-457, 2004; Front Neuroendocrinol., 25, pp. 27-68, 2004).

10 A grelina foi isolada e purificada de rato como um hormônio de crescimento secretagogo endógeno (GHS) para um receptor de hormônio de crescimento secretagogo (GHS-R). São conhecidas também seqüências de aminoácidos de grelina apresentando estruturas primárias similares de vertebrados

15 outros que não ratos, por exemplo, humano, camundongo, suíno, frango, enguia, bovino, equino, ovino, rã, truta, e canino.

Humano:

GSS(n-octanoil)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR. Seqüência nº 1.

20 GSS(n-octanoil)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR. Seqüência nº 2.

Rato:

GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR. Seqüência nº 3.

GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR. Seqüência nº 4.

Camundongo:

25 GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR. Seqüência nº 5.

Suíno:

GSS(n-octanoil)FLSPEHQKVQQRKESKKPAAKPKPR. Seqüência nº 6.

Bovino:

GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQRKEAKKPSGRLKPR. Seqüência nº 7.

30 Ovino:

GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR. Seqüência n° 8.

Canino:

GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR. Seqüência n° 9.

5 Enguia:

GSS(n-octanoil)FLSPSQRPQGKDKKPPRV-NH₂. Seqüência n° 10.

Truta:

GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQVRQKGKPPRV-NH₂. Seqüência n° 11.

GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQKGKPPRV-NH₂. Seqüência n° 12.

10 Frango:

GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQQKGTRKPTAR. Seqüência n° 13.

GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQQKDTRKPTAR. Seqüência n° 14.

GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQQKDTRKPTARLH. Seqüência n° 15.

Rã-touro:

15 GLT(n-octanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKL RHG NM. Seqüência n° 16.

GLT(n-decanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKL RHG NM. Seqüência n° 16.

GLT(n-octanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKL RHG NMN. Seqüência n° 17.

Tilapia:

GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQNKVKSSRI-NH₂. Seqüência n° 18.

20 Bagre:

GSS(n-octanoil)FLSPTQKPQNRGDRKPPRV-NH₂. Seqüência n° 19.

GSS(n-octanoil)FLSPTQKPQNRGDRKPPRVG. Seqüência n° 20.

Eqüino:

GSS(n-butanoil)FLSPEHHKVQHRKESKKPPAKLKPR. Seqüência n° 21.

25 (Na notação acima, os resíduos de aminoácido são representados por letras).

O peptídeo descrito acima apresenta uma estrutura específica em que um resíduo de serina (S) ou um resíduo de treonina (T) na 3ª posição, contém um grupo hidroxila acilado por um ácido graxo tal como ácido octanóico ou
30 ácido decanóico, na cadeia lateral. Exceto pela grelina,

não existe qualquer exemplo de peptídeo biologicamente ativo isolado de um organismo, apresentando tal estrutura modificada hidrofóbica. Este peptídeo é conhecido como apresentando uma atividade potente de liberação de hormônio de crescimento e por participar na regulação da secreção do hormônio de crescimento (publicação internacional WO 01/07475).

Uma vez que a grelina e seu receptor (GHS-R) são também expressos no pâncreas (Endocrinology, 145, pp. 3813-3820, 2004; Brain Res. Mol. Brain Res., 48, pp. 23-29, 1997; J. Clin. Endocrinol. Metab., 87, pp. 1300-1308, 2002), foram realizados estudos relativos ao metabolismo de glicose ou secreção de insulina, os quais mostraram que a grelina regula a insulina e a glicose no sangue, e foram reportadas as funções da grelina no aumento do açúcar no sangue e na supressão ou promoção da secreção de insulina (Pancreas, 27, pp.161-166, 2003; Endocrinology, 144, pp. 916-921, 2003; Eur. J. Endocrinol., 146, pp. 241-244, 2002; Endocrinology, 143, pp. 185-190, 2002; J. Neuroendocrinol., 14, pp.555-560, 2002). Uma função da grelina para células β pancreáticas promoverem a neogênese ou regeneração da célula, no entanto, não foi sugerida.

Adicionalmente, embora a publicação internacional WO 2001/56592 (e as publicações de patente US 2001/0020012 A1 e 2004/0063636 A1) sugira a utilização de um ligante do receptor GHS-R 1A incluindo grelina como um fármaco para o tratamento de diabetes tipo 2, não há qualquer demonstração de como a grelina pode ser utilizada como um medicamento para diabetes tipo 2 ou não, e se existe utilidade realmente conforme sugerida ou não, não é do conhecimento

dos especialistas na técnica. Adicionalmente, embora a publicação internacional WO 2002/60472 descreva uma função da grelina na obesidade, a utilidade para o tratamento de diabetes não foi demonstrada.

5 Quanto à relação entre células β pancreáticas e a grelina, foi reconhecido um fenômeno onde células que produzem mais grelina (células ϵ) substituem células β pancreáticas que é suprimida a diferenciação para células β (Proc. Natl. Acad. Sci., 101, pp. 2924-2929, 2004). Embora

10 tenha sido sugerida uma possibilidade dos dois tipos de célula serem derivados de um precursor celular idêntico, e tenha sido sugerida uma possibilidade futura de produzir grupos de células β puras a partir de células tronco ou semelhante, utilizando-se células produtoras de grelina

15 para tratar diabetes a nível celular, estas são meras possibilidades e não foram substanciadas. Adicionalmente, esta publicação não sugere ou ensina que a grelina tem uma função de promover a neogênese ou regeneração de células β pancreáticas ou de promover a produção de insulina em

20 células β pancreáticas.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Problemas a Serem Solucionados pela Invenção

O propósito da presente invenção é prover um método

25 de promover neogênese ou regeneração de células β pancreáticas produzindo ou secretando insulina, e prover um fármaco para a supressão ou tratamento de hiperglicemia pela promoção de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas que produzem e secretam insulina em

30 hiperglicemia causada por secreção muito baixa ou nenhuma

de insulina devida à debilitação ou morte de células β pancreáticas, ou em hiperglicemia causada pela secreção reduzida de insulina em células β pancreáticas.

5 Meios para a Solução dos Problemas

Como resultado de um estudo intenso para solucionar os problemas descritos acima, os inventores observaram que a grelina tem uma função de promover significativamente a neogênese ou regeneração de células β pancreáticas, e que a grelina tem uma função de promover a produção de insulina em células β pancreáticas. A presente invenção está completamente baseada nas observações acima.

Mais especificamente, a presente invenção refere-se a:

- 15 (1) uma composição farmacêutica para a supressão ou tratamento de hiperglicemia, compreendendo como um componente efetivo um peptídeo selecionado do grupo consistindo em um peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando uma atividade para aumentar a concentração de
- 20 íon cálcio intracelular por ligação ao receptor de hormônio de crescimento secretagogo (GHS-R), um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1, onde o 3° resíduo de aminoácido tem um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado
- 25 contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 com a retirada, substituição e/ou adição de um ou vários aminoácidos no interior de uma seqüência de aminoácidos do
- 30 5° ao 28° aminoácidos de um terminal amino, onde o 3°

resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido e o peptídeo apresenta uma atividade para aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, ou um sac
5 farmacêuticamente aceitável deste;

(2) a composição farmacêutica de acordo com o item (1) acima, onde a hiperglicemia é provocada por secreção muito baixa ou nenhuma de insulina devida à debilitação ou morte de células β pancreáticas, ou provocada pela secreção
10 reduzida de insulina em células β pancreáticas;

(3) a composição farmacêutica de acordo com o item (2) acima, onde a hiperglicemia é provocada por secreção muito baixa ou nenhuma de insulina devida à debilitação ou morte de células β pancreáticas;
15

(4) a composição farmacêutica de acordo com o item (2) acima, onde a hiperglicemia é provocada pela secreção reduzida de insulina em células β pancreáticas;

(5) a composição farmacêutica de acordo com qualquer um dos itens (1) a (4) acima, onde a hiperglicemia apresenta um valor $\Delta\text{IRI}/\Delta\text{BG}$ não maior que 0,4;
20

(6) a composição farmacêutica de acordo com qualquer um dos itens (1) a (5) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um
25 resíduo de serina na 3ª posição do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo;

(7) a composição farmacêutica de acordo com o item (6) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de
30

aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo de um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil;

- 5 (8) uma composição farmacêutica para a promoção de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas, compreendendo como um componente efetivo um peptídeo selecionado do grupo consistindo em um peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando atividade para aumento
- 10 da concentração do íon cálcio intracelular pela ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1, onde o 3° resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido
- 15 em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior da seqüência de aminoácidos do 5° ao 28° aminoácido de um terminal amino,
- 20 onde o 3° resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácidos e o peptídeo apresenta uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular pela ligação a
- 25 GHS-R, ou um sal farmacêuticamente aceitável deste;

(9) a composição farmacêutica de acordo com o item (8) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um resíduo de serina na 3ª posição do terminal amino é um resíduo de

aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo;

(10) a composição farmacêutica de acordo com o item (9) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência nº 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é acilado com um grupo n-octanoil;

(11) uma composição farmacêutica para a promoção da produção de insulina em células β pancreáticas, compreendendo como componente efetivo um peptídeo selecionado do grupo consistindo em um peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência nº 1 onde o 3º resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência nº 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior da seqüência de aminoácidos do 5º ou 28º aminoácido de um terminal amino, onde o 3º resíduo aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido e o peptídeo apresenta uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, ou um sal farmaceuticamente aceitável deste;

(12) a composição farmacêutica de acordo com o item (11) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo;

(13) a composição farmacêutica de acordo com o item (12) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil;

(14) um método para a supressão ou tratamento de hiperglicemia, compreendendo a etapa de administração a um indivíduo exibindo hiperglicemia, de um peptídeo selecionado do grupo consistindo em um peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1, onde o 3° resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior de uma seqüência de aminoácidos do 5° ao 28° aminoácido de um terminal amino, onde o 3° resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral de um resíduo de

aminoácido e o peptídeo apresenta uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a R_HS-R, ou um sal farmacologicamente aceitável deste;

5 (15) o método de acordo com o item (14) acima, onde a hiperglicemia é provocada por uma secreção muito baixa ou nenhuma de insulina devida à debilitação ou morte de células β pancreáticas, ou provocada pela secreção reduzida de insulina em células β pancreáticas;

10 (16) o método de acordo com o item (15) acima, onde a hiperglicemia é provocada por uma secreção muito baixa ou nenhuma de insulina devida à debilitação ou morte de células β pancreáticas;

15 (17) o método de acordo com o item (15) acima, onde a hiperglicemia é provocada pela secreção reduzida de insulina em células β pancreáticas;

(18) o método de acordo com qualquer um dos itens (14) a (17) acima, onde a hiperglicemia apresenta um valor Δ IRI/ Δ BG não maior que 0,4;

20 (19) o método de acordo com qualquer um dos itens (14) a (18) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo;

25 (20) o método de acordo com o item (19) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil;

(21) um método para a promoção de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas, compreendendo a etapa de administração e u indivíduo, de um peptídeo selecionado do grupo consistindo em um peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando uma atividade de aumento da concentração de íons cálcio intracelular por ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1, onde o 3^a resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior da seqüência de aminoácidos do 5° ao 28° aminoácido de um terminal amino, onde o 3° resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido e o peptídeo apresenta uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, ou um sal farmacologicamente aceitável deste;

(22) o método de acordo com o item (21) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um resíduo de serina na 3^a posição de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo;

(23) o método de acordo com o item (22), onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita

como seqüência n° 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido na 3ª posição de um terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil;

(24) um método para a promoção da produção de insulina em células β pancreáticas, compreendendo a etapa de administração a um indivíduo, um peptídeo selecionado do grupo consistindo em um peptídeo ou composto não peptídeo apresentando uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 onde o 3° resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior da seqüência de aminoácidos do 5° ao 28° aminoácido de um terminal amino, onde o 3° resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido e o peptídeo apresenta atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular pela ligação a GHS-R, ou um sal farmaceuticamente aceitável deste;

(25) o método de acordo com o item (24) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado

contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo;

(26) o método de acordo com o item (25), onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita
5 como seqüência n° 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido na 3ª posição de um terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil;

(27) uso de um peptídeo ou composto não peptídeo para a produção de uma composição farmacêutica para a supressão
10 ou tratamento de hiperglicemia, onde o peptídeo é selecionado do grupo consistindo em um peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando atividade para aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de
15 aminoácidos descrita como seqüência-n° 1 onde o 3° resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita
20 como seqüência n° 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior da seqüência de aminoácidos do 5° ao 28° aminoácido de um terminal amino, onde o 3° resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo
25 introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido e o peptídeo apresenta uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R;

(28) uso de acordo com o item (27) acima, onde a
30 hiperglicemia é provocada por uma secreção muito baixa ou

nenhuma de insulina devida à debilitação ou morte de células β pancreáticas, ou provocada pela redução da secreção de insulina em células β pancreáticas;

(29) uso de acordo com o item (28) acima, onde a
5 hiperglicemia é provocada por uma secreção muito baixa ou nenhuma de insulina devida à debilitação ou morte de células β pancreáticas;

(30) uso de acordo com o item (28) acima, onde a
10 hiperglicemia é provocada pela redução da secreção de insulina em células β pancreáticas;

(31) uso de acordo com o item (27) acima, onde a hiperglicemia apresenta um valor $\Delta\text{IRI}/\Delta\text{BG}$ não maior que 0,4;

(32) uso de acordo com qualquer um dos itens (27 a
15 (31) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência nº 1 e um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo;

(33) o uso de acordo com o item (32) acima, onde o
20 peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência nº 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido na 3ª posição de um terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil;

(34) uso de um peptídeo ou composto não peptídeo para
25 a produção de uma composição farmacêutica para a promoção de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas, onde o peptídeo é selecionado do grupo consistindo em um peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando uma
30 atividade de aumento da concentração de íon cálcio

intracelular por ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência nº 1 onde o 3º resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência nº 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior da seqüência de aminoácidos do 5º ao 28º aminoácido de um terminal amino, onde o 3º resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido e o peptídeo apresenta uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R;

