

(11) Número de Publicação: **PT 1795598 E**

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2007.10) **C07K 14/47** (2007.10)
C07K 14/46 (2007.10) **C07K 14/465** (2007.10)
C07K 14/575 (2007.10) **C07K 16/18** (2007.10)
C12N 1/21 (2007.10) **C12P 21/02** (2007.10)
A61K 38/18 (2007.10) **A61P 5/06** (2007.10)
A61P 19/08 (2007.10) **A61K 45/00** (2007.10)
A61K 48/00 (2007.10)

(22) Data de pedido: **2000.07.24**

(30) Prioridade(s): **1999.07.23 JP 21000299**
1999.11.29 JP 33884199
2000.04.26 JP 2000126623

(43) Data de publicação do pedido: **2007.06.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.11.18**
002/2010

(73) Titular(es):

KENJI KANGAWA
4-2, ONOHARAHIGASHI 6-CHOME MINOO-SHI
OSAKA 562-0031 JP

(72) Inventor(es):

KENJI KANGAWA JP
MASAYASU KOJIMA JP
HIROSHI HOSODA JP
HISAYUKI MATSUO JP
YOSHIHARU MINAMITAKE JP

(74) Mandatário:

ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO
RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **NOVOS PÉPTIDOS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"NOVOS PÉPTIDOS"

Campo Técnico

A presente invenção refere-se à utilização de um novo péptido tendo a acção de aumentar a concentração intracelular de cálcio como definido nas reivindicações.

Técnica Anterior

A hormona do crescimento (depois, aqui abreviada como GH) é uma hormona peptídica sintetizada na adeno-hipófise e, indirectamente, promove o crescimento ósseo e a diferenciação de adipócitos e condrócitos e a sua secreção é promovida pela hormona de libertação da hormona do crescimento (GHRH) e inibida pela somatostatina [J. Kendrew, et al., Eds., *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Blackwell Science Ltd., Londres, 1994), p. 462]. A GH não tem apenas uma acção promotora do crescimento mas também acções, tais como a promoção da síntese proteica em vários tecidos, o estímulo da transferência de gorduras armazenadas e o aumento do conteúdo em glicogénio dos músculos e uma redução da secreção da GH induz nanismo, enquanto que a sua secreção excessiva induz gigantismo ou acromegalia [*Iwanami's Dictionary of Biology*, quarta edição, editada por Ryuichi Yasugi, et al. (Iwanami Syoten, Tóquio, 1997), p. 757].

Desde que a GH humana tem sido produzida por engenharia genética, a GH é utilizada não apenas no tratamento do nanismo [J. O. Jorgensen, *Endocr. Rev.* **12**, 189 (1991)], mas também no tratamento de outras doenças e foram determinados os seus vários efeitos [J. O. Jorgensen, et al., *Horm. Res.* **42**, 235 (1994)]. Esses efeitos incluem, por exemplo, a activação da reconstituição de osteoblastos e osso nos normais [K. Brixen, et al., *Miner. Res.* **5**, 609 (1990)], aumento da força muscular e quantidade muscular em adultos deficientes em GH [R. C. Cuneo, et al., *J. Appl. Physiol.* **70**, 688 (1991)], melhoria da motilidade em adultos deficientes em GH [R. C. Cuneo, et al., *J. Appl. Physiol.* **70**, 695 (1991)], tratamento de queimaduras graves em crianças [D. N. Herndon, et al., *Ann. Surg.* **212**, 424 (1990)], a sua utilização combinada com gonadotrofinas na indução da ovulação [R. Homburg, et al., *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **32**, 781 (1990)], prevenção dos distúrbios metabólicos por administração de prednisona [F. F. Horber e M. W. Haymond, *J. Clin. Invest.* **86**, 265 (1990)], promoção da "educação" das células T em distúrbios imunitários graves [W. J. Murphy, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4481 (1992)] e o efeito de inibição da redução do peso corporal dos idosos e o efeito de aumento de tecidos gordos adiposos e prevenção da atrofia dérmica [D. Rudman et al., *N. Engl. J. Med.* **323**, 1 (1990)].

A administração de GH recombinante é eficaz na promoção do crescimento em crianças e na normalização de defeitos no metabolismo e em funções que acompanham adultos deficientes em GH, mas verificam-se problemas, pois a GH tem efeitos secundários restrictivos da dose, não pode ser administrada oralmente e é dispendiosa [B. A. Lefker, et al., em *Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice*, B. B. Bercu e R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1998), pp.

107-108]. Muitos doentes adultos sofrem de efeitos secundários, tais como artralgia e uma síndrome do túnel cárпico, considerada como sendo atribuível a uma acumulação de excesso de sódio e de humor, de forma a que a administração da GH não possa ser continuada [E. Corpas, et al., *Endocr. Rev.* **14**, 20 (1993)]. Estes efeitos secundários estão correlacionados com um padrão não-fisiológico de secreção hormonal pela administração de GH e na administração de GH, não podendo a pulsatibilidade da secreção normal da GH ser imitada [B. A. Lefker, et al., em *Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice*, B. B. Bercu e R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1998), pp. 107-108].

A pulsatibilidade da secreção da GH *in vivo* é estabelecida, basicamente, pela interacção entre dois factores de regulação derivados do hipotálamo; ou seja, a GHRH e a somatostatina actuam na glândula pituitária de forma a regular a secreção da GH [G. S. Tannenbaum e N. Ling, *Endocrinology* **115**, 1952 (1984), R. G. Clark e I. C. Robinson, *Endocrinology* **122**, 2675 (1988)]. O padrão normal de secreção da GH difere durante o dia e a noite e, durante a noite, é libertada mais frequentemente uma maior quantidade de GH. A amplitude do pulso de libertação da GH é, adicionalmente, regulada por retroalimentação através de várias hormonas esteróides, neurotransmissores, GH e factor de crescimento semelhante à insulina, pelo estado nutritivo, sono e motilidade [J. S. Strobl e M. J. Thomas, *Pharmacol. Rev.* **46**, 1 (1994)].

Para superar os efeitos secundários causados pela administração de GH, foi sintetizado um grande número de compostos tendo uma acção de indução da secreção da GH e, como o secretagogo da hormona do crescimento (GHS), a correlação da sua

actividade estrutural, a sua farmacologia e aplicações clínicas foram amplamente estudadas. Em primeiro lugar, foram sintetizados e desenvolvidos péptidos, tal como o GHRP-6 (Hexapéptido de Libertação da Hormona do Crescimento), como agentes terapêuticos para o tratamento de distúrbios atribuíveis a deficiência ou redução da GH [C. Y. Bowers, et al., *Endocrinology* **114**, 1537-1545 (1984)]. No entanto, dado que estes compostos peptídicos podem, apenas, demonstrar o seu efeito através da injecção intravenosa, foram desenvolvidos compostos não-peptídicos tendo baixo peso molecular, com capacidade de administração oral [R. G. Smith, et al., *Science* **260**, 1640-1643 (1993)] e alguns destes avançaram para um ensaio clínico de fase II [A. A. Patchett, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7001-7005 (1995)].

Uma série de transferências de informação, desde a recepção de sinal pelo receptor até à expressão funcional é designada transdução de sinal e o sistema de transdução de sinal ligado à proteína G decorre com o mecanismo seguinte [*Iwanami's Dictionary of Biology*, quarta edição, ed. por Ryuichi Yasugi, et al., pp. 555-556 (Iwanami Syoten, Tóquio, 1997)]. Este sistema ligado à proteína G tem um receptor com sete domínios transmembranares e é dividido num sistema de AMPc para a produção do AMPc como um segundo mensageiro e no sistema de transdução do ácido inositol-1,4,5-trifosfórico (IP3) e do diacilglicerol (DG), para informação sobre o fosfolípido de inositol. O AMPc activa a cinase dependente de AMPc (cinase A), de forma causar a fosforilação dos resíduos de serina e treonina na proteína funcional, para modificar a sua actividade. Por outro lado, o IP3 liga-se ao receptor do IP3 no retículo endoplasmático, para a promoção da libertação de iões de cálcio,

enquanto que o DG activa a cinase C para a promoção da acção de hormonas, etc.

O mecanismo de aumento da concentração intracelular de iões de cálcio no sistema de transdução de sinal com IP3 ou DG como segundo mensageiro [J. Kendrew, et al., Eds., *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Blackwell Science Ltd., Londres, 1994), p. 136-137] é como se segue: Quando um ligando se liga ao receptor, a fosfolipase C é activada através da proteína G, para converter PIP2 em IP3. Através do IP3, os iões de cálcio acumulados no retículo endoplasmático (ER), sob a forma de grânulos intracelulares são libertados no citoplasma, aumentando, deste modo, os níveis de iões de cálcio no citoplasma. Se estiverem presentes IP3 ou iões de cálcio no citoplasma, o cálcio é novamente incorporado no retículo endoplasmático, baixando deste modo os níveis de iões de cálcio no citoplasma. Ou seja, a ligação do ligando ao receptor causa um aumento transiente nos níveis dos iões de cálcio no citoplasma.

Uma vez que o GHS actua sinergicamente sobre a secreção da GH e no aumento dos níveis intracelulares de AMPc pela GHRH [K. Cheng, et al., *Endocrinology* **124**, 2791-2798 (1989)] e que a ligação da GHRH ao receptor induz a produção de AMPc como segundo mensageiro, enquanto que o GHS induz um aumento na concentração intracelular de iões de cálcio, foi sugerido que o mecanismo de funcionamento do GHS seja diferente do da GHRH [J. Herrington e B. Hille, *Endocrinology* **135**, 1100-1108 (1994)] e era suposto que o GHS se ligasse a um receptor diferente do receptor da GHRH. De facto, foi clonado um gene de um receptor ao qual o GHS se liga e, a partir do resultado da análise de Northern, foi verificado que o receptor do GHS (GHS-R) é expresso no hipotálamo e na glândula pituitária cerebral e que

se verifica uma homologia de 90% ou superior entre as sequências de aminoácidos de receptores do GHS derivados de porco e de humano [A. D. Howard, et al., *Science* **273**, 974-977 (1996)]. No entanto, não foi isolado um ligando endógeno que se ligasse ao GHS-R e este GHS-R era um receptor órfão cujo ligando não era evidente.

Em alguns casos, os ácidos gordos, tais como ácido mirístico, ácido gerânico, ácido palmitoílico ou ácido farnesílico, encontram-se ligados ao terminal amina de uma determinada proteína ou às cadeias laterais dos seus resíduos de aminoácidos e o papel destes ácidos gordos é a ancoragem dessas proteínas modificadas com ácidos gordos à membrana celular [J. Kendrew, et al., Ed., *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Blackwell Science Ltd., Londres, 1994), p. 616]. Nessa proteína modificada com ácidos gordos, o ácido gordo liga-se a um resíduo de cisteína, através de uma ligação S-acilo e não são conhecidos aminoácidos tendo um ácido gordo ligado ao resíduo de serina através da ligação O-acilo, tal como o GHS endógeno divulgada na presente invenção nem proteínas ou péptidos contendo esse aminoácido modificado com um ácido gordo. Também não é conhecido que o péptido contendo esse aminoácido modificado com um ácido gordo funcione como um ligando para qualquer receptor.

Divulgação da Invenção

Antes da presente invenção ser descrita detalhadamente, os termos são definidos como se segue:

O termo "péptido" refere-se a um composto compreendendo vários aminoácidos aí ligados através de ligações peptídicas. Neste caso, o aminoácido (também designado como um resíduo de aminoácido) inclui aminoácidos de ocorrência natural representados pela fórmula: $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{R}')\text{-COOH}$, em que R' é um grupo substituinte de ocorrência natural, assim como os seus isómeros ópticos D, L, etc.

Existe, também, um péptido, em que determinado aminoácido de ocorrência natural é substituído por um aminoácido modificado (também designado como um resíduo de aminoácido modificado). O aminoácido modificado inclui os aminoácidos da fórmula acima, em que o grupo substituinte R' é, adicionalmente, modificado, o seus isómeros ópticos D, L e aminoácidos não naturais em que, e.g., vários grupos substituintes são ligados ao grupo substituinte R' da fórmula acima, através ou não de uma ligação éster, éter, tioéster, tioéter, amida, carbamida ou tiocarbamida. O aminoácido modificado inclui, também, aminoácidos não naturais, cujos grupos amina estão substituídos por grupos alquilo inferiores.

Os termos "análogo de péptido" referem-se a um composto em que, pelo menos, um aminoácido num péptido é substituído por um composto não-aminoácido e, deste modo, pelo menos, uma ligação entre o referido composto substituinte e o análogo de péptido não é uma ligação peptídica.

Além disso, os compostos derivados destes péptidos e análogos de péptidos, por modificação do seu terminal amina e/ou terminal carboxilo são designados como derivados. E os péptidos, análogos de péptidos e os seus derivados são designados, colectivamente, como "composto do tipo peptídico".

Na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2, uma sequência de aminoácidos do 1º ao 4º aminoácidos refere-se a Gly Ser Ser Phe,

uma sequência de aminoácidos do 1º ao 5º aminoácidos refere-se a Gly Ser Ser Phe Leu,

uma sequência de aminoácidos do 1º ao 6º aminoácidos refere-se a Gly Ser Ser Phe Leu Ser,

uma sequência de aminoácidos do 1º ao 7º aminoácidos refere-se a Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro,

uma sequência de aminoácidos do 1º ao 8º aminoácidos refere-se a Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu,

uma sequência de aminoácidos do 1º ao 9º aminoácidos refere-se a Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His, e

uma sequência de aminoácidos do 1º ao 10º aminoácidos refere-se a Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln.

Tem sido desejada a descoberta de um ligando endógeno (GHS endógeno), o qual se ligue ao receptor do GHS, que apresente uma actividade para aumentar a concentração intracelular de iões de cálcio ou para induzir a secreção da GH, em conjunto com um método de utilização da mesma. Além disso, tem sido desejado um composto, o qual seja um análogo estrutural do referido GHS endógeno e que tenha uma actividade para aumentar a concentração intracelular de iões de cálcio ou para induzir a secreção da GH. Além disso, tem sido pretendida uma composição farmacêutica ou uma composição para a promoção do

crescimento dos animais, a qual compreenda que o referido GHS endógeno ou o seu análogo estrutural, os quais induzam a secreção pulsátil da GH, eliminando, deste modo, os efeitos secundários da administração da GH, assim como uma aplicação terapêutica, utilizando a referida composição.

A presente requerente concentrou a sua atenção no facto da ligação do ligando ao receptor do GHS (GHS-R) causar um aumento transiente na concentração intracelular de iões de cálcio com o fosfolípido de inositol como segundo mensageiro e estes rastrearam extractos de vários órgãos e tecidos, pela utilização da actividade de aumento da concentração intracelular de iões de cálcio (actividade de libertação de Ca) como um indicador em células CHO (CHO-GHSR62) expressando GHS-R. Como um resultado, a requerente verificou que os extractos de estômago do rato têm uma actividade de libertação de Ca forte e purificaram, com sucesso, uma substância tendo uma actividade de libertação de Ca forte, a partir dos extractos acima, através de vários tipos de cromatografia e verificaram que a referida substância é um novo péptido modificado com um ácido gordo, tendo um peso molecular de cerca de 3000. Além disso, esta confirmou que o referido novo péptido promove a secreção específica de GH a partir de células da glândula pituitária anterior e determinaram que o referido novo péptido é um ligando endógeno para o GHS-R ou seja, um secretagogo da GH endógena (GHS endógeno). Ou seja, o primeiro aspecto da presente invenção é dirigido a um péptido indutor da secreção da GH endógena, tendo a actividade de aumento da concentração intracelular de iões de cálcio ou a actividade de indução da secreção da GH, em que determinados resíduos de aminoácidos constituintes são modificado com um ácido gordo, assim como um método para a preparação do referido péptido.

A presente requerente analisou, precisamente, a estrutura do péptido indutor da secreção da GH endógena e verificou que o referido péptido é um péptido consistindo na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2, em que o grupo hidroxilo da cadeia lateral da 3^a serina do terminal Amina foi acilado com um ácido gordo. Além disso, foi também purificado um péptido indutor da secreção da GH derivado de humano, a partir do extracto de estômago humano, tendo uma actividade significativa de libertação de Ca semelhante à do extracto de estômago de rato e este foi analisado para a sua estrutura, da mesma forma que o péptido indutor da secreção da GH derivado de rato e, consequentemente, a requerente verificou que o péptido indutor da secreção da GH endógena derivado de humano consiste na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 3, em que o grupo hidroxilo da cadeia lateral da 3^a serina do terminal amina foi acilado com um ácido gordo. A comparação entre as sequências de aminoácidos de péptidos indutores da secreção da GH endógena, derivados de rato e de humano, revelou uma homologia tão elevada quanto 89% do total.

Especificamente, os péptidos derivados de rato e de humano são idênticos em termos de sequência de aminoácidos, do 1º ao 10º aminoácidos, a partir do terminal amina e numa sequência de aminoácidos do 13º ao 28º aminoácidos do terminal amina, mas são diferentes do 11º ao 12º aminoácidos, os quais são lisina e alanina no péptido de rato, os quais são substituídos, respectivamente, por arginina e valina, no péptido humano. O péptido indutor da secreção da GH endógena derivado de rato foi quebrado com várias proteases e foi medida a actividade de libertação de Ca dos seus fragmentos peptídicos purificados e, como um resultado, o menor péptido tendo actividade de

libertação de Ca, foi um péptido consistindo no 1º ao 7º aminoácidos do terminal amina.

A requerente verificou, pela medição da actividade de libertação de Ca de péptidos sintetizados quimicamente que a sequência nuclear, essencial para a promoção da actividade de libertação de Ca, é uma sequência consistindo em 4 aminoácidos, estabelecida na SEQ ID N°: 8. Além disso, a sequência consistindo em 10 aminoácidos, estabelecida na SEQ ID N°: 9, era conservada em péptidos indutores da secreção da GH endógena de não-rato (cada consistindo em 28 aminoácidos), distintos, de humano, porco e bovino, assim como em péptidos indutores da secreção da GH endógena (cada consistindo em 27 aminoácidos) em que foi eliminada uma glutamina dos péptidos acima.

Isto é, é aqui descrito um péptido modificado com um ácido gordo compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 8, de um modo preferido, a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 1 e, de um modo mais preferido, a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 9, como a sequência nuclear, essencial para a promoção da actividade de libertação de Ca.

Foram, também, isolados péptidos indutores da secreção da GH endógena, a partir de galinha, enguia e rã e estes péptidos demonstraram ter uma sequência nuclear consistindo em 4 aminoácidos, estabelecida na SEQ ID N°: 8.

Além disso, foi, também, isolado um péptido indutor da secreção da GH endógena, muito semelhante a um péptido indutor da secreção da GH endógena de rato, a partir de rã.

Além disso, foram, também, isolados péptidos indutores da secreção da GH endógena a partir de *Xenopus laevis*, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e cão. A grelina-23, consistindo em 23 aminoácidos e a grelina-20, consistindo em 20 aminoácidos foram isoladas, respectivamente, a partir da truta arco-íris.

O aminoácido do terminal carboxilo da grelina da enguia, grelina-23 e grelina-20 da truta arco-íris encontrava-se amidado.

Dado que um resíduo de aminoácido na 3^a posição do terminal amina no péptido indutor da secreção da GH endógena de *Xenopus laevis* é treonina, é também aqui descrito um péptido modificado com um ácido gordo, o qual contém, como a sequência nuclear essencial para apresentar actividade de libertação de Ca, um péptido em que o resíduo de aminoácido 3^a serina foi substituído por treonina, na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 8, de um modo preferido, a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 1 e, de um modo mais preferido, a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 9.

O péptido endógeno modificado com um ácido gordo tendo actividade indutora da secreção da GH ou o péptido modificado com um ácido gordo, consistindo na referida sequência nuclear, aqui divulgada, proporciona também uma orientação para concepção de um composto tendo actividade de libertação de Ca.

Ou seja, é obtido um novo composto tendo actividade de libertação de Ca, pela síntese de um análogo estrutural do referido péptido modificado com um ácido gordo, confirmando a actividade de libertação de Ca do análogo estrutural resultante. Consequentemente, é aqui, também, descrito um péptido ou análogo

de péptido, tendo a actividade de aumento da concentração intracelular de iões de cálcio, em que um determinado aminoácido constituinte é substituído por um aminoácido modificado ou por um composto não-aminoácido.

Foi obtido um ADNC codificando o péptido indutor da secreção da GH endógena, de uma forma habitual. Cada um dos ADNC de rato e de humano consiste em 117 aminoácidos, como mostrado nas sequências de aminoácidos das SEQ ID Nº: 4 e 5 e as sequências de aminoácidos de péptidos indutores da secreção da GH endógena de rato e de humano eram idênticas numa sequência de 28 aminoácidos, respectivamente, a partir da 24^a à 51^a posições do terminal amina. Ou seja, foi divulgado que o péptido indutor da secreção da GH endógena é sintetizado sob a forma de um péptido precursor consistindo em 117 aminoácidos, depois, é excisado um péptido sinal consistindo em 23 aminoácidos do terminal amina e são excisados 56 aminoácidos adicionais do terminal carboxilo, pelo que, é formado o péptido modificado com um ácido gordo tendo actividade indutora da secreção da GH. Além disso, foi também encontrado em porcos um ADNC codificando um precursor do péptido indutor da secreção da GH endógena, consistindo em 28 aminoácidos.