(35) o uso de acordo com o item (34) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência nº 1 e um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo;

(36) o uso de acordo com o item (35) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência nº 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido na 3ª posição de um terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil;

(37) uso de um peptídeo ou um composto não peptídeo para a produção de uma composição farmacêutica para a promoção da produção de insulina em células β pancreáticas, onde o peptídeo é selecionado do grupo consistindo em

peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 onde o 3° resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior da seqüência de aminoácidos do 5° ao 28° aminoácido de um terminal amino, onde o 3° resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido e o peptídeo apresenta uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R;

(38) o uso de acordo com o item (37) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo;

(39) o uso de acordo com o item (38) acima, onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido na 3ª posição de um terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil;

(40) um método para a supressão da debilitação, morte ou desgaste de células β pancreáticas, compreendendo a

etapa de administração a um indivíduo, de um peptídeo selecionado do grupo consistindo em de um peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando uma atividade para aumento da concentração de íon cálcio intracelular por

5 ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 onde o 3° resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido, e um

10 peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior da seqüência de aminoácidos do 5° ao 28° aminoácido de um terminal amino, onde o 3° resíduo de aminoácido do terminal amino é um

15 resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido e o peptídeo apresenta uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, ou um sal farmacologicamente aceitável deste;

20 (41) o método de acordo com o item (40), onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila

25 de uma cadeia lateral do resíduo;

(42) o método de acordo com o item (41), onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido na 3ª posição de um

30 terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil;

(43) um método para permitir a neogênese ou regeneração de células β pancreáticas deixando um peptídeo agir sobre as células β pancreáticas ou precursor de células de células β pancreáticas isoladas de um indivíduo, onde o peptídeo é selecionado do grupo consistindo em um peptídeo ou um composto não peptídeo apresentando atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R, um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 onde o 3° resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido, e um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 com retirada, substituição e/ou adição de um a vários aminoácidos no interior da seqüência de aminoácidos do 5° ao 28° aminoácido de um terminal amino, onde o 3° resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido e o peptídeo apresenta uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a GHS-R;

(44) método de acordo com o item (43), onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 e um resíduo de serina na 3ª posição de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado contendo um ácido graxo introduzido em um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo; e

(45) o método de acordo com o item (44), onde o peptídeo apresenta uma seqüência de aminoácidos descrita

como seqüência n° 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido na 3ª posição de um terminal amino é acilado por um grupo n-octanoil.

5 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 mostra os resultados para a análise de insulina no pâncreas no 21º dia após o nascimento. Nesta figura, A é um gráfico indicando a expressão do gene da insulina, B-D mostram os resultados da marcação imuno-histológica de insulina (B mostra um grupo de controle, C mostra um grupo n0-STZ e D mostra um grupo n0-STZ/grelina, respectivamente, com aumento de 100 x), e E mostra um resultado quantitativo para uma área de células marcadas positivas para insulina. Em cada um de A e B, "Cont" indica o grupo de controle, "STZ" indica o grupo n0-STZ, "STZ+G" indica o grupo n0-STZ/grelina, e o valor de cada grupo é o valor médio de três observações \pm EP. Adicionalmente, * indica $P < 0,001$, ** indica $P < 0,01$ e *** indica $P < 0,005$.

20 A Fig. 2 mostra os resultados para a análise pdx-1 no pâncreas no 21º dia após o nascimento. Nesta figura, A mostra o nível de expressão de mRNA e B mostra os resultados da marcação imuno-histológica (B mostra o grupo de controle, C mostra um grupo n0-STZ e D mostra um grupo n0-STZ/grelina, respectivamente, com aumento de 500 x). Em A "Cont" indica o grupo de controle, "STZ" indica o grupo n0-STZ, "STZ+G" indica o grupo n0-STZ/grelina, e um valor para cada grupo é o valor médio de três observações \pm EP. Adicionalmente, * indica $P < 0,0005$ e ** indica $P < 0,0001$.

A Fig. 3 mostra os resultados da análise de insulina no 70° dia após o nascimento. Nesta figura A mostra uma relação entre as concentrações de glicose no sangue e de insulina, B é o gráfico indicando os níveis de expressão do gene de insulina no pâncreas, C-F mostram os resultados da marcação imuno-histológica de insulina no pâncreas (C mostra um grupo de controle, D mostra um grupo n0-STZ e E mostra um grupo n0-STZ/grelina, respectivamente, com aumento de 100 x), e F mostra um resultado de quantificação para uma área de célula marcada positiva para insulina. Em cada um de B e F, "Cont" indica o grupo de controle, "STZ" indica o grupo n0-STZ, "STZ+G" indica o grupo n0-STZ/grelina, e o valor de cada grupo é o valor médio de três observações \pm EP. Adicionalmente, * indica $P < 0,001$, ** indica $P < 0,05$ e *** indica $P < 0,01$.

A Fig. 4 mostra os resultados para a análise pdx-1 no pâncreas no 70° dia após o nascimento. Neste desenho, A mostra os níveis de expressão de mRNA e B-D mostram os resultados da marcação imuno-histológica (B mostra um grupo de controle, C mostra um grupo n0-STZ e D mostra um grupo n0-STZ/grelina, respectivamente, com aumento de 500 x). Em A "Cont" indica o grupo de controle, "STZ" indica o grupo n0-STZ, "STZ+G" indica o grupo n0-STZ/grelina, e o valor para cada grupo é o valor médio de três observações \pm EP. Adicionalmente, * indica $P < 0,001$ e ** indica $P < 0,05$.

A Fig. 5 mostra o resultado de da marcação co phospho-histone H3 para examinar a replicação de células β em ratos com 21 dias de idade. Nesta figura, A mostra um resultado de marcação imuno-histológica com phospho-histone H3 (verde) e insulina (vermelho) para um rato n0-

STZ/grelina, e B mostra o índice (%) de rotulagem com phospho-histone H3 de células β (de 1000 células). "Cont" indica um grupo de controle, "G" indica um grupo grelina, "STZ" indica um grupo n0-STZ, "STZ+G" indica um grupo n0-STZ/grelina, e * indica $P < 0,01$.

A Fig. 6 mostra o índice (%) de rotulagem com phospho-histone H3 de células β em ratos com 70 dias de idade. "Cont" indica um grupo de controle, "G" indica um grupo grelina, "STZ" indica um grupo n0-STZ, "STZ+G" indica um grupo n0-STZ/grelina.

A Fig. 7 mostra pesos corporais (A) e pesos de pâncreas (B) no 9º dia após o nascimento. Controle: um grupo de controle normal, 8 ratos; STZ-veículo: um grupo administrado com veículo tratado com STZ (solução 5% de manitol), 9 ratos; STZ-grelina humana: um grupo administrado com STZ tratado com grelina humana, 8 ratos. Cada valor é a média \pm EP. * indica $P < 0,05$ em comparação com um grupo de controle, e # indica $P < 0,05$ em comparação com um grupo STZ-veículo (teste de comparação múltipla de Dunnatt).

A Fig. 8 mostra pesos corporais (A) e pesos de pâncreas (B) na 9ª semana após o nascimento. Controle um grupo de controle normal, 8 ratos; STZ-veículo: um grupo administrado com veículo tratado com STZ (solução 5% de manitol), 12 ratos; STZ-GHRP-2: um grupo administrado com STZ tratado com GHRP-2, 12 ratos. Cada valor é a média \pm EP. * indica $P < 0,05$ em comparação com um grupo de controle (teste de comparação múltipla de Dunnatt), e # indica $P < 0,05$ em comparação com um grupo STZ-veículo (teste t de Student).

A Fig. 9 mostra pesos corporais (A) e valores de glicose no sangue (B) de camundongos alimentados com dietas

normais ou dietas com alto teor de ácido graxo. A indica pesos corporais medidos em torno das 9 a.m. no 42° dia de dieta com alto teor de ácido graxo e administração da substância de teste, e B indica os valores de glicose no sangue determinados em torno das 9 a.m. no 43° dia de dieta com alto teor de gordura e a administração de substância de teste. ND: um grupo alimentado com dieta normal; HFD-veículo: um grupo administrado com veículo contendo uma dieta de alto teor de ácido graxo (solução 5% de manitol); HFD-grelina: um grupo administrado com 300 µg/kg de grelina humana contendo uma dieta de alto teor de ácido graxo. A substância de teste foi administrada por via subcutânea duas vezes a cada dia de semana e uma vez nos fins de semana. Cada valor é a média de 8 ratos ± erro padrão. * indica $P < 0,05$ em comparação com um grupo ND (teste de comparação múltipla de Dunnett).

A Fig. 10 mostra as concentrações plasmáticas de insulina (A) e as concentrações plasmáticas de glicose (B) em camundongos alimentados com dietas normais ou dietas com alto teor de ácidos graxos e submetidos a administração intraperitoneal de ácido linoléico. Após 50 dias de alimentação com dieta de alto teor de ácido graxo e substância de teste de alimentação com dieta de alto teor de ácido graxo e administração de substância de teste, os camundongos foram jejuados durante uma noite e então submetidos a administração intraperitoneal de 1 ml/kg de ácido linoléico. Uma hora depois, foi retirado sangue para se determinar as concentrações plasmáticas de insulina e de glicose. ND: um grupo alimentado com dieta normal; HFD-veículo: um grupo administrado com veículo contendo uma

dieta de alto teor de ácido graxo (solução 5% de manitol);
HFD-grelina: um grupo administrado com 300 µg/kg de grelina
humana contendo uma dieta de alto teor de ácido graxo.
Cada valor é a média de 8 camundongos ±EP. * indica $P < 0,05$
5 em comparação com um grupo ND (teste de comparação múltipla
de Dunnett).

MELHORES FORMAS DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

Um fármaco da presente invenção pode ser utilizado
10 como um fármaco para um animal (individual) incluindo
humanos. Uma substância que pode ser utilizada na presente
invenção inclui um hormônio de crescimento secretagogo
(GHS), um ligante para receptor de hormônio de crescimento
secretagogo (GHS-R). Embora compostos peptídicos
15 conhecidos ou compostos de baixo peso molecular possam ser
utilizados como o GHS, um composto peptídico de grelina é
especialmente desejável.

Conforme descrito acima, a grelina derivada de
humano, bem como grelina derivada de outros animais tais
20 como rato, camundongo, suínos e bovinos, e derivados destas
podem ser utilizados como grelina.

Para cada indivíduo, a grelina derivada deste
indivíduo é desejavelmente utilizada. Como exemplo,
grelina derivada de humano é desejavelmente utilizada para
25 um humano. Grelina derivada de humano é um peptídeo
consistindo em 28 aminoácidos em que um grupo hidroxila de
uma cadeia lateral de um resíduo de serina na 3ª posição de
um terminal amino é acilado por um ácido graxo (um grupo n-
octanoil) (seqüência nº 1). Um exemplo de um derivado de
30 grelina que pode ser utilizado é um peptídeo apresentando

uma seqüência de aminoácidos descrita como seqüência n° 1 com substituição, inserção ou retirada de um a vários aminoácidos nos resíduos de aminoácido da 5ª ao 28ª posição de um terminal amino, e apresentando uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação a receptor de hormônio de crescimento secretagogo (GHS-R). Uma seqüência de aminoácidos do derivado desejavelmente apresenta homologia de 70%, preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90%, especialmente preferido sendo 95%, quando em comparação com a forma natural da seqüência de aminoácidos. Isto se aplica também à grelina derivada de outros animais (seqüências n°s 2-22).

A grelina e um seu derivado utilizados no fármaco da presente invenção podem ser obtidos por métodos comuns. Como exemplo, isolamento de um material bruto natural ou produção por uma técnica de DNA recombinante e/ou síntese química são possíveis. Quando uma modificação (acilação) adicional de um resíduo de aminoácido é requerida, uma reação de modificação pode ser realizada de acordo com meios conhecidos. Em um método de produção utilizando uma técnica de DNA recombinante, por exemplo, é possível se cultivar uma célula hospedeira transformada com um vetor de expressão contendo o DNA que codifica um peptídeo de acordo com a presente invenção, e um peptídeo alvo pode ser coletado a partir da cultura para se obter a grelina ou um seu derivado de acordo com a presente invenção. A seleção da célula hospedeira pode resultar em um composto contendo o peptídeo alvo modificado (acilado) na célula. Quando o peptídeo não é modificado (acilado), uma reação de

modificação tal como acilação pode ser realizada conforme desejado de acordo com meios conhecidos.

Embora exemplos de um vetor para introdução de um gene incluam vetores de *Escherichia coli* (pBR322, pUC18, pUC19 e semelhantes), vetores de *Bacillus subtilis* (pUB110, pTP5, pC194 e semelhantes), vetores de levedura (tipo YEp, tipo YRp, tipo YIp), e vetores de células animais (retrovírus, vacciniavírus e semelhantes), quaisquer outros vetores podem ser também utilizados desde que o vetor possa
10 manter de forma estável um gene alvo no interior de uma célula hospedeira. O vetor é introduzido na célula hospedeira apropriada.

Os métodos descritos em Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989), por exemplo, podem ser utilizados como
15 método para a introdução de um gene alvo em um plasmídeo ou um método para a introdução em uma célula hospedeira.

De maneira a permitir a expressão de um gene de um peptídeo alvo no plasmídeo descrito acima, um promotor pode ser conectado a montante do gene para que este funcione.
20 Qualquer promotor pode ser utilizado desde que o promotor seja adequado para a célula hospedeira utilizada para expressar o gene alvo. Como exemplo, um promotor lac, um promotor trp, um promotor lpp, um promotor λ PL, um promotor recA ou semelhantes, pode ser utilizado quando a célula
25 hospedeira a ser transformada é do gênero *Escherichia*; um promotor SP01, um promotor SP02 ou semelhantes, pode ser utilizado em com o gênero *Bacillus*; um promotor GAP, um promotor PH05, um promotor ADH ou semelhantes, pode ser utilizado com uma levedura; e um promotor derivado de SV40,

um promotor derivado de retrovírus ou semelhantes, pode ser utilizado com uma célula animal.

Uma célula hospedeira pode ser transformada utilizando-se um vetor contendo um gene alvo obtido como descrito acima. Como célula hospedeira, bactérias (por exemplo, gênero *Escherichia* ou gênero *Bacillus*), leveduras (gênero *Saccharomyces*, gênero *Pichia*, gênero *Candida* ou semelhantes), uma célula animal (células CHO, COS ou semelhantes) ou semelhantes podem ser utilizadas. Meio líquido é adequado como meio de cultura, e é especialmente preferível que o meio inclua uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e outras requeridas para o crescimento de uma célula transformada a ser transformada. Vitaminas, um fator de promoção de crescimento, soro e outros podem ser adicionados se desejado.

Para a produção direta de um peptídeo modificado (acilado) com ácido graxo, desejavelmente as células apresentam uma atividade de protease capaz de cortar um polipeptídeo precursor do peptídeo em uma posição apropriada, e apresentam uma atividade que permite a acilação de um resíduo de serina no peptídeo. As células hospedeiras apresentando uma atividade de protease como tal podem ser selecionadas pela transformação das células hospedeiras com um vetor de expressão incluindo um cDNA que codifica o polipeptídeo precursor, e confirmando-se que as células hospedeiras produzem um peptídeo modificado com ácido graxo apresentando atividade de aumento de cálcio ou liberação de hormônio de crescimento.

Após o cultivo, a grelina pode ser isolada e purificada a partir da cultura por um método comum. Como

exemplo, de maneira a se extrair uma substância alvo de corpos celulares cultivados ou células, os corpos celulares ou células podem ser coletados após o cultivo e suspensos em uma solução tampão incluindo um desnaturante de proteína (tal como hidrocloreto de guanidina), e então os corpos celulares ou células podem ser homogeneizados por ultra-som ou semelhante e depois submetidos a centrifugação. Para a purificação da substância alvo a partir do sobrenadante, métodos de isolamento e purificação tais como filtração em gel, ultrafiltração, diálise, SDS-PAGE, e várias cromatografias, podem ser apropriadamente combinados e realizados considerando-se o peso molecular, solubilidade, carga (ponto isoelétrico), afinidade e outros, da substância alvo.

15 Grelina e um seu derivado podem ser quimicamente sintetizados por um método comum. Como exemplo, grelina e um seu derivado podem ser obtidos por condensação de aminoácidos contendo grupos protetores por um método de fase líquida e/ou um método de fase sólida para estender uma cadeia peptídica, removendo-se todos os grupos protetores com ácido, e purificando-se o produto bruto resultante com um método de purificação conforme descrito acima. Uma cadeia lateral de um aminoácido em uma posição 20 alvo pode ser seletivamente acilada por uma enzima de acilação ou uma acil transferase.

Vários métodos para a produção de peptídeos são convencionalmente conhecidos, e a grelina pode também ser produzida facilmente de acordo com um método conhecido. Como exemplo, grelina pode ser facilmente produzida de

acordo com um método de síntese de peptídeo clássico ou um método em fase sólida.

Adicionalmente, um método de produção utilizando uma combinação de uma técnica de DNA recombinante e síntese química pode ser também utilizado. Grelina pode ser produzida por um método em que um fragmento incluindo um resíduo de aminoácido modificado é produzido por síntese química, enquanto que o outro fragmento não incluindo um resíduo de aminoácido modificado é produzido utilizando-se uma técnica de DNA recombinante, e depois os fragmentos são fundidos entre si (ver publicação internacional WO 01/07475).

Um sal de grelina, e um derivado deste, que pode ser utilizado na presente invenção é preferivelmente um sal farmacologicamente aceitável, por exemplo, um sal com uma base inorgânica, um sal com uma base orgânica, um sal com um ácido inorgânico, um sal com um ácido orgânico, ou um sal com um aminoácido básico ou ácido.

Exemplos adequados de um sal com uma base inorgânica incluem um sal de metal alcalino tal como um sal de sódio e um sal de potássio; um sal de metal alcalino terroso tal como um sal de cálcio e um sal de magnésio; um sal de alumínio e um sal de amônio.

Exemplos adequados de um sal com uma base orgânica incluem sais com trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, diiclohexilamina, N,N'-dibenziletlenodiamina, e outros.

Exemplos adequados de um sal com um ácido inorgânico incluem sais com ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico e outros.

Exemplos adequados de um sal com um ácido orgânico incluem sais com ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoracético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, 5 ácido málico, ácido metanosulfônico, ácido benzenosulfônico, ácido p-toluenosulfônico e outros.

Exemplos adequados de um sal com um aminoácido básico incluem sais com arginina, lisina, ornitina, e outros, e exemplos adequados de um sal com um aminoácido ácido 10 incluem sais com ácido aspártico, ácido glutâmico, e outros.

Entre os sais descritos acima, o sal de sódio e o sal de potássio são os mais preferidos.

No que diz respeito às ações biológicas da grelina, 15 um derivado pode ser selecionado utilizando-se a atividade de ligação para o receptor GHS-R 1A que é um GHS-R, como um indicador, ou as ações fisiológicas descritas na publicação mencionada acima. Um método conhecido pode ser utilizado como método de determinação da concentração de íon cálcio 20 intracelular e, por exemplo, pode ser utilizado FLIPR (leitora de placa de imagem fluorimétrica, Molecular Devices) utilizando uma alteração da intensidade da fluorescência de Fluo-4 AM (Molecular Probe) devida a uma alteração na concentração de íon cálcio. Adicionalmente, 25 um método conhecido pode ser utilizado para verificar se um peptídeo apresentando uma atividade de aumento de cálcio apresenta atividade de liberação de hormônio de crescimento *in vitro* e *in vivo*. No caso *in vitro*, por exemplo, o peptídeo pode ser adicionado a células de glândula 30 pituitária que secretam hormônio de crescimento e que

mostram expressão de GHS-R e o hormônio de crescimento secretado no meio de cultura celular pode ser determinado por radioimunoensaio utilizando um anticorpo anti-hormônio de crescimento. Para se verificar a liberação de hormônio de crescimento *in vivo*, o peptídeo apresentando uma atividade de aumento de cálcio pode ser injetado em uma veia periférica de um animal para se determinar depois a concentração sorológica do hormônio de crescimento. Adicionalmente, J. Med. Chem., 43, pp. 4370-4376, 2000, por exemplo, pode ser utilizada como referência para um derivado de grelina e a um método para sua preparação.

Conforme especialmente mostrado nos Exemplos do presente relatório, grelina e um seu derivado têm uma função de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas quando administrados a um indivíduo, e podem aumentar significativamente um número de células positivas para insulina nas células β pancreáticas. Grelina e um seu derivado têm também uma função de promoção da produção de insulina em células β pancreáticas e aumento do acúmulo de insulina em células β pancreáticas.

Embora tenha sido reportado que a grelina reduza a secreção de insulina por células β pancreáticas, um mecanismo de produção e acúmulo de insulina pode ser diferente daquele de secreção de insulina, e uma função de um fármaco da presente invenção pode residir na neogênese ou regeneração de células β pancreáticas e promoção da produção de insulina em células β pancreáticas para aumentar a quantidade de estoque de insulina e, desta forma, aumentar o potencial da secreção de insulina.

Desta forma, pela administração do fármaco da presente invenção a um indivíduo, pode ser aumentado o número de células β capazes de secreção de insulina no pâncreas, e a neogênese ou regeneração de células β pancreáticas apresentando função de secreção de insulina se torna possível.

Com isto, o fármaco da presente invenção apresentando uma função permitindo a neogênese ou regeneração de células β pancreáticas pode ser utilizado para suprimir a debilitação, morte ou exaustão de células β pancreáticas em um indivíduo e proteger as células β pancreáticas. Adicionalmente, o desenvolvimento de diabetes pode ser prevenida pela administração do fármaco da presente invenção a um indivíduo em condição hiperglicêmica antes do desenvolvimento da diabetes. Além disto, quando a condição da diabetes não é séria, a progressão da incidência de diabetes pode ser inibida pela administração do fármaco da presente invenção a um indivíduo. Em uma situação de diabetes séria (um valor $\Delta\text{IRI}/\Delta\text{BG}$ não maior que 0,4), um tratamento curativo da diabetes com neogênese ou regeneração de células β pancreáticas pode ser realizado por administração do fármaco da presente invenção a um indivíduo. A ocorrência de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas pode ser demonstrada, por exemplo, pela confirmação da expressão de pdx-1, um dos principais fatores de transcrição para a diferenciação de pâncreas.

Adicionalmente, uma terapia de regeneração, no que diz respeito às células β pancreáticas, pode ser realizado permitindo-se o fármaco da presente invenção agir sobre células β pancreáticas isoladas de um indivíduo em um tubo

de teste para promover a regeneração de células β pancreáticas e proliferação das células, e enxertando-se as células em um local do indivíduo que sofre de debilitação ou morte de células β pancreáticas ou em um local em que a

5 progressão da debilitação ou morte de células β pancreáticas é prevista. Métodos para a identificação e isolamento de células precursoras de células β pancreáticas são atualmente sendo estudados com vigor por muitos grupos de pesquisa em todo o mundo, e vários métodos foram

10 desenvolvidos (ver, por exemplo, Lancet, 364, pp. 203-205, 2004). A neogênese ou regeneração de células β pancreáticas é possibilitada deixando-se a grelina ou um seu derivado agir sobre células precursoras isoladas de células β pancreáticas, e um grupo de células obtido como

15 tal pode ser enxertado em um corpo vivo de um indivíduo para possibilitar a terapia de regeneração para células β pancreáticas.

O fármaco da presente invenção, incluindo grelina, um derivado desta ou um sal farmacologicamente aceitável desta,

20 como um componente efetivo, pode ser misturado com um veículo, excipiente, extensor ou semelhantes farmacologicamente aceitáveis e utilizado para um indivíduo (por exemplo, humano, camundongo, rato, coelho, canino, felino, bovino, eqüino, suíno, símio, etc.). Uma dose não

25 é especificamente limitada e pode ser selecionada conforme apropriado correspondendo a, por exemplo, um objetivo de uso do fármaco da presente invenção, ou idade, peso corporal, ou espécie do indivíduo. Para um humano adulto, uma dose de 50-200 μ g como peso de grelina ou derivado

30 desta, pode ser administrada em torno de uma ou duas vezes

ao dia, ou a dose pode ser administrada continuamente pode cerca de uns poucos dias ou poucas semanas.

Grelinina, um derivado desta ou um sal farmaceuticamente aceitável desta, pode ser misturada com
5 um veículo farmaceuticamente aceitável e administrada oralmente ou parenteralmente como uma preparação sólida tal como um tablete, uma cápsula, grânulo ou pó, ou como uma preparação líquida tal como um xarope ou uma injeção.

10 Uma variedade de substâncias veículo orgânicas ou inorgânicas comumente utilizadas como material de preparação, é utilizada como veículo farmaceuticamente aceitável que é misturado, por exemplo, como excipiente, lubrificante, ligante, ou um desintegrante em uma
15 preparação sólida, ou como solvente, adjuvante de solubilização, um agente de suspensão, um agente isotônico, um tampão, ou um agente suavizante em uma preparação líquida.

Adicionalmente, um aditivo de preparação tal como um conservante, um antioxidante, um agente corante, ou um
20 adoçante, pode também ser utilizado conforme requerido.

Exemplos adequados de excipiente incluem lactose, sacarose, D-manitol, amido, celulose cristalina, anidrido da ácido sílico leve, e outros. Exemplos adequados de lubrificante incluem estearato de magnésio, estearato de
25 cálcio, talco, sílica coloidal e outros.

Exemplos adequados de ligante incluem celulose cristalina, sacarose, D-manitol dextrina, hidroxipropil-celulose, hidroxipropilmetilcelulose, polivinil pirrolidona e outros.

Exemplos adequados de desintegrante incluem amido, carboximetilcelulose, carboximetilcelulose de cálcio, croscarmelose sódica, carboximetilamido sódico e outros.

Exemplos adequados de solvente incluem água para
5 injeção, um álcool, propilenoglicol, macrogol, óleo de gergelim, óleo de milho e outros.

Exemplos adequados de adjuvante de solubilização incluem polietilenoglicol, propilenoglicol, D-manitol, benzoato de benzila, etanol, trisaminometano, colesterol,
10 trietanolamina, carbonato de sódio, citrato de sódio e outros.

Exemplos adequados de agente de suspensão incluem surfactantes tais como esteariltrietaolamina, laurilsulfato de sódio, laurilaminopropionato, lecitina,
15 cloreto de benzalcônio, cloreto de bezetônio e monoestearato de glicerol; e polímeros hidrofílicos tais como álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulose sódica, metilcelulose, hidroximetilcelulose, hidroxietilcelulose, e hidroxipropilcelulose.

Exemplos adequados de agente isotônico incluem
20 cloreto de sódio, glicerol, D-manitol e outros.

Exemplos adequados de tampão incluem soluções tampão de fosfato, acetato, carbonato, citrato e outros.

Um exemplo adequado de um agente suavizante inclui
25 álcool benzílico.

Exemplos adequados de conservante incluem paraoxibenzoatos, clorobutanol álcool benzílico, álcool fenético, ácido desidroacético, ácido sórbico, e outros.

Exemplos adequados de antioxidante incluem sulfito,
30 ácido ascórbico e outros.