Além disso, foi encontrado em porcos um ADNC codificando um precursor do péptido indutor da secreção da GH endógena, consistindo em 27 aminoácidos.

Além disso, foi verificado em bovinos um ADNC parcial codificando um precursor do péptido indutor da secreção da GH endógena consistindo em 27 aminoácidos.

Além disso, foi também verificado em enguia, *Xenopus laevis* e truta arco-íris, um ADNc codificando um precursor do péptido indutor da secreção da GH endógena. Foram isolados, respectivamente, um ADNc codificando um precursor da grelina-23, consistindo em 23 aminoácidos e um ADNc codificando um precursor da grelina-20, de 20 aminoácidos, a partir da truta arco-íris.

Consequentemente, é aqui adicionalmente descrito um ADNc codificando um precursor do péptido indutor da secreção da GH endógena, assim como um método de produção de um péptido como um material de partida do péptido modificado com um ácido gordo ou análogo de péptido, tendo actividade de libertação de Ca, o qual compreende a utilização do referido ADNc.

Na purificação do péptido indutor da secreção da GH endógena (grelina), composto por 28 aminoácidos, proveniente do extracto de estômago de rato, foi analisado um péptido recuperado, sob a forma de uma fracção menor e, como um resultado, foi encontrado um péptido consistindo em 27 aminoácidos (grelina-27), o qual é um péptido da grelina do qual a 13^a ou 14^a glutamina foi eliminada. A grelina-27 tem, completamente, a mesma actividade de libertação de Ca e actividade de indução da secreção da GH do que a grelina consistindo em 28 aminoácidos e a grelina-27 é um péptido indutor da secreção da GH endógena e, deste modo, a grelina-27, também, se situa no âmbito da presente invenção.

A sequência nucleotídica codificando a 13^a e 14^a glutamina na grelina é gca gca, a qual é uma sequência terminal de um exão a ser submetida a processamento do ARNm, sugerindo, deste modo, a possibilidade de formação de um ADNc a partir do qual foram eliminados dois codões para resíduos de glutamina por

processamento diferente. De facto, foi encontrado um ADNc codificando um péptido precursor da grelina-27, consistindo em 27 aminoácidos, no rastreio de bibliotecas de ADNc de rato e de humano.

Ou seja, foi divulgado que o péptido da grelina-27 de rato e humano seja sintetizado, sob a forma de um péptido precursor consistindo em 116 aminoácidos, estabelecido na SEQ ID N°: 12 ou 13, depois, é excisado um péptido sinal, consistindo em 23 aminoácidos do terminal amina e são excisados 56 aminoácidos adicionais do terminal carboxilo, pelo que, é formado um péptido modificado com um ácido gordo, consistindo em 27 aminoácidos, tendo actividade indutora da secreção da GH (grelina-27).

Além disso, foi encontrado um ADNc codificando um precursor do péptido da grelina-27 em porcos e bovinos e foi confirmada a presença da grelina-27 e do seu precursor nestes animais.

Ou seja, é aqui, também, descrito o péptido da grelina-27, consistindo numa sequência de aminoácidos estabelecida nas SEQ ID N°: 10, 11, 17 e 22. É aqui descrito um péptido precursor da grelina-27 tendo uma sequência de aminoácidos estabelecida nas SEQ ID N°: 12, 13, 19 e 23 e um ADNc codificando o referido péptido precursor, o qual comprehende a sequência nucleotídica estabelecida nas SEQ ID N°: 14, 15, 21 e 24.

O péptido modificado com um ácido gordo tendo actividade de libertação de Ca e o composto do tipo peptídico, tal como um análogo de péptido tendo actividade de libertação de Ca, como aqui descrito, proporciona, também, uma composição farmacêutica no tratamento de doenças atribuíveis a defeito ou diminuição da GH. A referida composição farmacêutica pode ser utilizada no

tratamento de qualquer doença contra a qual a administração de GH é eficaz e podem ser superados vários efeitos secundários causados pela administração da GH. Além disso, a referida a composição farmacêutica pode, também, ser utilizada como um fármaco para animais, tal como um agente promotor do crescimento de animais.

Dado que o composto do tipo peptídico aqui descrito tem uma acção promotora do apetite por administração ventricular e administração intravenosa e, deste modo, este pode ser utilizado como um agente promotor do apetite no tratamento da perda do apetite ou sitofobia. Além disso, o presente composto do tipo peptídico tem uma acção promotora da motilidade gástrica e da secreção de ácido gástrico e, deste modo, pode ser, também, utilizado como um agente no tratamento de doenças funcionais do estômago, tais como indigestão não-ulcerosa, atonia gástrica leve súbita, indigestão funcional e refluxo esofágico. Além disso, o presente composto do tipo peptídico apresenta uma acção de promoção do crescimento celular da medula óssea, duodeno e jejuno, por administração intravenosa e, deste modo, pode ser utilizado como um agente de protecção da membrana mucosa no tracto intestinal, um agente para a prevenção de lesões da membrana mucosa no intestino delgado, durante a nutrição intravenosa e um agente para o tratamento da osteoporose.

É aqui, também, descrito um anticorpo, preparado pela utilização do péptido modificado com um ácido gordo tendo actividade de libertação de Ca, aqui descrito como um antigénio, um método de medição do péptido indutor da secreção da GH endógena, pela utilização do referido anticorpo e um kit de medição compreendendo o referido anticorpo.

Além disso, é aqui descrito um método de ensaio para a separação e quantificação da grelina modificada com um ácido gordo e a grelina a partir da qual o ácido gordo foi eliminado, o qual compreende a utilização de dois anticorpos produzidos contra péptidos do terminal N e carboxilo da grelina, tendo este antícorpo capacidade para reconhecer a 3^a serina modificada com um ácido gordo, assim como um kit de ensaio compreendendo uma combinação dos anticorpos contra os péptidos do terminal N e carboxilo da grelina.

Ou seja, é aqui descrita uma nova hormona peptídica, tendo um novo aminoácido modificado, i. e., serina acilada e proporciona, também, uma orientação para uma nova concepção de um composto tendo actividade de libertação de Ca, com a estrutura do referido péptido como uma estrutura base fundamental.

Além disso, a elucidação do mecanismo da indução da secreção da GH pelo péptido modificado com um ácido gordo da presente invenção ou pela hormona da libertação da GH e somatostatina, parece ser extensível não apenas ao mecanismo da indução da secreção da GH, mas também ao mecanismo de regulação da secreção de outras hormonas. A presente invenção divulga várias funções do péptido modificado com um ácido gordo, como um factor regulador do sistema circulatório e do sistema metabólico e o efeito da presente invenção estende-se à elucidação de um novo mecanismo biológico regulador.

Especificamente, é aqui descrito:

- (1) Um composto do tipo peptídico, em que num péptido tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião

de cálcio , pelo menos, um aminoácido é substituído por um aminoácido modificado e/ou um composto não-aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(2) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1), o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2 ou (b) uma sequência de aminoácidos tendo qualquer das sequências de aminoácidos seleccionadas do grupo consistindo em

- (1) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 4,
- (2) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 5,
- (3) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 6,
- (4) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 7,
- (5) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 8,
- (6) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 9 e
- (7) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 10

a partir do terminal amina na sequência (a) e, pelo menos, um aminoácido eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa das referidas sequências de aminoácidos ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(3) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (2) acima, o qual comprehende uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nas sequências de

aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 e 23 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(4) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (2) acima, o qual comprehende uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 25, 26, 29, 30, 31, 32, 34 e 35 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(5) Um composto do tipo peptídico, em que num péptido tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio e a actividade de indução da secreção da hormona do crescimento, (a) aminoácidos constitutivos são modificados ou não modificados e (b) pelo menos, um aminoácido é substituído ou não substituído por um composto não-aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(6) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1) ou (5), o qual comprehende as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 27, 28 e 33 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(7) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (5), o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2 ou (b) uma sequência de aminoácidos tendo qualquer das sequências de aminoácidos seleccionadas do grupo consistindo em

(1) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 4,

(2) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 5,

(3) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 6,

(4) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 7,

(5) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 8,

(6) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 9 e

(7) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 10

a partir do terminal amina na sequência (a) e, pelo menos, um aminoácido eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa das referidas sequências de aminoácidos ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(8) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (7) acima, o qual comprehende uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 e 23 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(9) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (7) acima, o qual comprehende uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 25, 26, 29, 30, 31, 32, 34 e 35 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(10) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1) ou (5) acima, cujos aminoácidos do terminal amina 1 a 4 são representados pela fórmula:

A-B-C-O-

em que o símbolo A é um aminoácido ou um composto não-aminoácido ou está ausente e o símbolo B é um aminoácido ou um composto não-aminoácido ou está ausente, desde que o comprimento da cadeia molecular A + B seja um comprimento dipeptídico e o símbolo C ou o símbolo D possam ser iguais ou diferentes e representa (a) um aminoácido modificado, (b) um aminoácido tendo um resíduo hidrofóbico ou (c) um aminoácido tendo uma cadeia lateral básica ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(11) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (10), em que o símbolo C é um aminoácido modificado, no qual foi introduzida (a) uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono no átomo de carbono α do aminoácido através ou não de um grupo alquíleno contendo um ou mais átomos de carbono e através de uma ligação éster, éter, tioéter, amida ou persulfureto ou (b) foi introduzida uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono no átomo de carbono α do aminoácido e o símbolo D é um aminoácido tendo um resíduo hidrofóbico ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(12) Um composto do tipo peptídico, em que numa sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 2, 3, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31, uma sequência de aminoácidos dos aminoácidos do terminal amina 1 a 4 é substituída pela estrutura do composto do tipo peptídico

descrito no item (10) ou (11) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(13) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1), (2), (3), (5), (7) ou (8) acima, em que o aminoácido modificado é um aminoácido na 3^a posição do terminal amina ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(14) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (13), em que o aminoácido no aminoácido modificado é serina ou cisteína ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(15) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1), (2), (3), (5), (7) ou (8) acima, o qual compreende um aminoácido modificado no qual (a) foi introduzida uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono no átomo de carbono α do aminoácido através ou não de um grupo alquíleno contendo um ou mais átomos de carbono e através de uma ligação éster, éter, tioéster, tioéter, amida ou carbamida ou (b) foi introduzido H ou uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono no átomo de carbono α do aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(16) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10) ou (12) acima, em que o aminoácido modificado é um aminoácido no qual (a) foi introduzida uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais os átomos de carbono no átomo de carbono α através ou não de um grupo alquíleno contendo um ou mais átomos de carbono e através de uma ligação éster,