Exemplos de formas de preparação adequadas para administração parenteral incluem injeções para administração intravenosa, administração intradérmica, administração hipodérmica, administração intramuscular, e
5 outras, gotas, um supositório, um agente de absorção transdérmica, uma gente de absorção transmucosa, e um inalante, enquanto que exemplos de formas de preparação adequadas para administração oral incluem uma cápsula, um tablete, xarope, e outras. Como uma forma de preparação do
10 fármaco da presente invenção, entretanto, a forma de preparação adequada para administração parenteral, tal como uma injeção, gotas, ou um inalante, é preferida. Várias formas de preparação como tal são conhecidas dos especialistas na técnica, e os especialistas na técnica
15 podem selecionar uma forma de preparação adequada para a administração desejada como apropriada para produzir uma preparação em uma forma de uma composição farmacêutica utilizando, quando requerido, um ou mais aditivos para preparação disponíveis na técnica.

20 Como um exemplo, um fármaco na forma de uma injeção ou gota pode ser preparado pela dissolução de grelina ou um derivado desta como um componente efetivo, em conjunto com um ou mais aditivos para a preparação tais como um agente isotônico, um agente de ajuste de pH, um agente suavizante,
25 ou um conservante, em água destilada para injeção e então esterilização. Adicionalmente, um fármaco em uma forma de uma injeção ou gota pode ser também provido como um fármaco em uma forma liofilizada. Um fármaco como tal pode ser dissolvido imediatamente antes da utilização pela adição de
30 água para injeção destilada, uma solução salina fisiológica

ou semelhantes, e pode então ser utilizado como injeção ou gota. Adicionalmente, para administração transmucosa, por exemplo, um agente de administração intranasal tal como um colunário ou um spray intranasal, ou um agente de administração à cavidade oral tal como um agente sublingual é também adequado.

Exemplos

Embora a presente invenção seja descrita mais especificamente com exemplos, o escopo da presente invenção não está limitado aos exemplos a seguir.

Exemplo 1

1. Material e Método

Fêmeas ou machos de ratos Sprague Dawley, adquiridos de Charles River foram mantidos com livre acesso a água e a uma dieta com péletes padrão para ratos (352 kcal/100 g. CE-2. CLEA). As fêmeas foram engaioladas com um macho por uma noite, e a gravidez foi detectada por apalpação 14 dias mais tarde. Nascimento natural ocorreu 22 dias após o acasalamento. Foram examinados três grupos experimentais como se segue: um grupo de controle (ratos Sprague Dawley) onde os ratos recém nascidos receberam uma única injeção intraperitoneal de tampão citrato; um grupo n0-STZ em que os ratos receberam uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ); e um grupo n0-STZ/grelina em que os ratos receberam uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina, e então receberam grelina derivada de rato (doravante chamada de grelina de rato, seqüência nº 3, 100 µg/kg de peso corporal) por injeção subcutânea duas vezes ao dia do 2º ao 8º dia após o nascimento por 7 dias.

A estreptozotocina (Sigma, 100 mg/kg de peso corporal) foi dissolvida em tampão citrato (0,05 mmol/l, pH 4,5) e imediatamente injetada por rota intraperitoneal uma vez em um rato imediatamente após o nascimento. Os
5 filhotes foram deixados com suas mães. Para cada rato neonatal foi analisado o açúcar na urina no 2º dia com Multistix SG (Bayer Medical). Apenas os ratos que eram glicosúricos (valor 3+ com o teste Multistix SG) no dia 2 após o nascimento foram incluídos no grupo n0-STZ. Os
10 animais foram sacrificados no dia 21 ou dia 70 por sangramento sob anestesia com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Foram coletadas amostras de sangue da veia cava inferior, centrifugadas imediatamente a 4°C, e mantidas a -80°C até o momento do
15 ensaio.

Após o corte, os pâncreas foram removidos e pesados. De maneira a se determinar o teor de insulina, os pâncreas (35-50 mg) foram homogeneizados e centrifugados em 5 ml de ácido-etanol (solução etanólica 75% (em volume) de HCl 0,15
20 M), e os sobrenadantes foram mantidos a -80°C. Para a imunohistoquímica, pâncreas adicionais foram fixados em fixador de paraformaldeído 4% por 24 horas, e colocados em parafina.

Insulina e pdx-1 foram detectados por
25 imunohistoquímica em seções de tecido com 3 µm de espessura utilizando-se uma técnica de marcação indireta com peroxidase. Cada seção foi incubada com um anticorpo primário (cobaia anti-insulina de suíno, DACO) ou (coelho anti-camundongo/rato IDX-1; CHEMICON) por 1 hora. A
30 marcação foi realizada por incubação com kit de 3,3'-

diaminobenzidina tetrahydrocloro (DAB) (DakoCytomation). Foram realizadas avaliações quantitativas de área de células β total por um procedimento de análise de imagem auxiliada por computador utilizando-se um microscópio
5 Olympus BX 51 conectado a uma câmara digital DP 12 e o programa Mac SCOPE Versão 2.6 (Mitani, Fukui, Japão). A área de células β e área total de seção pancreática foram avaliadas para cada seção marcada. Um volume relativo de células β foi determinado por um método estereológico
10 morfológico, com o cálculo da razão entre as áreas ocupadas por células imuno-reativas e aquelas ocupadas por células pancreáticas totais.

O RNA total foi extraído dos pâncreas de ratos como previamente reportado (Biochem. Biophys. Res. Commun., 214,
15 pp. 239-246, 1995). De maneira a sintetizar a primeira fita de cDNA, os produtos extraídos foram utilizados como moldes em reações contendo RT (Invitrogen) e o iniciador 3' alvo. Uma análise RT-PCR foi realizada de acordo com um método previamente reportado (Biochem. Biophys. Res.
20 Commun., 214, pp. 239-246, 1995). A primeira fita de cDNA foi utilizada em análises PCR subsequentes. As análises PCR, foram utilizados os iniciadores de oligonucleotídeo como se segue para cada cDNA alvo. A identidade do produto de PCR foi confirmada por eletroforese em gel de agarose.

25 Insulina-1:

5'-tagaccatcagcaagcaggtc (Seqüência n° 22)

3'-cacaccaggtacagagcct (Seqüência n° 23)

Insulina-2:

5'-cacttggtggaagctctctacc (Seqüência n° 24)

30 3'-gacagggtagtggtggcctagt (Seqüência n° 25)

Pdx-1:

5'-aggaggtgcatacgcagcag (Seqüência n° 26)

3'-gaggccgggagatgtatttgg (Seqüência n° 27)

PCR em tempo real foi realizado como se segue. O
5 cDNA (1 µl) foi misturado com 2xPCR Master Mix (Applied
Biosystems) (25 µl), água destilada esterilizada (23 µl), e
iniciadores senso e anti-senso (10 pmol/µl, 0,5 µl) de
insulina e pdx-1. Quarenta ciclos de amplificação PCR
foram realizados utilizando-se o sistema "thermal cycler"
10 (ABI PRISM 7700, Applied Biosystems, Japão), por 15
segundos a 95°C seguido por 60 segundos a 60°C. A
concentração de cada produto mRNA foi quantificada
utilizando-se curvas de calibração expressando a
intensidade de fluorescência contra a quantidade de produto
15 PCR padronizada.

Todos os dados de expressão foram normalizados para a
quantidade de RNA ribossômico 18s da amostra do mesmo
indivíduo.

Os níveis de plasma e glicose no sangue foram
20 determinados com um analisador de glicose (Antsense 2,
Sankyo). A insulina foi extraída dos pâncreas como
descrito (Endocrinology, 140, pp. 4861-4873, 1999). As
concentrações de insulina foram determinadas com um kit
ELISA Lebis Insulin (Shibayagi).

25 Os valores medidos foram expressos como média ±EPM.
As diferenças entre os ratos do grupo de controle e o grupo
que recebeu STZ foram avaliadas por ANOVA, uma análise de
variância.

2. Resultados

As características dos ratos com 21 dias de idade estão resumidas na Tabela 1. Os pesos corporais, as concentrações de glicose no sangue em jejum (FBG) e as concentrações de insulina não foram significativamente diferentes entre o grupo de controle e o grupo n0-STZ. O grupo n0-STZ e o grupo n0-STZ/grelina também não foram significativamente diferentes entre si no que diz respeito a estes parâmetros. As concentrações FBG no grupo n0-STZ/grelina, entretanto, foram significativamente mais baixas que as do grupo de controle ($P < 0,01$).

(Tabela 1)

	Controle	n0-STZ	n0-STZ/grelina
Peso Corporal (g)	37,8 ± 5,0 (20)	37,6 ± 4,8 (15)	36,3 ± 3,9 (9)
FBG (mg/dl)	114 ± 8,6 (17)	106,7 ± 16,6 (15)	100,6 ± 7,6 (8) ^{*1}
Insulina no Plasma (ng/ml)	0,32 ± 0,10 (7)	0,32 ± 0,19 (6)	0,35 ± 0,17 (6)

Cada valor é a média ± EP (número de ratos)

*1: $P < 0,01$ (em comparação com o controle)

Os níveis de expressão do mRNA de insulina nos pâncreas foram marcadamente reduzidos no grupo n0-STZ/grelina quando em comparação com o grupo de controle. Estes níveis, retornaram para níveis semelhantes aos do grupo de controle depois do tratamento com grelina de rato (o grupo n0-STZ/grelina) (Fig. 1A). O nível de expressão de mRNA de insulina pancreática do grupo n0-STZ foi cerca

de 1/3 daquele do grupo n0-STZ/grelina, no entanto o grupo n0-STZ exibiu níveis de insulina no plasma comparáveis com os do grupo de controle e do grupo n0-STZ/grelina. A imuno-marcação de insulina do pâncreas foi em concordância com os resultados da expressão do gene (Figs. 1A-E). Uma ilha de Langerhans foi menor no grupo n0-STZ em comparação com o grupo de controle (Figs. 1B, C, E). Uma ilha de Langerhans no grupo n0-STZ/grelina foi maior que a do grupo n0-STZ, mas menor que a do grupo de controle (Figs. 1B-E).

De maneira a explorar o mecanismo que governa a alteração da expressão de insulina no pâncreas, foi examinada a expressão de pdx-1, um dos principais fatores de transcrição para a diferenciação de um pâncreas. Os níveis de mRNA de pdx-1 e de proteína se alteraram de maneira semelhante aos da insulina (Figs. 2A-D). Embora os níveis de expressão do gene de pdx-1 no grupo n0-STZ foram abaixo de 1/10 do nível do grupo de controle, os níveis do grupo n0-STZ/grelina após o tratamento com grelina de rato foram recuperados para os níveis similares àqueles do grupo de controle (Fig. 2A). A marcação por imunofluorescência de pdx-1 no pâncreas foi em concordância com os resultados da marcação de insulina (Figs. 2B-D).

Desta forma, este modelo n0-STZ exibiu produção reduzida de insulina no 21º dia, enquanto que os níveis de glicose no sangue não foram alterados. A supressão de uma redução na produção de insulina neste modelo pelo tratamento com grelina de rato foi confirmada a um nível de mRNA e um nível de proteína.

Uma vez sabe-se que o modelo n0-STZ gradualmente desenvolve hiperglicemia depois de 8-10 semanas de idade, um efeito de longo prazo de um tratamento precoce com grelina neste modelo foi examinado. As características do grupo de controle, grupo n0-STZ e grupo n0-STZ/grelina com 10 semanas de idade são mostradas na Tabela 2.

(Tabela 2)

	Controle	n0-STZ	n0-STZ/grelina
Peso Corporal (g)	317 ± 14 (6)	285 ± 19 (5) ^{*1}	248 ± 40 (13) ^{*2}
FBG (mg/dl)	103,3 ± 15,6 (6)	213 ± 12,8 (5) ^{*3}	137 ± 28,7 (13) ^{#1}
Insulina Plasma (ng/ml)	1,05 ± 0,25 (6)	1,75 ± 0,89 (5)	0,93 ± 0,49 (8)
Peso Pâncreas (mg)	414 ± 81 (6)	520 ± 95 (5)	556 ± 83 (13)
Insulina Pâncreas (µg/Pâncreas)	78,6 ± 19,0 (6)	39,6 ± 31,6 (5)	92,6 ± 6,9 (8) ^{#2}

10 Cada valor representa a média ± EP (número de ratos)

*1: P<0,05, *2: P<0,01, *3: P<0,0001; em comparação com o grupo de controle

#1: P<0,0001, #2: P<0,01; em comparação com o grupo n0-STZ

15

O grupo n0-STZ demonstrou peso corporal e hiperglicemia reduzidos quando em comparação com o grupo de controle. Embora as concentrações de insulina no plasma deste grupo não tenham se reduzido, a concentração de insulina de cada animal se mostrou como sendo relativamente baixa para concentração de glicose elevada (Tabela 2, Fig.

20

3A). De fato, os níveis de insulina pancreática foram reduzidos quando em comparação com os do grupo de controle (Tabela 2).

Por outro lado, os níveis de FBG do grupo n0-STZ/grelina foram significativamente mais baixos que os do grupo n0-STZ, e não foram significativamente mais altos que os do grupo de controle. Adicionalmente, os teores de insulina pancreática foram mantidos em um nível tão alto quanto os do grupo de controle. Os pesos corporais do grupo n0-STZ/grelina foram significativamente mais baixos que os do grupo de controle, mas não foram diferentes dos do grupo n0-STZ.

A expressão de mRNA de insulina no estágio de adulto no grupo n0-STZ foi ainda em um nível baixo, embora ligeiramente recuperado.

O grupo n0-STZ/grelina, por outro lado, mostrou um nível semelhante ao do grupo de controle tal como no 21º dia após o nascimento (Fig. 3B). Adicionalmente, quanto à marcação imunohistoquímica de insulina, uma ilhota de Langerhans no grupo n0-STZ/grelina foi maior que a do grupo n0-STZ, mas menor que a do grupo de controle (Figs. 3C-F).

O padrão dos níveis de expressão de mRNA e de proteína do pdx-1 em três grupos de ratos adultos foi semelhante ao dos níveis no 21º dia após o nascimento (Fig. 4). A expressão do gene de pdx-1 no grupo n0-STZ foi reduzida para aproximadamente 1/3 da do grupo de controle, enquanto que o nível no grupo n0-STZ/grelina retornou ao nível próximo ao do grupo de controle (Fig. 4A). Na marcação por imunofluorescência para pdx-1 no pâncreas, foi observado um padrão semelhante ao da insulina (Figs. 4B-D).