éter, tioéster, tioéter, persulfureto, amida, carbamida ou tiocarbamida ou (b) foi introduzida uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono num carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(17) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1), (2), (3), (5), (7) ou (8) acima, o qual compreende um aminoácido modificado, modificado com com uma ligação éster ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(18) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10), (11) ou (12) acima, o qual compreende um aminoácido modificado, modificado pela conversão de um grupo funcional numa cadeia lateral do referido aminoácido numa ligação éster ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(19) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (17) acima, o qual compreende um aminoácido tendo um ácido gordo ligado através de uma ligação éster a um grupo hidroxilo da cadeia lateral do referido aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(20) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (18) acima, o qual compreende um aminoácido tendo um ácido gordo ligado através de uma ligação éster a um grupo hidroxilo da cadeia lateral do referido aminoácido ou através de uma ligação tioéster a um grupo mercapto da cadeia lateral do referido aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

- (21) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (19) acima, o qual comprehende um aminoácido, ao qual foi ligado um ácido gordo contendo 2 a 35 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (22) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (20) acima, em que o ácido gordo contém 2 a 35 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (23) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (21) acima, o qual comprehende um aminoácido, ao qual foi ligado um ácido gordo seleccionado do grupo consistindo em ácidos gordos contendo 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (24) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (22) acima, em que o ácido gordo é um ácido gordo seleccionado do grupo consistindo em ácidos gordos contendo 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (25) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (23) acima, em que o ácido gordo ligado é o ácido octanóico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (26) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (24) acima, em que o ácido gordo é o ácido octanóico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(27) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (23) acima, em que o ácido gordo ligado é o ácido decanóico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(28) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (24) acima, em que o ácido gordo é o ácido decanóico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(29) um composto do tipo peptídico compreendendo um aminoácido básico ligado ao terminal carboxilo de um composto de tipo peptídico descrito nos itens (1) a (28) acima;

(30) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1), (2), (3), (5), (7), (8), (13), (14), (15), (17), (19), (21), (23), (25) e (27) acima, em que o terminal amina é modificado com um grupo alquilo ou acilo saturado ou não saturado contendo um ou mais átomos de carbono e/ou um grupo hidroxilo do grupo carboxilo do terminal carboxilo é OZ ou NR₂R₃, em que Z é um catião farmaceuticamente aceitável ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear e R₂ e R₃ são iguais ou diferentes e representam H ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear;

(31) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10), (11), (12), (16), (18), (20), (22), (24), (26), (28) e (29) acima, em que o grupo amina do terminal amina é modificado pela introdução de um grupo alquilo ou acilo saturado ou não saturado contendo um ou mais átomos de carbono e/ou um grupo

hidroxilo do grupo carboxilo do terminal carboxilo é OZ ou NR₂R₃, em que Z é um catião farmaceuticamente aceitável ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear e R₂ e R₃ são iguais ou diferentes e representam H ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear;

(32) Um composto do tipo peptídico compreendendo um grupo básico introduzido num derivado amida do terminal carboxilo de um composto do tipo peptídico descrito no item (30) ou (31) acima;

(33) Uma composição farmacêutica compreendendo um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;

(34) Uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;

(35) Uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende um agente para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento e um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(36) Uma composição farmacêutica de acordo com os itens (33) a (35) acima, a qual é aplicada a animais que não humanos;

(37) Um método para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende administração de uma composição farmacêutica compreendendo um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;

(38) Um método para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a administração de um agente para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento e um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(39) Um método para o tratamento de acordo com os itens (37) ou (38), o qual é aplicado a animais que não humanos;

(40) Um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima, o qual compreende uma sequência nucleotídica codificando um péptido contendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN;

(41) O ADN de acordo com o item (40) acima, em que a sequência nucleotídica é uma sequência nucleotídica

selecionada do grupo consistindo nas sequências nucleotídicas estabelecidas nas SEQ ID Nº: 6, 7, 14, 15, 20, 21, 24, 36, 37, 38 e 39;

(42) O ADN de acordo com o item (40) acima, em que a sequência nucleotídica é uma sequência nucleotídica codificando aminoácidos numa sequência nucleotídica seleccionada do grupo consistindo nas sequências nucleotídicas estabelecidas nas SEQ ID Nº: 6, 7, 14, 15, 20, 21, 24, 36, 37, 38 e 39;

(43) Um vector compreendendo um ADN descrito nos itens (40) a (42) acima;

(44) Células compreendendo o vector descrito no item (43) acima;

(45) Células compreendendo um ADN descrito nos itens (40) a (42) acima, em que um composto do tipo peptídico tendo uma sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN pode ser produzida como um composto do tipo peptídico tendo, pelo menos, um aminoácido modificado na referida sequência de aminoácidos;

(46) Um anticorpo contra um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima;

(47) Um método para testar um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima, o qual comprehende a utilização do anticorpo descrito no item (46) acima, para detectar o composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima;

(48) Um kit para detectar um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima, o qual compreende a utilização do anticorpo descrito no item (46) acima, para detectar o composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima;

(49) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima por tecnologia de recombinação genética, o qual compreende a transformação de um vector contendo um ADN descrito nos itens (40) a (42) acima em células hospedeiras capazes de modificar uma cadeia lateral de, pelo menos, um aminoácido no referido péptido, cultivando, em seguida as células transformadas resultantes e a recuperação do composto de tipo peptídico pretendido a partir da cultura;

(50) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima, por tecnologia de recombinação genética, o qual compreende a transformação de um vector contendo um ADN descrito nos itens (40) a (42) acima em células hospedeiras, cultivando, em seguida, as células resultantes transformadas e a recuperação do composto do tipo peptídico pretendido a partir da cultura, seguida por modificação química de um seu aminoácido arbitrário;

(51) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (19) a (28) acima por tecnologia de recombinação genética, o qual compreende a utilização de células tendo a actividade de ligação de um ácido gordo através de uma ligação éster a um grupo hidroxilo da cadeia lateral de um aminoácido ou através de uma ligação tioéster

a um grupo mercapto da cadeia lateral de um aminoácido no composto do tipo peptídico;

(52) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (19) a (28) acima, o qual compreende a utilização células tendo a actividade de acilação da serina de ligação de um ácido gordo através de uma ligação éster a um grupo hidroxilo da cadeia lateral da serina na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 8;

(53) Um processo para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (19) a (28) acima, o qual compreende a utilização de células tendo a actividade de acilação de ligação de um ácido gordo através de uma ligação éster a um grupo hidroxilo da cadeia lateral da treonina na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N° 28;

(54) Uma composição farmacêutica para terapia génica para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima, no interior de células num organismo vivo e a expressão de um péptido com, pelo menos, um aminoácido modificado, tendo o péptido a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio;

(55) Um método para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a integração de um vector contendo um ADN

codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrita nos itens (1) a (32) acima, no interior de células num organismo vivo, permitindo que seja produzido um péptido tendo uma sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN como um péptido tendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na referida sequência de aminoácidos, em que é expresso um péptido tendo a actividade de indução da hormona do crescimento;

(56) Uma composição farmacêutica para terapia génica para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (32) acima, no interior de células num organismo vivo e a expressão de um péptido com, pelo menos, um aminoácido modificado, tendo o péptido a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio;

(57) Um método para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrita nos itens (1) a (32) acima, no interior de células num organismo vivo, permitindo que seja produzido um péptido tendo uma sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN como um péptido tendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na referida sequência de

aminoácidos, em que é expresso um péptido tendo a actividade de indução da hormona do crescimento.

Especificamente, é descrito aqui:

(1) Um composto do tipo peptídico, em que, pelo menos, um aminoácido é substituído por um aminoácido modificado e/ou um composto não-aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, num péptido tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio;

(2) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2 ou (b) uma sequência de aminoácidos tendo qualquer das sequências de aminoácidos seleccionadas do grupo consistindo em

(1) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 4,

(2) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 5,

(3) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 6,

(4) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 7,

(5) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 8,

(6) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 9 e

(7) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 10

a partir do terminal amina na sequência (a) e, pelo menos, um aminoácido eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa das referidas sequências de aminoácidos ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(3) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (2) acima, o qual comprehende uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 25 e 26 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(4) Um composto do tipo peptídico em que num péptido tendo a actividade de aumentar o ião de cálcio intracelular a concentração e a actividade de indução da secreção da hormona do crescimento, (a) os aminoácidos constitutivos são modificados ou não modificados e (b) pelo menos, um aminoácido é substituído ou não substituído por um composto não-aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(5) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1) ou (4), o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 27 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

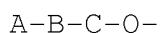
(6) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (4) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2 ou (b) uma sequência de aminoácidos tendo qualquer das sequências de aminoácidos seleccionadas do grupo consistindo em

- (1) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 4,
- (2) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 5,
- (3) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 6,
- (4) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 7,
- (5) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 8,
- (6) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 9 e
- (7) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 10

a partir do terminal amina na sequência (a) e, pelo menos, um aminoácido eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa das referidas sequências de aminoácidos ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(7) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (6) acima, o qual comprehende uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID N°: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22, 23; 25 e 26 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(8) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1) ou (4) acima, cujos aminoácidos do terminal amina 1 a 4 são representados pela fórmula:



em que o símbolo A é um aminoácido ou um composto não-aminoácido ou está ausente e o símbolo B é um aminoácido ou um composto não-aminoácido ou está ausente, desde que o comprimento da cadeia molecular A + B seja um comprimento dipeptídico e o símbolo C ou o símbolo D possam ser iguais ou diferentes e representa (a) um aminoácido modificado, (b) um aminoácido tendo um resíduo hidrofóbico ou (c) um aminoácido tendo uma cadeia lateral básica ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(9) Um composto do tipo peptídico, em que numa sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID Nº: 2, 3, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25 e 26, uma sequência de aminoácidos dos aminoácidos do terminal amina 1 a 4 está substituída pela estrutura do composto do tipo peptídico descrito no item (8) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

(10) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (9) acima, em que o aminoácido modificado é um aminoácido no qual (a) foi introduzida uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono no átomo de carbono α do aminoácido através ou não de um grupo alquíleno contendo um ou mais átomos de carbono e através de uma ligação éster, éter, tioéster, tioéter, persulfureto, amida, carbamida ou tiocarbamida ou (b) foi introduzida uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono, no átomo de carbono α do aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