Conforme descrito acima, no modelo n0-STZ, os animais desenvolveram uma produção reduzida de insulina no pâncreas e desenvolveram hiperglicemia em 10 semanas após o nascimento. O tratamento com grelina de rato foi capaz de

5 inibir esta exacerbação mantendo ou promovendo a produção de insulina. A expressão aumentada de pdx-1 pode também estar parcialmente envolvida nesta manutenção da produção de insulina. Uma vez que foi observada uma expressão aumentada de pdx-1, um fator de transcrição que representa

10 um papel importante no desenvolvimento e diferenciação do pâncreas, no grupo n0-STZ/grelina, é sugerido que as células β pancreáticas destruídas pela administração de STZ imediatamente após o nascimento foram regeneradas pela administração de grelina, e a regeneração das células β

15 pancreáticas pode ter contribuído para manter a produção de insulina.

Exemplo 2

1. Material e Método

Seções de pâncreas que não foram utilizadas para

20 estudos morfológicos foram utilizadas para examinar a replicação de células β . As seções foram submetidas a marcação dupla para phospho-histone H3 (Ser10) e insulina. As seções foram incubadas durante a noite com uma diluição 50 vezes de anticorpo anti phospho-histone H3 (Ser10) (Cell

25 Signaling Technology) a 4°C. Após o que as seções foram incubadas com anticorpo de cobaia anti-insulina à temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagem com PBS por 6 vezes, as seções foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos em uma solução de bloqueio com um anticorpo

30 secundário conjugado com fluorescência (Alexa Fluor 488 e

546, Molecular Probe). Após lavagem com PBS, as seções foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (Vector Laboratories) e examinadas por microscopia de varredura a laser confocal (Leica Microsystems). Pelo menos 1000
5 células β foram contadas por seção.

2. Resultado

De maneira a se examinar se a proliferação de célula β com grelina contribuiu para os efeitos sobre a produção de insulina e o número de células β em um rato tratado com
10 STZ ou não, foi realizada uma análise imunohistoquímica com phospho-histone H3. Phospho-histone H3 é um marcador de proliferação celular por mitose (J. Clin. Invest., 113, pp.1364-1374, 2004; Br. J. Cancer, 88, pp. 257-262, 2003).
15 O resultado é mostrado na Fig. 5A. Em ratos com 21 dias de idade, as células duplamente positivas para phospho-histone H3 e insulina aumentaram por tratamento com grelina de rato aproximadamente em 1,7 vezes e 15 vezes do grupo grelina e no n0-STZ/grelina quando em comparação com o ratos de
20 controle e ratos n0-STZ, respectivamente (Fig. 5B). Em ratos com 10 semanas de idade, embora não tenha havido diferenças significativas entre os quatro grupos, ocorreu uma tendência das células duplamente positivas para phospho-histone H3 e insulina em aumentar para o tratamento
25 com grelina de rato no modelo STZ, enquanto que as células duplamente positivas tenderam a se reduzir por tratamento com grelina no grupo de controle (Fig. 6). Uma vez que as expressões de pdx-1, insulina e phospho-histone H3 em um rato n0-STZ/grelina foram significativamente aumentadas
30 quando em comparação com os níveis observados para um rato

n0-STZ de controle com 21 dias de idade, foi sugerido que a grelina estimula a regeneração e replicação de células β em ratos neonatais tratados com STZ.

5 Exemplo 3

Uma vez que o efeito da grelina de rato foi confirmado no exemplo 1 e no exemplo 2, o efeito de grelina derivada de humano (doravante chamada de grelina humana, seqüência n° 1) foi a seguir examinado utilizando-se um
10 modelo STZ de rato neonatal como no exemplo 1. A grelina humana é diferente da grelina de rato em dois aminoácidos.

1. Material e Método

Fêmeas grávidas de rato Sprague Dawley, adquiridas de
15 Charles River, foram deixadas com livre acesso a água e uma dieta de pélete padrão para rato (CRF-1, Oriental Yeast Co., Ltd.), e foram permitidos partos naturais. Três grupos experimentais foram estabelecidos como se segue: grupo de controle onde os ratos receberam uma única injeção
20 peritoneal de tampão citrato imediatamente depois do nascimento; grupo STZ-veículo onde os ratos receberam uma única injeção peritoneal de STZ, e então veículo (solução 5% de manitol) foi administrado por via subcutânea duas vezes ao dia a partir do 2° dia após o nascimento durante 7
25 dias; e grupo STZ-grelina humana onde os ratos receberam uma única injeção peritoneal de STZ, e então grelina humana (seqüência n° 1, 100 μ g/kg de peso corporal) foi injetada por via subcutânea duas vezes ao dia a partir do 2° dia depois do nascimento durante 7 dias.

O STZ foi preparado e administrado como no exemplo 1. Cada rato macho neonatal foi verificado para açúcar na urina no 2° dia com Pretest 3aII (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Apenas os ratos glicosúricos (valor 3+ com Pretest 3aII) no dia 2 após o nascimento foram incluídos nos estudos a seguir. Os ratos foram desmamados na noite do 20° dia após o nascimento. Foram coletadas amostras de sangue da veia da cauda enquanto acordados na 8ª semana (57° dia) após o nascimento para se determinar as concentrações de glicose e insulina no plasma. Adicionalmente, após a medida do peso corporal na 9ª semana (62° ou 63° dia) após o nascimento, foram coletadas amostras de sangue da aorta abdominal sob anestesia com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Os pâncreas totais foram removidos e pesados. Após o que, os pâncreas foram divididos em duas peças e mantidos para a determinação do teor de insulina. As amostras de sangue foram centrifugadas imediatamente a 4°C para preparar amostras de plasma, e mantidas a -80°C até a determinação das concentrações de glicose e insulina. A concentração de glicose foi determinada utilizando-se um Glucose CII-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), enquanto que a concentração de insulina foi determinada utilizando-se um kit de determinação de insulina altamente sensível (Morinaga Institute of Biological Science, Inc.).

2. Resultado

Foram examinados os efeitos da administração por 7 dias de grelina humana imediatamente depois da administração de STZ sobre as concentrações de glicose e

insulina no plasma na 8ª semana (após 4 horas de jejum). Os resultados são mostrados na Tabela 3. As concentrações de glicose no plasma foram significativamente aumentadas no grupo com veículo em comparação com o grupo de controle, enquanto que as concentrações de glicose no grupo STZ-grelina humana aumentaram ligeiramente e não foram significativamente diferentes das do grupo de controle. As concentrações de insulina no plasma, por outro lado, não foram significativamente diferentes entre os grupos.

10

(Tabela 3)

	Controle	STZ-veículo	STZ-grelina humana
Glicose no Plasma (mg/dl)	116,0 ± 1,7 (8)	330,4 ± 26,5 (9) ^{*1}	222,1 ± 10,5 (8)
Insulina no Plasma (ng/ml)	2,44 ± 0,12 (8)	2,07 ± 0,15 (9)	2,73 ± 0,15 (8)

Cada valor é a média ± EP (número de ratos)

*1: P<0,05; em comparação com o grupo de controle (teste de comparação múltipla de Dunnett).

15

Foram então analisados os pesos corporais, pesos dos pâncreas, e teores de insulina nos pâncreas na 9ª semana. Os resultados dos pesos corporais e pesos dos pâncreas são mostrados na Fig. 7. Embora os pesos corporais no grupo STZ-veículo tenham sido significativamente menores que os do grupo de controle, a redução dos pesos corporais no grupo STZ-grelina humana foi suprimida e os pesos corporais foram comparáveis aos do grupo de controle. O grupo STZ-

20

veículo mostrou um valor ligeiramente baixo dos pesos dos pâncreas quando em comparação com o grupo de controle. No grupo STZ-grelina humana, por outro lado, os pesos dos pâncreas foram significativamente mais altos que os do grupo STZ-veículo.

Uma vez que um aumento dos pesos dos pâncreas foi mostrado no grupo STZ-grelina humana, os teores de insulina nos pâncreas foram comparados. Os pâncreas foram divididos para se obter duas amostras, amostras do lado do baço e amostras do lado dos intestinos, e os teores de insulina no pâncreas foram calculados a partir do teor de insulina de cada amostra e analisado. Os resultados são mostrados na Tabela 4. No grupo STZ-veículo, os teores de insulina nos pâncreas calculados a partir de dois locais foram significativamente reduzidos quando em comparação com o grupo de controle. Embora os teores de insulina do grupo STZ-grelina humana tenham sido também significativamente mais baixos que os do grupo de controle, os teores foram cerca de duas vezes mais altos que os do grupo STZ-veículo.

(Tabela 4)

	Controle	STZ-veículo	STZ-grelina humana
Teor de Insulina (Lado do Baço) ($\mu\text{g}/\text{pâncreas}$)	454,5 \pm 31,6 (8)	67,1 \pm 8,9 (9) ^{*1}	120,9 \pm 14,1 (8) ^{*1}
Teor de Insulina (Lado dos Intestinos) ($\mu\text{g}/\text{pâncreas}$)	309,9 \pm 25,8 (7)	29,4 \pm 3,2 (9) ^{*1}	63,0 \pm 6,7 (8) ^{*1}

Cada valor é o valor médio \pm EP (número de ratos)

*1: $P < 0,05$; em comparação com o grupo de controle (teste de comparação múltipla de Dunnett).

5 A partir dos resultados acima, foi observado que o tratamento com grelina humana imediatamente após a administração de STZ em um modelo STZ neonatal suprime a hiperglicemia e a redução do peso corporal no estágio adulto. Uma vez que um aumento no peso do pâncreas e uma

10 tendência em suprimir uma redução dos teores de insulina no pâncreas são também mostrados, foi sugerido que, como mostrado no exemplo 1 para grelina de rato, as células β pancreáticas destruídas pela administração de STZ imediatamente após o nascimento foram regeneradas pela

15 administração de grelina humana e a produção de insulina foi parcialmente mantida, o que pode ter contribuído para a supressão da hiperglicemia.

Exemplo 4

20 Uma vez que a grelina é considerada como expressando suas funções fisiológicas via GHS-R, compostos agonistas de GHS-R outros que não a grelina (hormônio de crescimento secretagogo, doravante chamado de compostos GHS) podem também promover a regeneração de células β e suprimir o

25 desenvolvimento de hiperglicemia ou diabetes como a grelina. Por esta razão, a seguir, uma função de um composto GHS foi examinada utilizando-se um modelo STZ neonatal. Embora vários peptídeos e compostos não peptídeo tenham sejam conhecidos como compostos GHS, um peptídeo GHS

30 GHRP-2 (Ala-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, Drugs of the

Future 30, pp 124-127, 2005, CAS No. 158861-67-7) foi utilizado para o exame neste exemplo.

1. Material e Método

5 Os materiais experimentais, métodos experimentais e métodos de avaliação foram semelhantes aos do exemplo 2. Como substância de teste, 100 µg/kg de GHRP-2 foram administrados por via subcutânea duas vezes ao dia a partir do 2º dia depois do nascimento durante 7 dias (um grupo

10 STZ-GHRP-2).

2. Resultado

Foram examinados os efeitos da administração precoce de GHRP-2 após o nascimento sobre as concentrações de

15 glicose e insulina no plasma na 8ª semana (após 4 horas de jejum). Os resultados são mostrados na Tabela 6. As concentrações de glicose no plasma foram significativamente aumentadas no grupo STZ-veículo quando em comparação com o grupo de controle, enquanto que no grupo STZ-GHRP-2 o

20 aumento foi brando e os níveis foram significativamente mais baixos que os do grupo STZ-veículo. As concentrações de insulina no plasma, por outro lado, não foram significativamente diferentes entre os grupos.

25 (Tabela 5)

	Controle	STZ-veículo	STZ-GHRP-2
Glicose no Plasma (mg/dl)	116,0 ± 1,7 (8)	281,6 ± 18,5 (12) ^{*1}	145,5 ± 4,1 (12) ^{#1}
Insulina no Plasma (ng/ml)	2,44 ± 0,12 (8)	2,16 ± 0,10 (12)	1,89 ± 0,07 (12)

Cada valor é a média \pm EP (número de ratos)

*1: $P < 0,05$; em comparação com o grupo de controle,
#1: $P < 0,05$; em comparação com o grupo STZ-veículo, (teste de comparação múltipla de Dunnett).

5

Foram então analisados os pesos corporais, pesos dos pâncreas, e teores de insulina nos pâncreas na 9ª semana. Os resultados dos pesos corporais e pesos dos pâncreas são mostrados na Fig. 8. Embora os pesos corporais no grupo STZ-veículo tenham sido significativamente menores que os do grupo de controle, a redução dos pesos corporais no grupo STZ-GHRP-2 foi suprimida e os pesos corporais não foram significativamente diferentes dos do grupo de controle. O grupo STZ-veículo mostrou uma tendência na direção de uma redução nos pesos dos pâncreas quando em comparação com o grupo de controle. No grupo STZ-GHRP-2, por outro lado, os pesos dos pâncreas foram maiores que os do grupo STZ-veículo.

Foram comparados os teores de insulina nos pâncreas. Os pâncreas foram divididos de maneira a se obter duas amostras, amostras do lado do baço e amostras do lado dos intestinos, e os teores de insulina no pâncreas foram calculados a partir do teor de insulina de cada amostra e analisado, os resultados são mostrados na Tabela 6. No grupo STZ-veículo, os teores de insulina no pâncreas em cada um dos dois locais foram significativamente reduzidos quando em comparação com o grupo de controle. Os teores de insulina do grupo STZ-GHRP foram também significativamente mais baixos que os do grupo de controle, no entanto os teores foram maiores que os do grupo STZ-veículo, o que

mostrou uma tendência a manter a capacidade de produção de insulina.

(Tabela 6)

	Controle	STZ-veículo	STZ-GHRP-2
Teor de Insulina (Lado do Baço) ($\mu\text{g}/\text{p\~{a}ncreas}$)	454,5 \pm 31,6 (8)	96,3 \pm 7,6 (12) ^{*1}	146,8 \pm 10,9 (12) ^{*1}
Teor de Insulina (Lado dos Intestinos) ($\mu\text{g}/\text{p\~{a}ncreas}$)	309,9 \pm 25,8 (7)	62,1 \pm 5,6 (12) ^{*1}	81,7 \pm 4,6 (12) ^{*1}

5 Cada valor é a média \pm EP (número de casos)

*1: $P < 0,05$; em comparação com o grupo de controle (teste de comparação múltipla de Dunnett).

10 Conforme descrito acima, em adição à grelina de rato e grelina humana, mostrou-se que GHRP-2 apresentando ligação a GHS-R e capacidade de ativação também tende a aumentar a capacidade de produção de insulina por administração precoce no modelo STZ neonatal e suprimir o desenvolvimento de hiperglicemia no estágio adulto. Desta
15 forma, foi sugerido que os efeitos de grelina sobre a regeneração de células β e sobre a supressão de hiperglicemia são mediados por GHS-R, e que um composto apresentando ligação a GHS-R e capacidade de ativação (GHS) também apresenta efeitos similares.

20 Conforme descrito acima, foi demonstrado que no modelo STZ neonatal grelina de rato, grelina humana e um

composto GHS melhoraram a hiperglicemia no estágio adulto. A seguir, foi examinado o efeito de grelina humana utilizando-se um ouro modelo de hiperglicemia.

5 Exemplo 5

Sabe-se que uma dieta de alto teor de gordura ao estilo ocidental é uma causa de desenvolvimento de diabetes. Adicionalmente, um ácido graxo tal como ácido linoléico é o ligante de GRP40, um dos receptores acoplados a proteína G, e foi reportado que a ativação de GRP40 por um ácido graxo promove a secreção de insulina em resposta a glicose por células β pancreáticas (Itoh Y. *et al.* Nature 422, pp 173-176, 2003). Por outro lado, foi sugerido que embora uma carga de curto prazo de um ácido graxo promova a secreção de insulina, uma exposição de longo prazo reduz a capacidade de secreção de insulina e os teores de insulina no pâncreas (Steneberg P. *et al.* Cell Metab 1, pp 245-258, 2005). Desta forma, camundongos foram mantidos com alimentos com alto teor de ácidos graxos contendo ácido linoléico de maneira a se examinar os efeitos da grelina humana sobre a secreção de insulina e concentração de glicose no sangue.

1. Material e Método

25 Camundongos machos Crj:CD1(ICR) (Charles River, Japão) foram deixados com livre acesso a água e a uma dieta de pélite padrão para camundongo (CRF-1, Oriental Yeast Co., Ltd.) (com iluminação das 21 às 9 horas). Camundongos de controle normais foram mantidos neste condição (dieta 30 normal, e grupo ND). Um grupo com dieta de alto teor de

ácidos graxos (High Fat Diet - Dieta de Alta Gordura, um grupo HFD) foi deixado consumir livremente uma mistura de 5 g de CFR-1 (pó) com 1 g de ácido linoléico como dieta de alto teor de ácidos graxos a partir da 4ª semana após o nascimento. Como substâncias de teste, um veículo (solução 5% de manitol) (grupo HFD-veículo) ou 300 µg/kg de grelina humana (grupo HFD-grelina), foram administrados duas vezes ao dia (uma vez ao dia nos fins de semana) por cerca de 7 semanas a partir do dia do início da carga de dieta de alto teor em ácidos graxos. Foram monitoradas as alterações nos pesos corporais e níveis de açúcar no sangue *ab lib* após o início da administração da substância de teste. Adicionalmente, os camundongos foram jejuados no 5º dia do início da administração da substância de teste, e então carregado intensamente ácido linoléico (1 ml/kg, administração intraperitoneal) no dia seguinte à determinação das concentrações de glicose no plasma e de insulina no plasma 1 hora mais tarde. O valor de açúcar no sangue foi determinado utilizando-se Antsense II (Horiba, Ltd.), enquanto que a concentração de glicose no plasma e a concentração de insulina foram determinadas utilizando-se um Glucose CII-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e um kit de insulina Lebis (TMB para camundongo) (Shibayagi Co. Ltd.), respectivamente.

25

2. Resultado

Foram examinados os efeitos da administração de grelina humana sobre os pesos corporais e níveis de açúcar no sangue em camundongos alimentados com uma dieta de alto teor de ácidos graxos. A Fig. 9 mostra os pesos corporais

30

no 42° dia de administração e os níveis de açúcar no sangue *ad lib* no 43° dia de administração. Os pesos corporais dos camundongos foram maiores no grupo de HFD-veículo quando em comparação com o grupo ND e foram ainda maiores no grupo de HFD-grelina. Adicionalmente, os níveis de açúcar no sangue do grupo HFD-veículo foram significativamente maiores que os do grupo ND. Por outro lado, os níveis de açúcar no sangue no grupo HFD-grelina tenderam a se reduzir quando em comparação com o grupo HFD-veículo, e não foram significativamente diferentes dos do grupo ND. Desta forma, mostrou-se que a administração de grelina reduz a indução de hiperglicemia provocada por uma dieta rica em ácidos graxos.

A seguir, foram analisadas as alterações das concentrações de insulina no plasma e das concentrações de glicose no plasma após uma carga intensa de ácido linoléico em camundongos alimentados com uma dieta de alto teor de ácidos graxos.

A Fig. 10 mostra as concentrações de insulina no plasma (A) e as concentrações de glicose no plasma (B) em camundongos alimentados com dietas normais ou dietas de alto teor de ácidos graxos e submetidos a administração intraperitoneal de 1 ml/kg de ácido linoléico. No grupo HFD-veículo, as concentrações de insulina no plasma após uma carga de ácido linoléico foram reduzidas no máximo em 1/3 da média quando em comparação com o grupo ND, sugerindo que a capacidade de secreção de insulina foi conturbada por uma dieta de longo prazo de ácido graxo. As concentrações de insulina no grupo HFD-grelina foram mais altas que as do grupo HFD-veículo, e não foram significativamente

diferentes das do grupo ND (Fig, 10A). Por outro lado, embora quase não tenha havido qualquer diferença entre os 3 grupos nas concentrações de glicose no plasma antes da carga com ácido linoléico (grupo ND: 138 ± 5 , grupo HFD-veículo: 146 ± 12 , grupo HFD-grelina: 141 ± 5 mg/dl, média de 8 camundongos \pm erro padrão para cada grupo), as concentrações de glicose no plasma foram significativamente aumentadas em todos os grupos 1 hora após a administração de ácido linoléico quando em comparação com as de antes da administração ($P < 0,05$, teste t pareado). O aumento das concentrações de glicose no plasma depois da administração de ácido linoléico foi mais significativo no grupo HFD-veículo quando em comparação com o grupo ND.

As concentrações de glicose no plasma após a carga de ácido linoléico no grupo HFD-grelina tenderam a serem baixas em comparação com o grupo HFD-veículo, e não foram significativamente diferentes das do grupo ND (Fig. 10B).

Conforme descrito acima, mostrou-se que a administração repetida de grelina humana suprime um aumento nos níveis de açúcar no sangue em camundongos com dieta de alto teor de ácidos graxos. Com a alimentação com dieta de alto teor de ácidos graxos, foi observada a redução da secreção de insulina induzida por ácido linoléico, que tendeu a ser melhor no grupo que recebeu grelina humana. Desta forma, foi sugerido que a grelina humana melhorou o mal funcionamento das células β , isto é, a insuficiência da secreção de insulina devida às dietas de alto teor de ácidos graxos, e, por isso, suprimiu o desenvolvimento de hiperglicemia.

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

Um fármaco da presente invenção tem uma função na promoção de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas produtoras e secretoras de insulina e uma

5 função na promoção da produção de insulina em células β pancreáticas, e, desta forma, pode suprimir ou tratar hiperglicemia pela promoção de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas produtoras e secretoras de insulina em hiperglicemia causada por falta de secreção de insulina

10 ou secreção muito baixa de insulina devida à debilitação ou morte de células β pancreáticas, ou em hiperglicemia causada por secreção reduzida de insulina em células β pancreáticas. Além disto, o fármaco pode ser também utilizado como fármaco para terapia de regeneração de

15 células β pancreáticas apresentando uma função de produção de insulina. Uma vez que a neogênese ou regeneração de células β pancreáticas produtoras e secretoras de insulina é possibilitada de acordo com a presente invenção, é uma vantagem que uma causa fundamental da hiperglicemia, isto

20 é, deficiência das células β pancreáticas e insuficiência na produção ou secreção de insulina nas células possa ser melhorada.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um composto peptídeo ou um sal farmacologicamente aceitável deste, apresentando uma atividade de aumento da concentração de íon cálcio intracelular por ligação ao receptor de secretagogo de hormônio de crescimento, em que o peptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

(1) um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos como descrita em qualquer uma das SEQ ID Nos. 1 a 21, em que o terceiro resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado tendo um ácido graxo introduzido a uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido;

(2) um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos como descrita na SEQ ID No. 1 em que o terceiro resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado, tendo um ácido graxo introduzido a uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido, e

(3) GHRP-2,

o uso **caracterizado** por ser na produção de uma composição farmacêutica para a supressão ou tratamento de hiperglicemia, pela promoção de neogênese ou regeneração de células β pancreáticas, em que a promoção de neogênese é a promoção de neogênese de insulina e a regeneração de células beta pancreáticas é na diabetes.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela hiperglicemia ser causada por secreção muito baixa ou nenhuma secreção de insulina devido à debilitação ou morte de células β pancreáticas, ou causada

por secreção reduzida de insulina em células β pancreáticas.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pela hiperglicemia ser causada por secreção muito baixa ou
5 nenhuma secreção de insulina devido à debilitação ou morte de células β pancreáticas.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pela hiperglicemia ser causada por secreção reduzida de insulina em células β pancreáticas.

10 5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pela hiperglicemia apresentar um valor Δ IRI/ Δ BG não maior que 0,4.

6. Uso de um composto peptídeo ou de um sal farmacologicamente aceitável deste, apresentando uma
15 atividade de aumento da concentração do íon cálcio intracelular por ligação ao receptor de secretagogo de hormônio de crescimento, em que o peptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

(1) um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos
20 como descrita em qualquer uma das SEQ ID Nos. 1 a 21, em que o terceiro resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado tendo um ácido graxo introduzido a uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido;

25 (2) um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos como descrita na SEQ ID No. 1 em que o terceiro resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado, tendo um ácido graxo introduzido a uma cadeia lateral do resíduo de
30 aminoácido; e

(3) GHRP-2,

o uso **caracterizado** por ser para a produção de uma composição farmacêutica para promover a neogênese ou regeneração de células β pancreáticas, em que a promoção de
5 neogênese é a promoção de neogênese de insulina e a regeneração de células beta pancreáticas é na diabetes.

7. Uso de um composto peptídeo ou de um sal farmacologicamente aceitável deste, apresentando uma atividade de aumento da concentração do íon cálcio
10 intracelular por ligação ao receptor de secretagogo de hormônio de crescimento, em que o peptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

(1) um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos como descrita em qualquer uma das SEQ ID Nos. 1 a 21,
15 em que o terceiro resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado tendo um ácido graxo introduzido a uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido;

(2) um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos como descrita na SEQ ID No. 1 em que o terceiro
20 resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado, tendo um ácido graxo introduzido a uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido; e

25 (3) GHRP-2,

o uso **caracterizado** por ser para a produção de uma composição farmacêutica para promover a produção de insulina em células β pancreáticas ao promover a neogênese ou a regeneração de células β pancreáticas, em que a

promoção de neogênese é a promoção de neogênese de insulina e a regeneração de células beta pancreáticas é na diabetes.

8. Uso de um composto peptídeo ou de um sal farmacologicamente aceitável deste apresentando uma
5 atividade de aumento da concentração do íon cálcio intracelular por ligação a receptor de hormônio de crescimento secretagogo, em que o peptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

(1) um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos
10 como descrita em qualquer uma das SEQ ID Nos. 1 a 21, em que o terceiro resíduo de aminoácido de um terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado tendo um ácido graxo introduzido a uma cadeia lateral do resíduo de aminoácido;

(2) um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos
15 como descrita na SEQ ID No. 1 em que o terceiro resíduo de aminoácido do terminal amino é um resíduo de aminoácido modificado, tendo um ácido graxo introduzido a uma cadeia lateral do resíduo de
20 aminoácido; e

(3) GHRP-2,

o uso **caracterizado** por ser para a produção de uma composição farmacêutica para a supressão da debilidade, morte ou desgaste de células β pancreáticas.

25 9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo peptídeo apresentar uma sequência de aminoácidos descrita como SEQ ID No. 1 e um resíduo de serina na terceira posição de um terminal amino ser um resíduo de aminoácido modificado tendo um ácido graxo

introduzido a um grupo hidroxila de uma cadeia lateral do resíduo.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato do peptídeo apresentar uma
5 seqüência de aminoácidos descrita como SEQ ID No. 1 e um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de um resíduo de serina na terceira posição de um terminal amino ser acilado por um grupo n-octanoila.