- (11) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (10) acima, o qual comprehende um aminoácido modificado, modificado pela conversão de um grupo funcional numa cadeia lateral do referido aminoácido numa ligação éster ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (12) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (11) acima, o qual comprehende um aminoácido tendo um ácido gordo ligado através de uma ligação éster a um grupo hidroxilo da cadeia lateral ou grupo mercapto do referido aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (13) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (12) acima, em que o ácido gordo contém 2 a 35 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (14) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (12) acima, em que o ácido gordo é um ácido gordo seleccionado do grupo consistindo em ácidos gordos contendo 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (15) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (12) acima, em que o ácido gordo é o ácido octanóico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (16) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (12) acima, em que o ácido gordo é o ácido decanóico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(17) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (16) acima, em que o grupo amina do terminal amina é modificado por introdução de um grupo alquilo ou acilo saturado ou não saturado, contendo um ou mais átomos de carbono e/ou um grupo hidroxilo do grupo carboxilo do terminal carboxilo é OZ ou NR₂R₃ em que Z é um catião farmaceuticamente aceitável ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear e R₂ e R₃ são iguais ou diferentes e representam H ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear;

(18) Um composto do tipo peptídico compreendendo um aminoácido básico ligado ao terminal carboxilo de um composto de tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima;

(19) Um composto do tipo peptídico compreendendo um grupo básico introduzido num derivado amida do terminal carboxilo do composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) ou (18) acima;

(20) Uma composição farmacêutica compreendendo um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;

(21) Uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;

- (22) Uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende um agente para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento e um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (23) Uma composição farmacêutica de acordo com os itens (20) a (22), a qual é aplicada a animais que não humanos;
- (24) Um método para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição (da hormona do crescimento, o qual compreende a administração de uma composição farmacêutica compreendendo um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;
- (25) Um método para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a administração de um agente para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento e um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (26) Um método de acordo com o item (24) ou (25), o qual é aplicado a animais que não humanos;
- (27) Um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima, o qual compreende uma sequência nucleotídica

codificando um péptido contendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN;

(28) O ADN de acordo com o item (27) acima, em que a sequência nucleotídica é uma sequência nucleotídica seleccionada do grupo consistindo nas sequências nucleotídicas estabelecidas nas SEQ ID N°: 6, 7, 14, 15, 20, 21 e 24;

(29) O ADN de acordo com o item (27) acima, em que a sequência nucleotídica é uma sequência nucleotídica codificando aminoácidos numa sequência nucleotídica seleccionada do grupo consistindo nas sequências nucleotídicas estabelecidas nas SEQ ID N°: 6, 7, 14, 15, 20, 21 e 24;

(30) Um vector compreendendo um ADN descrito nos itens (27) a (29) acima;

(31) Células compreendendo o vector descrito no item (30) acima;

(32) Células compreendendo um ADN descrito nos itens (27) a (29) acima, em que um composto do tipo peptídico tendo um a sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN pode ser produzida como um composto do tipo peptídico tendo, pelo menos, um aminoácido modificado na referida sequência de aminoácidos;

(33) Um anticorpo contra um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima;

(34) Um método para testar um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima, o qual compreende a utilização do anticorpo descrito no item (33) acima, para detectar o composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima;

(35) Um kit para detectar um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima, o qual compreende a utilização do anticorpo descrito no item (33) acima, para detectar o composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima;

(36) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima, por tecnologia de recombinação genética, o qual compreende a transformação de um vector contendo um ADN descrito nos itens (27) a (29) acima em células hospedeiras capazes de modificar uma cadeia lateral de, pelo menos, um aminoácido no referido péptido, cultivando, em seguida, as células resultantes transformadas e a recuperação do composto do tipo peptídico pretendido a partir da cultura;

(37) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima, por tecnologia de recombinação genética, o qual compreende a transformação de um vector contendo um ADN descrito nos itens (27) a (29) acima nas células hospedeiras, cultivando, em seguida, as células transformadas resultantes e a recuperação do

composto pretendido a partir da cultura, seguida por modificação química de um seu aminoácido arbitrário;

(38) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (12) a (16) acima, por tecnologia de recombinação genética, o qual comprehende a utilização de células tendo a actividade de ligação de um ácido gordo a um grupo hidroxilo da cadeia lateral ou a um grupo mercapto da cadeia lateral de um aminoácido no composto do tipo peptídico, através de uma ligação éster;

(39) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (12) a (16) acima, o qual comprehende a utilização de células tendo a actividade de acilação da serina de ligação de um ácido gordo através de uma ligação éster a um grupo hidroxilo da cadeia lateral de serina na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 8;

(40) Uma composição farmacêutica para terapia génica para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual comprehende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos do composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima, no interior de células num organismo vivo e a expressão de um péptido com, pelo menos, um aminoácido modificado, tendo o péptido a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio;

(41) Um método para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual comprehende a integração de um vector contendo um ADN

codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima, no interior de células num organismo vivo, permitindo que seja produzido um péptido tendo uma sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN como um péptido tendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na referida sequência de aminoácidos, em que é expresso um péptido tendo a actividade de indução da hormona do crescimento;

(42) Uma composição farmacêutica para terapia génica para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos do composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima, no interior de células num organismo vivo e a expressão de um péptido com, pelo menos, um aminoácido modificado, tendo o péptido a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio;

(43) Um método para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (19) acima, no interior de células num organismo vivo, permitindo que seja produzido um péptido tendo uma sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN como um péptido tendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na referida sequência de

aminoácidos, em que é expresso um péptido tendo a actividade de indução da hormona do crescimento.

Especificamente, é também aqui descrito

(1) Um composto do tipo peptídico tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio, em que, pelo menos, um aminoácido é substituído por um aminoácido modificado e/ou um composto não-aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(2) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2 ou (b) uma sequência de aminoácidos tendo qualquer das sequências de aminoácidos seleccionadas do grupo consistindo em

- (1) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 4,
- (2) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 5,
- (3) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 6,
- (4) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 7,
- (5) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 8,
- (6) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 9 e
- (7) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 10

a partir do terminal amina na sequência (a) e, pelo menos, um aminoácido eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa das referidas sequências de aminoácidos ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(3) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (2) acima, o qual comprehende uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID Nº: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 e 23 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(4) Um composto do tipo peptídico tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio e a actividade de indução da secreção da hormona do crescimento, em que (a) os aminoácidos constitutivos são modificados ou não modificados e

(b) pelo menos, um aminoácido é substituído ou não substituído por um composto não-aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(5) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (4) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID Nº: 2 ou (b) uma sequência de aminoácidos tendo qualquer das sequências de aminoácidos seleccionadas do grupo consistindo em

(1) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 4,

(2) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 5,

(3) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 6,

(4) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 7,

(5) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 8,

(6) sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 9 e

(7) sequência de aminoácidos de aminoácidos 1 a 10

a partir do terminal amina na sequência (a) e, pelo menos, um aminoácido eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa das referidas sequências de aminoácidos ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(6) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (4) ou (5) acima, o qual comprehende uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID Nº: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 e 23 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(7) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (6) acima, em que o aminoácido modificado é um aminoácido na 3^a posição a partir do seu terminal amina ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(8) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (7) acima, em que o aminoácido no aminoácido modificado é serina ou cisteína ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

- (9) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (6) acima, o qual comprehende um aminoácido modificado no qual (a) foi introduzida uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono no átomo de carbono α do aminoácido através ou não de um grupo alquíleno contendo um ou mais átomos de carbono e através de uma ligação éster, éter, tioéster, tioéter, amida ou carbamida ou (b) foi introduzido H ou uma cadeia alquilo saturada ou não saturada, contendo um ou mais átomos de carbono no átomo de carbono α do aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (10) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (6) acima, o qual comprehende um aminoácido modificado, modificado com uma ligação éster ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (11) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (10) acima, o qual comprehende um aminoácido ao qual foi ligado um ácido gordo ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (12) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (11) acima, o qual comprehende um aminoácido ao qual foi ligado um ácido gordo contendo 2 a 35 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (13) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (12) acima, o qual comprehende um aminoácido ao qual foi ligado um ácido gordo seleccionado do grupo consistindo em ácidos gordos contendo 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(14) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (13) acima, em que o ácido gordo ligado é o ácido octanóico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(15) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (13) acima, em que o ácido gordo ligado é o ácido decanóico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(16) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (15) acima, em que o terminal amina é modificado com um grupo alquilo ou acilo saturado ou não saturado contendo um ou mais átomos de carbono e/ou um grupo hidroxilo do grupo carboxilo do terminal carboxilo é OZ ou NR₂R₃, em que Z é um catião farmaceuticamente aceitável ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear e R₂ e R₃ são iguais ou diferentes e representam H ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear;

(17) Uma composição farmacêutica compreendendo um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;

(18) Uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;

- (19) Uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende um agente para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento e um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (20) Uma composição farmacêutica de acordo com os itens (17) a (19), a qual é aplicada a animais que não humanos;
- (21) Um método para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende administração de uma composição farmacêutica compreendendo um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;
- (22) Um método para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a administração de um agente para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento e um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (23) Um método para o tratamento de acordo com os itens (21) a (22), o qual é aplicado a animais que não humanos;
- (24) Um ADN para um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima, o qual compreende uma sequência nucleotídica codificando um péptido contendo uma sequência

de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN;

(25) O ADN de acordo com o item (24) acima, o qual comprehende uma sequência nucleotídica seleccionada do grupo consistindo nas sequências nucleotídicas estabelecidas nas SEQ ID N°: 6, 7, 14, 15, 20, 21 e 24;

(26) O ADN de acordo com o item (24) acima, o qual comprehende uma sequência nucleotídica codificando aminoácidos numa sequência nucleotídica seleccionada do grupo consistindo nas sequências nucleotídicas estabelecidas nas SEQ ID N°: 6, 7, 14, 15, 20, 21 e 24;

(27) Um vector comprehendendo um ADN descrito nos itens (24) a (26) acima;

(28) Células comprehendendo o vector descrito no item (27) acima;

(29) Células comprehendendo um vector contendo um ADN descrito nos itens (24) a (26) acima, em que um composto do tipo peptídico codificando uma sequência de aminoácidos pelo referido ADN pode ser produzido como um composto do tipo peptídico tendo, pelo menos, um aminoácido modificado na referida sequência de aminoácidos;

(30) Um anticorpo contra um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima;

(31) Um método para testar um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima, o qual compreende a utilização do anticorpo descrito no item (30) acima, para detectar o composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima;

(32) Um kit para detectar um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima, o qual compreende a utilização do anticorpo descrito no item (30) acima, para detectar o referido composto do tipo peptídico;

(33) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima por tecnologia de recombinação genética, o qual compreende a transformação de um vector contendo um ADN descrito nos itens (24) a (26) acima em células hospedeiras capazes de modificar uma cadeia lateral de, pelo menos, um aminoácido no referido péptido, cultivando, em seguida, as células resultantes transformadas e a recuperação do composto do tipo peptídico pretendido a partir da cultura;

(34) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima por tecnologia de recombinação genética, o qual compreende a transformação de um vector contendo um ADN descrito nos itens (24) a (26) acima nas células hospedeiras, cultivando, em seguida, as células transformadas resultantes e a recuperação do composto do tipo peptídico pretendido a partir da cultura, seguida por modificação química de um seu aminoácido arbitrário;

(35) Um método para produzir o composto do tipo peptídico descrito nos itens (11) a (15) acima por tecnologia de recombinação genética, em que o composto do tipo peptídico pode ser produzido como um péptido tendo um ácido gordo ligado a um resíduo de serina na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 8;

(36) Um método para produzir um composto do tipo peptídico tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio e a actividade de indução da secreção da hormona do crescimento, o qual compreende a transformação de um vector contendo um ADN codificando um composto do tipo peptídico descrito nos itens (4) a (6) acima em células hospedeiras e cultivar as células transformadas resultantes e a recuperação do composto pretendido a partir da cultura;

(37) Uma composição farmacêutica para terapia génica para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima, no interior de células num organismo vivo e a expressão de um péptido com, pelo menos, um aminoácido modificado, tendo o péptido a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio.