DESENHOS

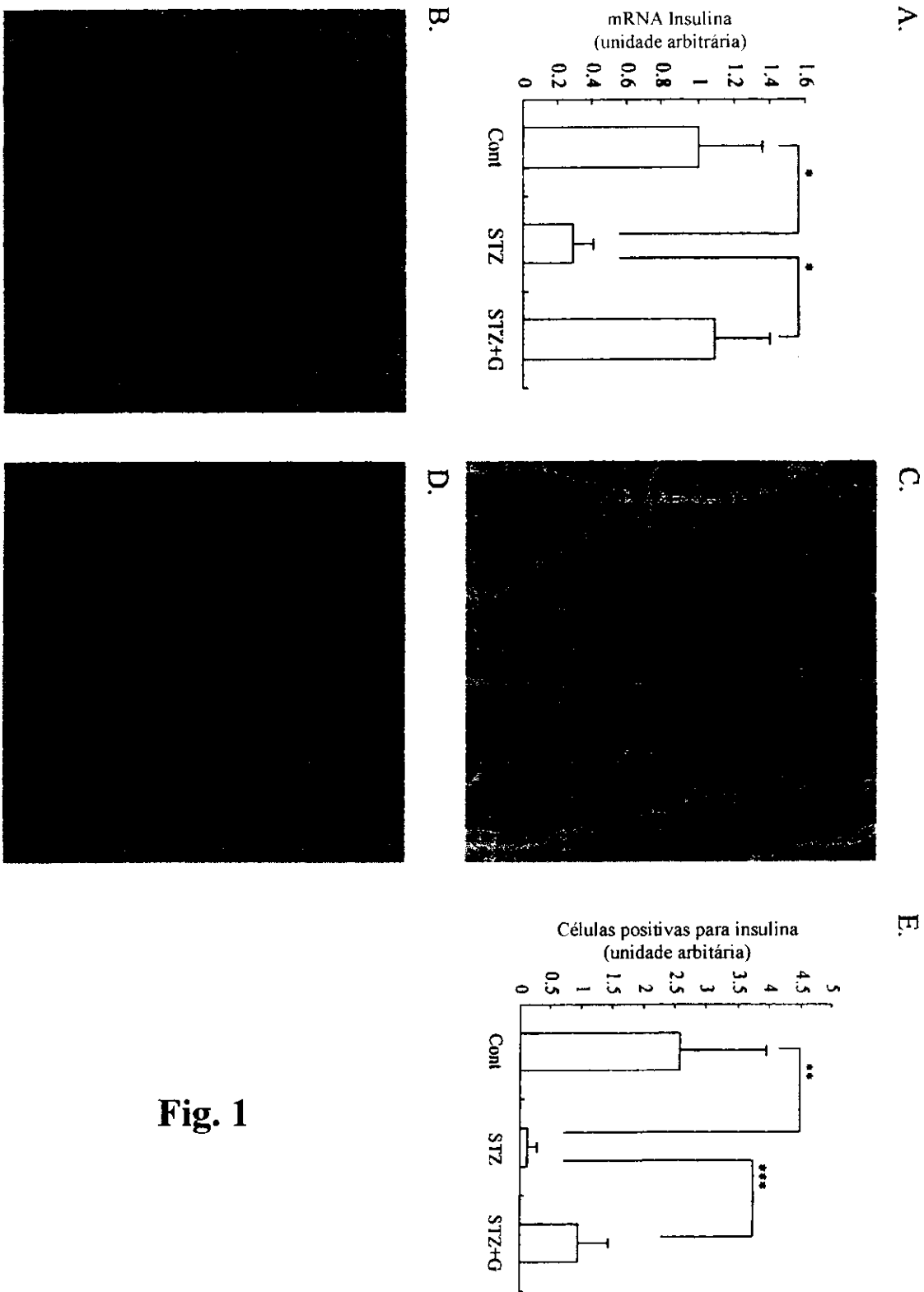


Fig. 1

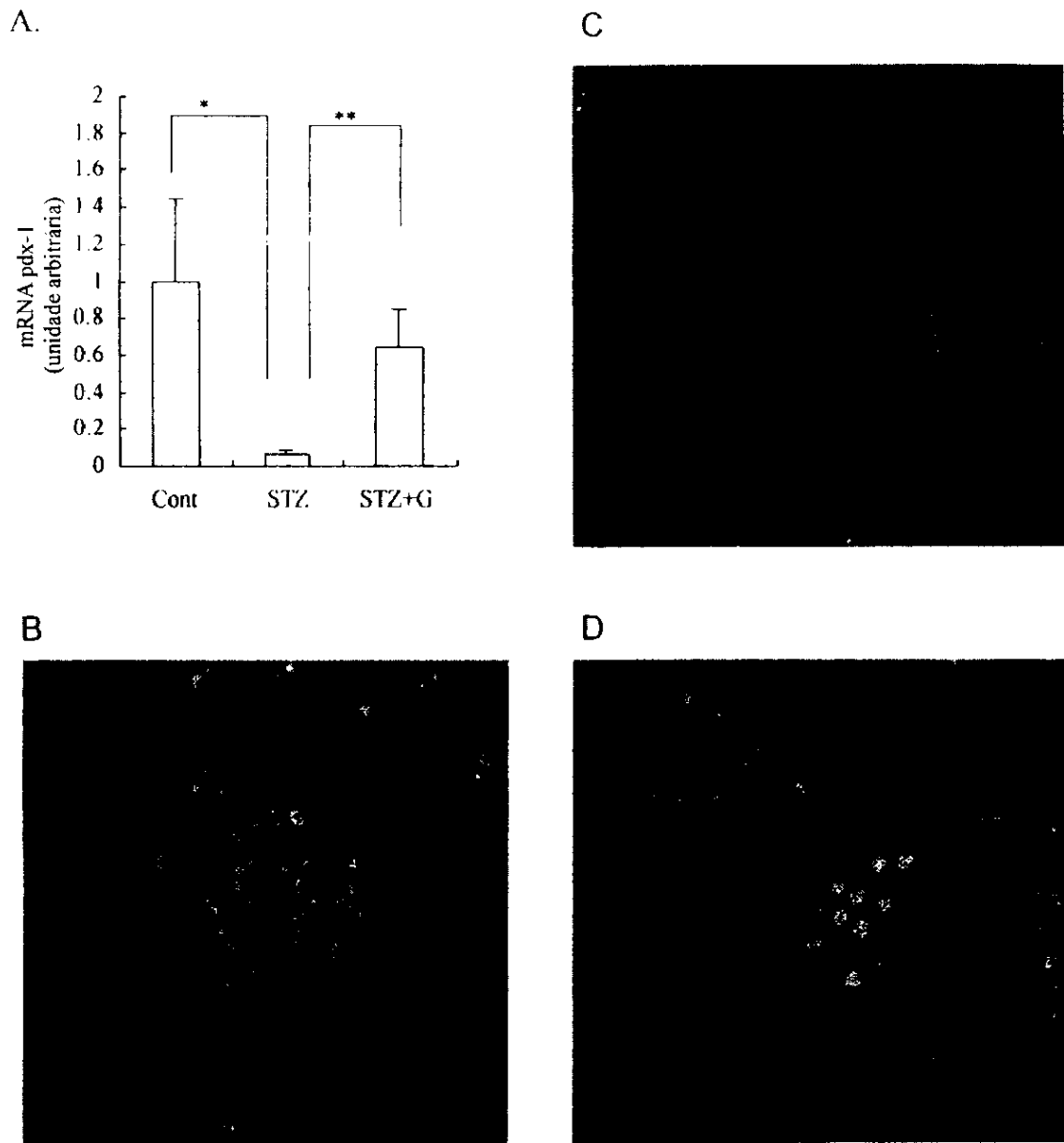


Fig. 2

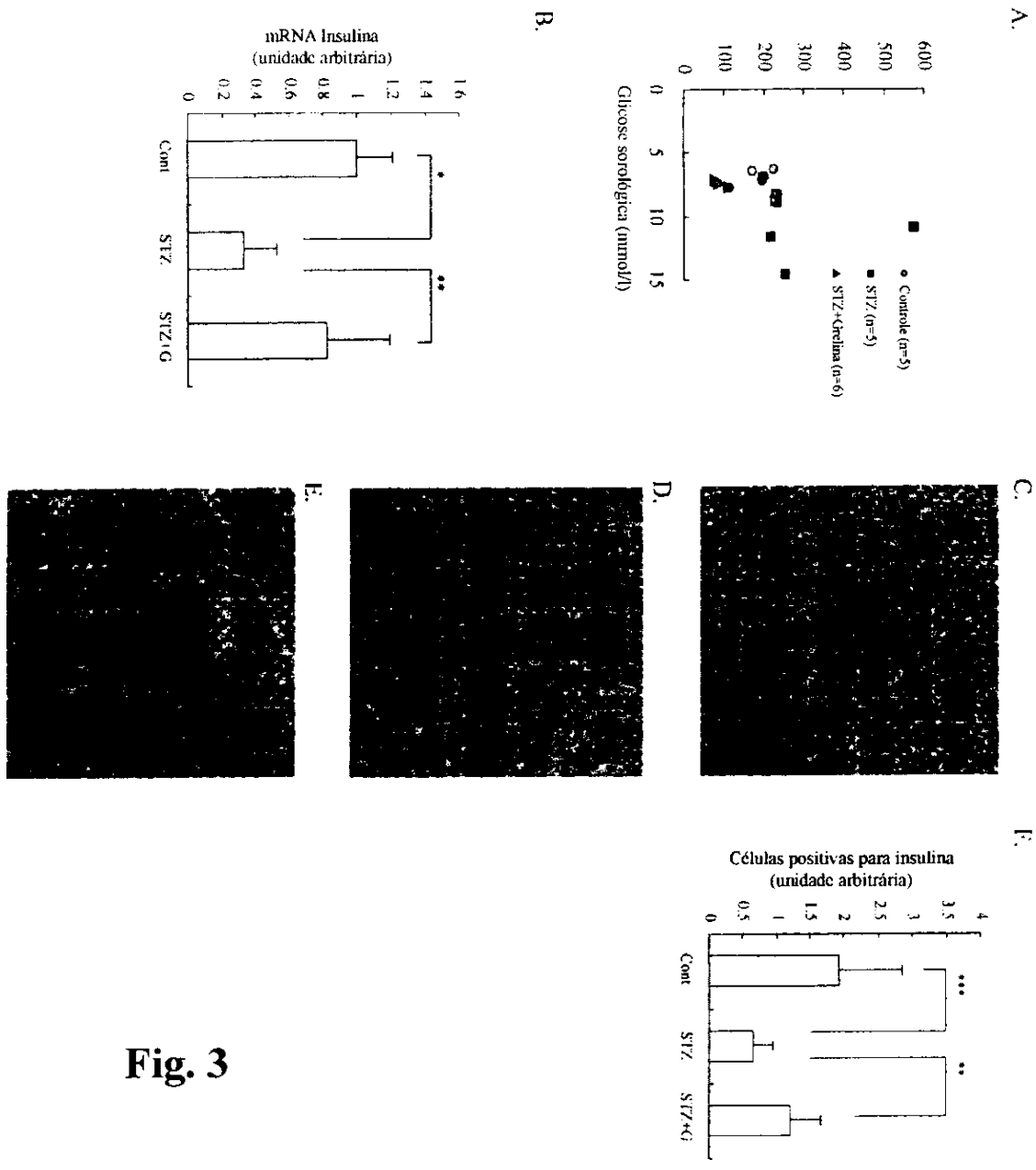
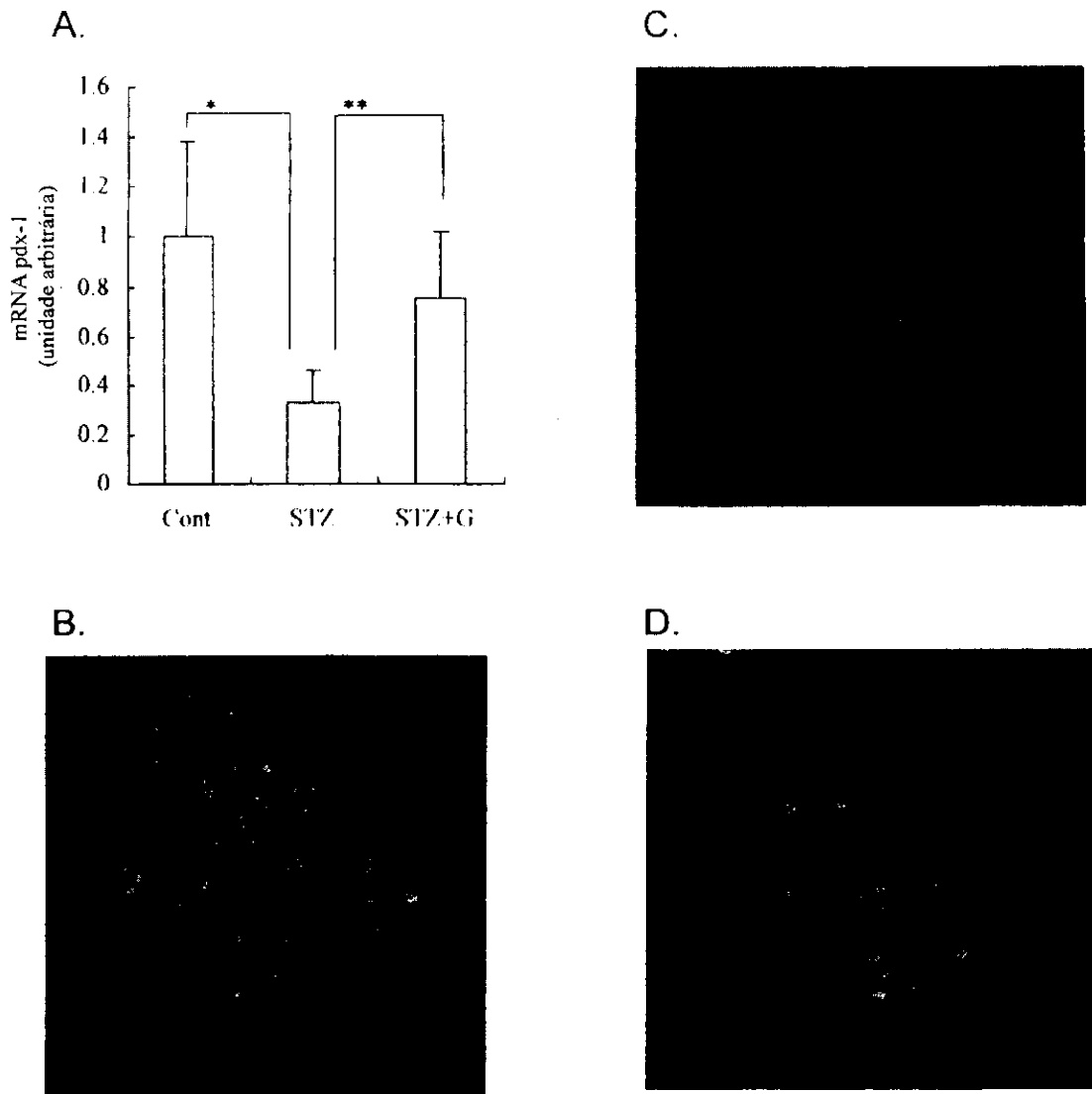
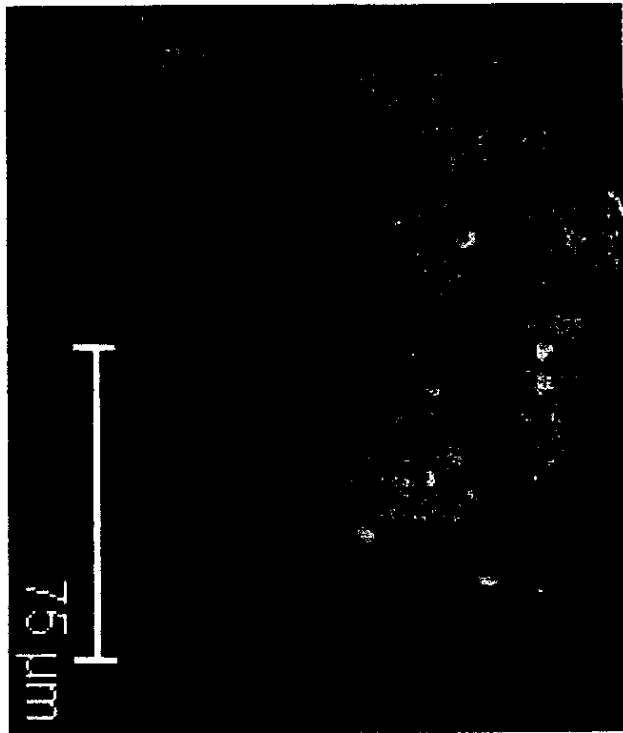