(38) Um método para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima, no interior de células num

organismo vivo, permitindo que seja produzido um péptido tendo uma sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN como um péptido tendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na referida sequência de aminoácidos, em que é expresso um péptido tendo a actividade de indução da hormona do crescimento;

(39) Uma composição farmacêutica para terapia génica para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima, no interior de células num organismo vivo e a expressão de um péptido com, pelo menos, um aminoácido modificado, tendo o péptido a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio;

(40) Um método para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (16) acima, no interior de células num organismo vivo, permitindo que seja produzido um péptido tendo uma sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN como um péptido tendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na referida sequência de aminoácidos, em que é expresso um péptido tendo a actividade de indução da hormona do crescimento.

especificamente, é também aqui descrito

- (1) Um composto do tipo peptídico tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio, em que, pelo menos, um aminoácido é substituído por um aminoácido modificado e/ou um composto não-aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (2) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 1 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (3) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2 ou uma sequência de aminoácidos em que na SEQ ID N°: 2, pelo menos, um aminoácido é eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa de uma sequência de aminoácidos 1 a 7 do seu terminal amina ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (4) Um análogo ou derivado do péptido descrito no item (1) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos em que na SEQ ID N°: 3, pelo menos, um aminoácido é eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa de uma sequência dos aminoácidos 1 a 7 do seu terminal amina ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;
- (5) Um composto do tipo peptídico precursor do composto peptídico descrito em (3) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 4 ou uma sequência de aminoácidos em que na SEQ ID N°: 4, pelo menos, um aminoácido é eliminado, substituído e/ou

adicionado numa parte externa de uma sequência dos aminoácidos 1 a 28 do seu terminal amina;

(6) Um composto do tipo peptídico precursor do composto peptídico descrito no item (4) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 5 ou uma sequência de aminoácidos em que na SEQ ID N°: 5, pelo menos, um aminoácido é eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa de uma sequência dos aminoácidos 1 a 28 do seu terminal amina;

(7) Um composto do tipo peptídico tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio e a actividade de indução da secreção da hormona do crescimento ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(8) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (7) acima, o qual tem a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio e a actividade de indução da secreção da hormona do crescimento e tem, pelo menos, um aminoácido substituído por um composto não-aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(9) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (7) a (8) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 1 ou um seu derivado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(10) O composto peptídico descrito nos itens (7) a (8) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2 ou uma sequência de aminoácidos em que na SEQ ID N°: 2, pelo menos, um

aminoácido é eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa de uma sequência dos aminoácidos 1 a 7 do seu terminal amina ou um seu derivado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(11) O composto peptídico descrito nos itens (7) a (8) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos em que na SEQ ID N°: 3, pelo menos, um aminoácido é eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa de uma sequência dos aminoácidos 1 a 7 do seu terminal amina ou um seu derivado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(12) Um composto do tipo peptídico precursor do composto do tipo peptídico descrito no item (10) acima, o qual comprehende uma sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 4 ou uma sequência de aminoácidos em que na SEQ ID N°: 4, pelo menos, um aminoácido é eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa de uma sequência dos aminoácidos 1 a 28 do seu terminal amina;

(13) Um composto do tipo peptídico precursor do composto do tipo peptídico descrito no item (11) acima, o qual comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 5 ou uma sequência de aminoácidos em que na SEQ ID N°: 5, pelo menos, um aminoácido é eliminado, substituído e/ou adicionado numa parte externa de uma sequência dos aminoácidos 1 a 28 do seu terminal amina;

(14) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (6) acima, em que o aminoácido modificado é um aminoácido na 3^a posição a partir do seu terminal amina ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(15) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (14), em que o aminoácido no aminoácido modificado é serina ou cisteína ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(16) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (6) acima, em que a modificação no aminoácido modificado indica a modificação no carbono α do referido aminoácido por (a) uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono, a qual se liga através de um modo de ligação seleccionado do grupo consistindo em éster, éter, tioéster, tioéter, amida ou carbamida através ou não de uma cadeia alquilo contendo um ou mais átomos de carbono ou (b) H ou uma cadeia alquilo saturada ou não saturada contendo um ou mais átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(17) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (1) acima, o qual comprehende um aminoácido modificado, modificado com uma ligação éster ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(18) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (17) acima, o qual comprehende um aminoácido ao qual um ácido gordo é ligado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(19) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (18) acima, o qual comprehende um aminoácido ao qual um ácido

gordo contendo 2 a 35 átomos de carbono é ligado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(20) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (18) acima, em que o ácido gordo ligado é o ácido caprílico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(21) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (18) acima, em que o ácido gordo ligado é o ácido cáprico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(22) O composto do tipo peptídico de acordo com o item (18) acima, em que o ácido gordo ligado é o ácido láurico, um seu ácido gordo monoeno ou um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(23) O composto do tipo peptídico de acordo com os itens (1) a (22) acima, em que o terminal amina é modificado com um grupo alquilo ou acilo saturado ou não saturado contendo um ou mais átomos de carbono e/ou o terminal carboxilo é OZ ou NR₂R₃ em que Z é um catião farmaceuticamente aceitável ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear e R₂ e R₃ são iguais ou diferentes e representam H ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear;

(24) Uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual comprehende um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;

(25) Uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual compreende um agente para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento e um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(26) Uma composição farmacêutica de acordo com os itens (24) a (25), a qual é aplicada a animais que não humanos;

(27) Um método para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a administração de uma composição farmacêutica compreendendo um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como um ingrediente activo;

(28) Um método para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a administração de um agente para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento e um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(29) Um método para o tratamento de acordo com os itens (27) a (28), o qual é aplicado a animais que não humanos;

(30) Um ADN para um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6), o qual compreende uma sequência de ADN codificando o péptido tendo uma sequência de aminoácidos

reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na referida sequência de aminoácidos;

(31) O ADNc de acordo com o item (30) acima, o qual compreende uma sequência de ADN estabelecida na SEQ ID N°: 6 (incluindo NCR);

(32) O ADNc de acordo com o item (30) acima, o qual compreende uma sequência de ADN das bases 31 a 381 numa sequência de ADN estabelecida na SEQ ID N°: 6 (não incluindo NCR);

(33) O ADNc de acordo com o item (30) acima, o qual compreende uma sequência de ADN estabelecida na SEQ ID N°: 7 (incluindo NCR);

(34) O ADNc de acordo com o item (30) acima, o qual compreende uma sequência de ADN das bases 34 a 385 numa sequência de ADN estabelecida na SEQ ID N°: 7 (não incluindo NCR);

(35) Um vector compreendendo um ADN descrito nos itens (30) a (34) acima;

(36) Células compreendendo o vector descrito no item (35) acima;

(37) Células compreendendo um vector contendo um ADN descrito nos itens (30) a (34) acima, em que um composto do tipo peptídico codificando uma sequência de aminoácidos pelo referido ADN pode ser produzido como um composto do tipo peptídico tendo uma sequência de aminoácidos

reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na referida sequência de aminoácidos;

(38) Um anticorpo contra um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (23) acima;

(39) Um método para testar um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (23) acima, o qual compreende a utilização do anticorpo descrito no item (38) acima, para detectar o composto do tipo peptídico;

(40) Um kit para detectar um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (23) acima, o qual compreende a utilização do anticorpo descrito no item (38) acima, para detectar o composto do tipo peptídico;

(41) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima por tecnologia de recombinação genética, o qual compreende a transformação de um vector contendo um ADN descrito no item (30) acima em células hospedeiras capazes de modificar uma cadeia lateral de, pelo menos, um aminoácido no referido péptido, cultivando, em seguida, as células resultantes transformadas e a recuperação do composto do tipo peptídico pretendido a partir da cultura;

(42) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima por tecnologia de recombinação genética, o qual compreende a transformação de um vector contendo um ADN descrito no item (30) acima em células hospedeiras, cultivando, em seguida, as células resultantes transformadas e a recuperação do composto do

tipo peptídico pretendido a partir da cultura, seguida por modificação química de um seu aminoácido arbitrário;

(43) Um método para produzir um composto do tipo peptídico descrito nos itens (18) a (22) acima por tecnologia de recombinação genética, o qual comprehende a utilização de células permitindo que o composto do tipo peptídico seja produzido como um péptido tendo um ácido gordo ligado a um resíduo de serina na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 1;

(44) Um método para produzir um composto do tipo peptídico tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio e a actividade de segregar hormona do crescimento, o qual comprehende a transformação de um vector contendo um ADN codificando um composto do tipo peptídico descrito nos itens (7) a (13) acima em células hospedeiras, cultivando as células transformadas resultantes e a recuperação do composto pretendido a partir da cultura;

(45) Uma composição farmacêutica para terapia génica para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, a qual comprehende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima, no interior de células num organismo vivo e a expressão de um péptido com, pelo menos, um aminoácido modificado, tendo o péptido a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio;

(46) Um método para o tratamento de doenças atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima, no interior de células num organismo vivo, permitindo que seja produzido um péptido tendo uma sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN como um péptido tendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um aminoácido modificável na referida sequência de aminoácidos, em que é expresso um péptido tendo a actividade de indução da hormona do crescimento;

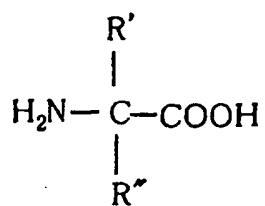
(47) Uma composição farmacêutica para terapia génica para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima, no interior de células num organismo vivo e a expressão de um péptido com, pelo menos, um aminoácido modificado tendo a actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio:

(48) Um método para o tratamento de doenças não atribuíveis a um defeito ou a uma diminuição da hormona do crescimento, o qual compreende a integração de um vector contendo um ADN codificando uma sequência de aminoácidos de um composto do tipo peptídico descrito nos itens (1) a (6) acima, no interior de células num organismo vivo, permitindo que seja produzido um péptido tendo uma sequência de aminoácidos codificada pelo referido ADN como um péptido tendo uma sequência de aminoácidos reconhecendo, pelo menos, um

aminoácido modificável na referida sequência de aminoácidos, em que é expresso um péptido tendo a actividade de indução da hormona do crescimento.

Como aqui utilizado, o aminoácido abrange qualquer aminoácido, tais como L-aminoácido, D-aminoácido, α -aminoácido, β -aminoácido, γ -aminoácido, aminoácido natural e aminoácido sintético ou semelhantes.

Na presente invenção, o aminoácido modificado refere-se a um aminoácido como definido nas reivindicações quando o aminoácido é representado pela fórmula (1):



R' e R'' no aminoácido quimicamente modificado pode ser H ou um grupo de acordo com as reivindicações.

Um aminoácido em que como grupo substituinte representado por R' e R'', um grupo substituinte presente no aminoácido natural é substituído por um grupo substituinte não presente no aminoácido natural ou no seu D-aminoácido correspondente designa-se como aminoácido modificado.

Quando o aminoácido de ocorrência natural contém, e. g., -OH, como um grupo substituinte numa sua cadeia lateral, um grupo formado por acilação desse grupo substituinte é designado como um exemplo preferido, do grupo substituinte referido acima.

O grupo acilo para essa finalidade inclui, e. g., grupos formados por remoção de um grupo hidroxilo a partir de um ácido carboxílico orgânico.

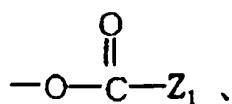
O ácido carboxílico orgânico inclui, e. g., ácidos gordos e o seu número de átomos de carbono é, de um modo preferido, 2 a 35, de um modo mais preferido, 6 a 18 e, de um modo muito preferido, 8 a 16. Esses ácidos gordos incluem, e. g., ácido octanóico (de um modo preferido, ácido caprílico), ácido decanóico (de um modo preferido, ácido cáprico) e ácido dodecanóico (de um modo preferido, ácido láurico), assim como os seus ácidos gordos monoeno ou polieno.

O modo de ligação do éster é descrito em mais detalhe.

Por exemplo, se o aminoácido é serina, treonina, tirosina ou oxiprolina, o aminoácido tem um grupo hidroxilo na cadeia lateral.

O grupo hidroxilo pode ter sido quimicamente modificado. Ou seja, o grupo hidroxilo pode ser esterificado,

O grupo hidroxilo modificado quimicamente deste modo pode ser representado por exemplo por:



Na fórmula acima, Z_1 pode ser qualquer grupo substituinte para modificação química desde que estes não estejam em oposição à definição nas reivindicações, mas dado que os grupos

substituintes utilizados convencionalmente num campo farmacêutico ou na modificação química de péptidos são bem conhecidos nas literaturas de patentes ou nas literaturas científicas, podem ser utilizados esses grupos substituintes conhecidos para a modificação e a modificação química pode ser realizada na presente invenção, de acordo com esses métodos conhecidos.

Nas fórmulas acima, Z_1 pode ser um grupo alquilo de cadeia linear, ramificada ou cílico e esse grupo alquilo pode ser saturado ou não saturado. O seu número de átomos de carbono é normalmente C_{1-50} , de um modo preferido, C_{6-20} .

Os grupos de alquilo representados por Z_1 , Z_2 , Z_3 , Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 ou Z_8 podem ser substituídos com grupos substituintes tais como grupo hidroxilo, grupo amina, halogéneo, grupo nitro e C_{1-3} grupo alcoxilo, os quais são utilizados convencionalmente para a modificação química de péptidos.

Acima, se Z_1-CO- for um resíduo do ácido gordo Z_1-COOH , isto constitui um exemplo do aminoácido ao qual o ácido gordo foi ligado. O ácido gordo, neste caso, inclui, e. g., ácido gordo saturado tal como ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido butírico, ácido capróico, ácido undecílico, ácido palmítico, ácido decanóico, ácido nonadecanóico, ácido beenico, ácido montânico e ácido lacérico e ácidos gordos não saturados, tais como ácido acrílico, ácido oleico, ácido linólico, ácido linolénico e ácido aatearólico. O ácido gordo não saturado pode ser um monoeno ou um polieno.

Além disso, o aminoácido modificado também pode ser um α aminoácido formado por substituição de um grupo (excluindo um

grupo carboxilo e um grupo amina constituindo uma ligação peptídica) ligado a um átomo de carbono α de um aminoácido através de um átomo de hidrogénio ou de um grupo alquilo saturado ou não saturado.

Na presente invenção, o aminoácido modificado pode ser também um aminoácido formado introduzindo um grupo alquilo C₁₋₆ saturado ou não saturado no grupo amina do aminoácido.

O aminoácido não natural aqui descrito é o que tem um grupo amina e um grupo carboxilo em ambos os terminais da molécula e inclui, e. g., NH₂-(CH₂)₃CH(CH₂OH)-COOH, NH₂-(CH₂)₄COOH, NH₂-C(CH₃)₂-(CH₂)₃-COOH e NH₂-CH(CH₃)-(CH₂)₂-CH(CH₃)-COOH. O comprimento da sua cadeia molecular corresponde ao comprimento de um dipéptido, mas o aminoácido não natural na presente invenção inclui também os que têm o comprimento de um péptido.

Além disso, o composto não-aminoácido aqui descrito inclui, e. g., NH₂-CH(CH₂OH)-CH₃, CH₃-CH(R)-COOH, CH₃-CH(R)-CH₃ em que o comprimento da sua molécula corresponde ao comprimento de um péptido ou NH₂-(CH₂)₃CH(CH₂OH)-CH₃ e NH₂-(CH₂)₃CH(R)-CH₃ em que o comprimento da sua molécula corresponde ao comprimento de um dipéptido.

Aqui, R representa um grupo substituinte numa cadeia lateral do aminoácido natural ou no carbono α no aminoácido modificado acima referido.

Breve Descrição dos Desenhos

A Fig. 1 mostra a purificação da grelina a partir do extracto de estômago de rato e a modificação da intensidade

da fluorescência, por aumento da concentração intracelular de iões de cálcio em células CHO-GHSR62, é mostrada pela barra preta. A Fig. 1a mostra um perfil de filtração em gel em Sephadex G-50 (fino) de uma fracção SP-III preparada a partir de 40 g de estômago de rato, para indicar que o peso molecular das fracções activas é de cerca de 3000 Dalton. A Fig. 1b é um gráfico que mostra um perfil de HPLC de permuta iônica com CM secundário e as fracções activas foram eluídas nos tempos de retenção de 55 a 56 minutos foram, adicionalmente, purificadas por HPLC de fase reversa.

A Fig. 2 mostra que foi identificada a modificação da grelina com n-octanoílo. A Fig. 2a mostra o resultado da análise de 2 µg de cada uma de grelina natural (superior) e grelina sintética e grelina sintética desacilada (inferior) por HPLC de fase reversa.

A Fig. 2b é um gráfico mostrando modificações na concentração intracelular de iões de cálcio em células CHO-GHSR62 pela grelina natural (linha sólida), grelina sintética (linha tracejada pequena) e grelina sintética desacilada (linha sólida grossa).

A Fig. 3 é um gráfico mostrando a interacção específica da grelina com células CHO-GHSR62 e foi adicionada grelina no ponto assinalado com uma seta. A Fig. 3a é um gráfico mostrando, respectivamente, modificações na concentração intracelular de iões de cálcio em células CHO-GHSR62 pela grelina, GHRP-6 e GRF (GHRH). A Fig. b é um gráfico mostrando modificações na concentração intracelular de iões de cálcio em células CHO-GHSR62 pela grelina, na presença

(○) ou na ausência (●) de [D-Lys-3]-GRP-6 e é, também, mostrada uma modificação na concentração intracelular de iões de cálcio por GRF (GHRH) (triângulo preto).

A Fig. 4 mostra as sequências de aminoácidos de precursores da grelina derivada de rato e de humano, assim como o resultado da análise da expressão destes precursores em vários tecidos. A Fig. 4a mostra a comparação entre as sequências de aminoácidos da precursores da grelina derivada de rato e de humano, em que o mesmo aminoácido é sombreado, um péptido sinal é indicado por uma linha tracejada, um local de quebra do péptido sinal é indicado por um triângulo sombreado, um local de quebra no lado do terminal carboxilo é indicado por um triângulo, uma parte grelina amadurecida encontra-se dentro de uma caixa e uma modificação com ácido n-octanóico é indicada por*. A Fig. 4b mostra o resultado da análise da expressão da grelina por transferência de Northern, numa ampla variedade de tecidos de rato.

A Fig. 5 é um gráfico mostrando o efeito da grelina na secreção *in vitro* e *in vivo* das hormonas pituitárias. A Fig. 5a é um gráfico mostrando uma alteração na intensidade de fluorescência por alteração da concentração intracelular de iões de cálcio em células cultivadas da glândula pituitária de rato, numa fase inicial, em que a modificação após a adição da grelina é indicada pela linha sólida e a modificação após a adição da grelina desacilada, é indicada pela linha tracejada. A Fig. 5b é um gráfico mostrando a secreção de hormonas pituitárias, em que a barra preta e a barra branca mostram as concentrações dos níveis de hormona pituitárias, respectivamente, na presença e na ausência da

grelina. A Fig. 5c é um gráfico mostrando a evolução ao longo do tempo da concentração da hormona pituitária no plasma, após ter sido injectada intravenosamente grelina a ratos do sexo masculino. Na Fig. 5b e 5c, GH é hormona do crescimento, ACTH é adrenocorticotropina, FSH é hormona estimulante do folículo, LH é hormona luteinizante, PRL é prolactina e TSH é hormona estimulante da tiróide.

A Fig. 6 mostra a promoção do apetite após administração da grelina no ventrículo, em que é mostrada a quantidade de alimento (média ± erro padrão), durante 2 horas após a administração da grelina. A Fig. 6a mostra que a gama de erro para o efeito da grelina é inferior a 0,0001.