Fig. 3

**Fig. 4**

A



B

Marcação com phospho-histone H3
índice de células β (%)

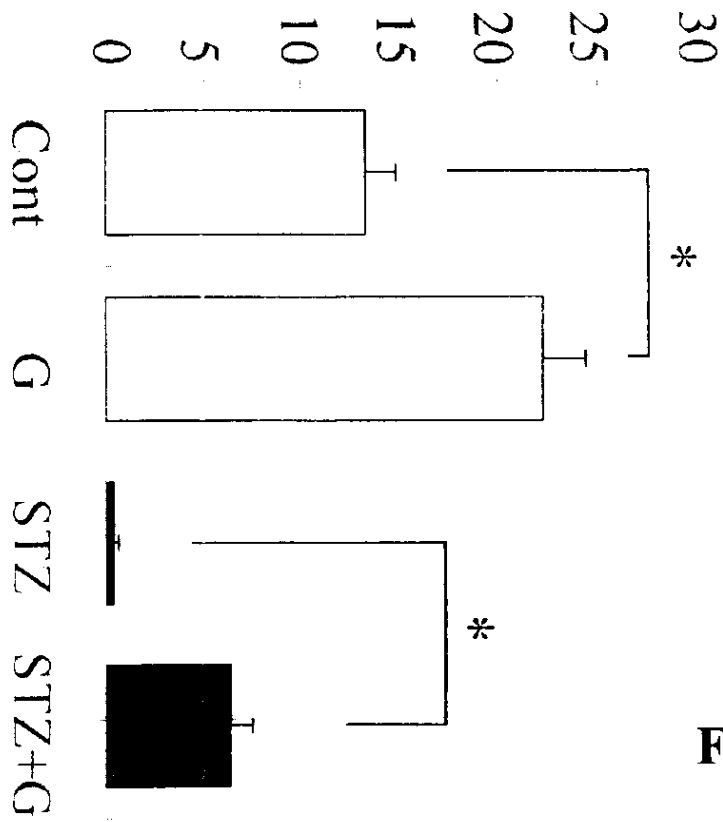


Fig. 5

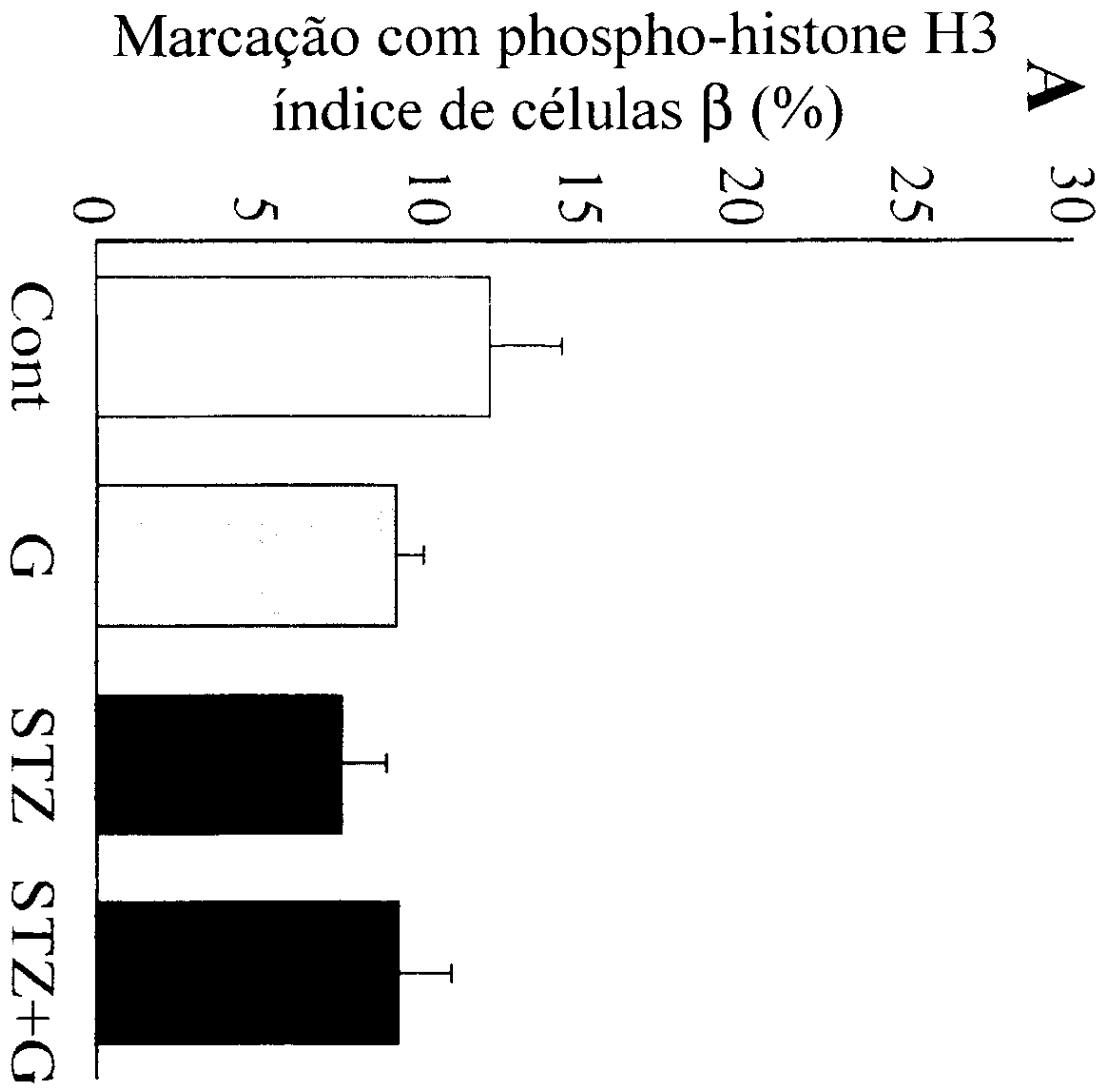


Fig. 6

Fig. 7

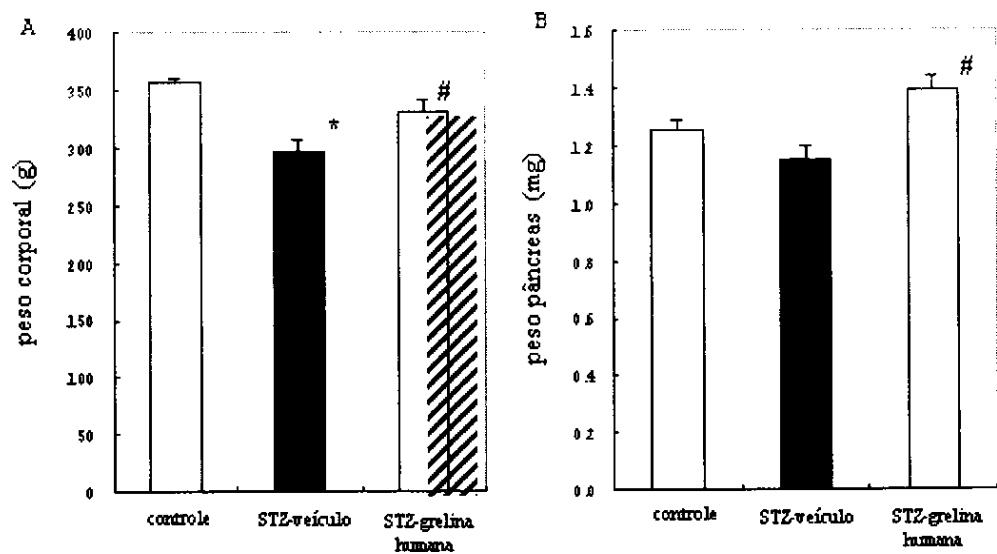


Fig. 8

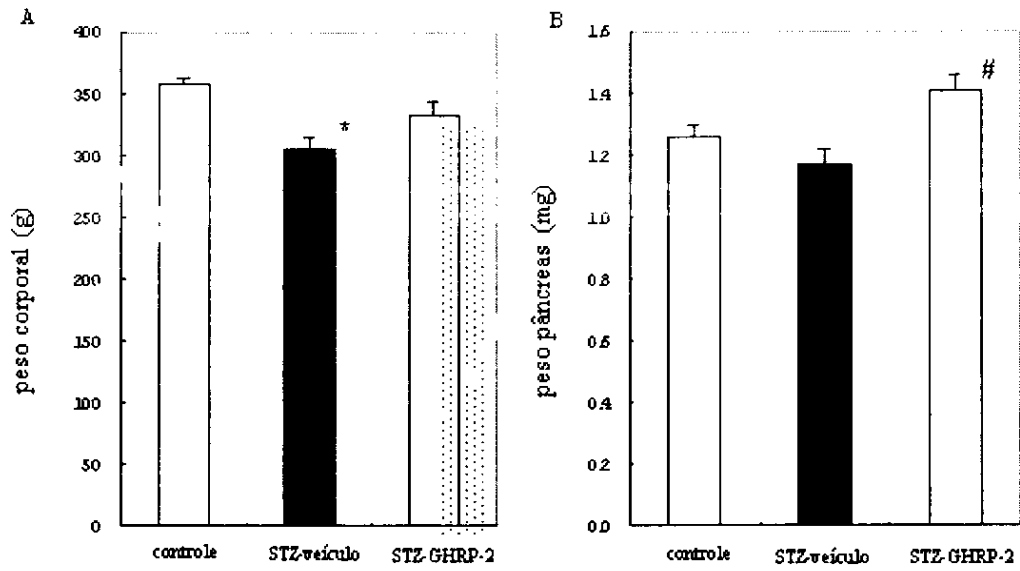


Fig. 9

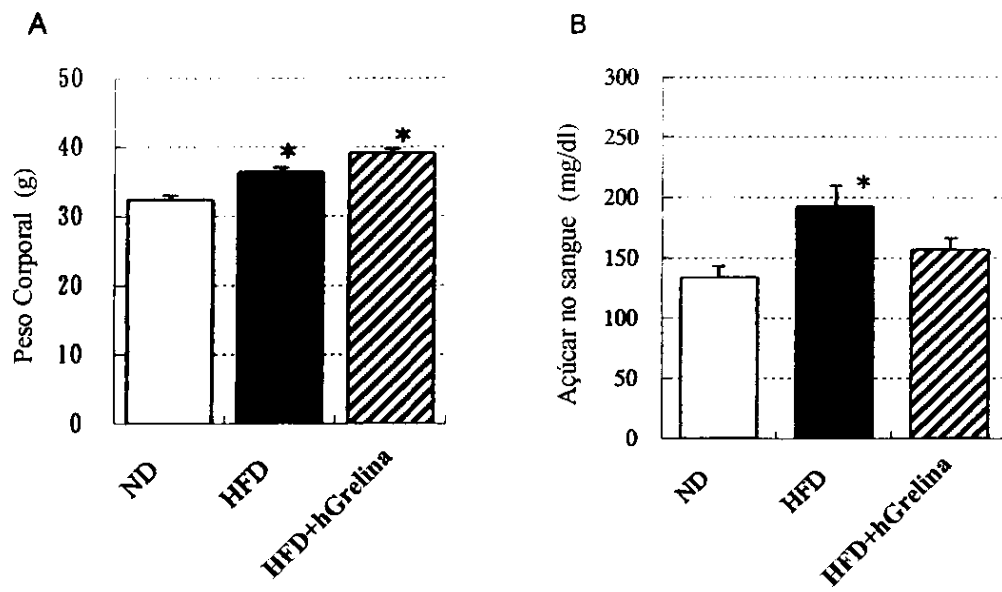


Fig 10