A Fig. 7 mostra o efeito de um fármaco administrado a um rato sob anestesia com uretano, sobre a secreção de ácido gástrico, em que A e B mostram, respectivamente, os resultados da administração da grelina de rato (rGrelina) e histamina. Cada símbolo indica um valor médio de 4 ratos e o erro padrão é mostrado através de uma barra de erro. Foi administrado soro fisiológico como controlo. O fármaco foi administrado no ponto assinalado com uma seta.

A Fig. 8 é um gráfico mostrando a acção da grelina de rato sobre a motilidade do estômago, num rato sob anestesia com uretano. A Fig. 8A mostra as ondas típicas da motilidade do estômago após a administração de soro fisiológico e grelina de rato (rGrelina) e a Fig. B é um gráfico mostrando um valor médio de 4 ratos, juntamente com o erro padrão. O fármaco foi administrado no ponto assinalado com uma seta.

A Fig. 9 é um gráfico mostrando uma curva padrão em radioimunoensaios e reactividade cruzada com o anticorpo. A Fig. 9a é um gráfico mostrando a inibição da ligação de grelina de rato, marcada com ^{125}I , a um anticorpo contra um fragmento do terminal amina da grelina, por várias grelinas e a Fig. 9b é um gráfico mostrando a inibição da ligação da grelina de rato marcada, com ^{125}I , a um anticorpo contra um fragmento do terminal carboxilo da grelina, por várias grelinas. A quantidade das várias grelinas/tubo de reacção é mostrada na abscissa, enquanto que a proporção (%) entre a quantidade (B) da grelina de rato ligada na presença de várias grelinas e a sua quantidade (B_0) na ausência de várias grelinas é mostrada na ordenada. Os símbolos nos gráficos são como se segue: Grelina de rato (○); grelina humana (●); grelina-27 de rato (□); [Ser3(decanoil)]-grelina de rato (◊); [Ser3(hexanoil)]-grelina de rato (Δ); e grelina de rato sem ácido gordo (▼).

Melhor Forma de Realização da Invenção

Para um péptido que funciona como um ligando endógeno para o receptor do GHS (GHS-R), a distribuição do ligando endógeno em órgãos ou tecidos pode ser conhecida pela adição de um extracto de vários órgãos ou tecidos, a células expressando GHS-R e pela medição da concentração intracelular de iões de cálcio.

As células expressando GHS-R incluem estirpes derivadas do hipotálamo e da glândula pituitária, conhecidas por expressarem constantemente GHS-R e os seus tecidos, mas as células são, de um modo preferido, células transformadas tendo um gene do GHS-R

introduzido em células adequadas, tais como células CHO e expressando o gene.

A forte actividade de libertação de Ca do péptido do GHS endógeno da presente invenção foi detectada, não no hipotálamo e na glândula pituitária expressando o péptido, mas num extracto do estômago, como um orgão no sistema de órgãos digestivos. É, consequentemente, necessário examinar não apenas os tecidos e os órgãos expressando o referido receptor mas, também, uma ampla variedade de outros tecidos e órgãos, de forma a encontrar o ligando endógeno pretendido para o receptor órfão.

A concentração intracelular de iões de cálcio pode ser medida através de qualquer método conhecido na técnica, de um modo preferido, através de FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices Co, Ltd.), utilizando a alteração da intensidade da fluorescência do Fluo-4 AM (Molecular Probe Co, Ltd.), causada por uma alteração da concentração de iões de cálcio.

Para obter o péptido do GHS endógeno pretendido, a partir de tecidos e órgãos confirmados como possuidores de actividade de libertação de Ca, pode ser utilizado qualquer método de purificação conhecido na técnica.

Como o método de purificação do péptido, este é eficaz, utilizado individualmente ou em combinação com filtração em gel, permuta iônica e técnicas cromatográficas de fase reversa, após uma ampla variedade de métodos de fraccionamento ou utilizados separadamente, mas é possível utilizar não, apenas, essas técnicas cromatográficas mas, também, qualquer meio eficaz para a purificação do péptido.

Para isolamento e purificação do péptido a partir dos tecidos e órgãos, é desejável a inactivação das proteases nos tecidos e órgãos, pelo seu tratamento térmico em água em ebullição, para prevenir a degradação do péptido pretendido pela acção das proteases. O tratamento térmico e a remoção dos tecidos e órgãos, sob arrefecimento em gelo, são também eficazes para a extracção e purificação do péptido pretendido.

Pode ser utilizado um método conhecido, para confirmar que o péptido purificado tendo a actividade de libertação de Ca tem uma actividade de indução da secreção da GH *in vitro* e *in vivo*.

Por exemplo, a GH segregada num meio de cultura de células da glândula pituitária confirmadas como segregando GH e expressando GHS-R, pode ser medida *in vitro* em radioimunoensaios, pela adição de anticorpo anti-GH às células. A quantidade da referida hormona segregada pode ser, também, medida, pela utilização de um anticorpo contra outra hormona em lugar do anticorpo anti-GH em radioimunoensaios.

Além disso, a actividade de indução da secreção da GH *in vivo* pode ser confirmada pela injecção do péptido tendo a actividade de libertação de Ca, numa veia periférica de um animal e, depois, pela medição da concentração de GH no soro.

Pode ser utilizado um método conhecido, para analisar a estrutura do péptido purificado.

Para determinação da sequência de aminoácidos do péptido, existe um método em que os resíduos de aminoácido são libertados, sequencialmente, a partir do terminal carboxilo, por degradação de Edman, seguida pela identificação dos aminoácidos

libertados por cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC), assim como por uma sua versão automatizada através de um sequenciador de aminoácidos.

Existe, também, um método para determinação da sua sequência de aminoácidos pela medição dos pesos moleculares dos seus fragmentos ionizados por GC-MASS.

Para o péptido contendo aminoácidos modificados, num aspecto da presente invenção, o aminoácido modificado é identificado como "aminoácido desconhecido" após a determinação da sequência de aminoácidos.

Neste caso, o péptido modificado é decomposto em unidades de aminoácido a partir das quais o aminoácido modificado é separado e purificado e a estrutura do aminoácido modificado é determinada de uma forma normal para determinação da estrutura do composto, através da qual pode ser conhecida a estrutura completa do péptido. Alternativamente, existe um método em que o péptido é obtido a partir de um ADNC codificando o péptido modificado, em seguida, é sintetizado quimicamente um péptido tendo a sequência de aminoácidos do péptido, resultante, e o peso molecular e as propriedades físicas do péptido não modificado sintético são comparadas com as do péptido modificado, de forma estimar a estrutura do grupo modificado.

Uma sequência de aminoácidos parcial (sequência nuclear), a qual, no péptido, assim, estruturalmente determinado, é essencial para a actividade de libertação de Ca, é revelada pela medição da actividade de libertação de Ca de cada fragmento peptídico formado, pela quebra do referido péptido com uma protease.

A protease utilizada deverá ser uma protease altamente específica para a sequência de aminoácidos do péptido a ser quebrado, mas pode ser, também, utilizada uma protease de baixa especificidade, sob condições de digestão parcial, para preparar vários fragmentos peptídicos a partir do referido péptido.

Pode ser determinada uma sequência nuclear, essencial para a actividade de libertação de Ca, pela medição da actividade de libertação de Ca de cada fragmento peptídico preparado deste modo.

No péptido indutor da secreção da GH endógena, a 3^a serina do terminal amina foi acilada com um ácido gordo e é, também, possível ser sintetizado, quimicamente, um fragmento peptídico tendo uma parte da sequência de aminoácidos do péptido indutor da secreção da GH endógena, assim como um péptido modificado com um ácido gordo compreendendo um ácido gordo ligado através de uma ligação éster à cadeia lateral da serina no referido fragmento peptídico.

O péptido indutor da secreção da GH endógena pode ser analisado, detalhadamente, utilizando o referido fragmento peptídico. Simultaneamente, o tipo de ácido gordo necessário para a actividade de libertação de Ca pode ser determinado pela comparação dos fragmentos peptídicos modificados com vários ácidos gordos.

Por exemplo, no péptido indutor da secreção da GH endógena derivado de algumas espécies de *Xenopus laevis*, o resíduo de aminoácido na 3^a posição do terminal amina não é serina mas treonina e essa treonina foi acilada com um ácido gordo e este

composto do tipo peptídico pode ser, também, sintetizado e o referido composto pode ser analisado detalhadamente.

Pela comparação das sequências de aminoácidos dos péptidos que têm uma actividade de indução da secreção da GH em vertebrados, pode ser determinada uma região amplamente conservada em vertebrados e, a partir da sequência de aminoácidos da referida região, pode ser determinada uma sequência nuclear, essencial para a actividade de indução da secreção da GH.

É sintetizado quimicamente um ADN tendo uma sequência nucleotídica deduzida a partir da sequência de aminoácidos do péptido indutor da secreção da GH endógena e este ADN é utilizado como uma sonda no rastreio de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de ARNm de células expressando o referido péptido, pelo que, pode ser obtido um ADNc codificando o referido péptido.

No entanto, um codão correspondente a um aminoácido é degenerado, aumentando, deste modo, o número de sequências nucleotídicas deduzidas a partir da sequência de aminoácidos do péptido, de modo que o rastreio, utilizando um determinado ADN sintético consistindo em vários tipos dessas sequências nucleotídicas como uma sonda, pode ser difícil.

Neste caso, se uma sequência de acordo com a sequência de aminoácidos do referido péptido estiver presente em sequências de aminoácidos deduzidas a partir da sequência nucleotídica de uma marcação de sequência expressa (EST) divulgada numa base de dados de sequências, pode ser sintetizado um ADN consistindo

numa parte da sequência nucleotídica do EST e utilizado para rastrear a biblioteca de ADNc acima.

Além disso, pode ser obtido um ADN genómico, de uma forma normal, a partir do ADNc.

A sequência de aminoácidos de um polipéptido precursor do péptido indutor da secreção da GH endógena é revelada a partir da sequência nucleotídica de ADNc, deste modo, obtido.

Pela análise da referida sequência de aminoácidos, são revelados um péptido sinal, o péptido indutor da secreção da GH endógena, outras partes de péptido e os locais de quebra destes péptidos, revelando, deste modo, o mecanismo de formação do péptido indutor da secreção da GH endógena.

Na Divulgação do Pedido Internacional WO 98/42840 são divulgados outros aspectos da presente invenção, ou seja, uma sequência de aminoácidos parcial do péptido indutor da secreção da GH endógena, a sequência de aminoácidos de um polipéptido precursor do referido péptido e a sequência nucleotídica de um ADN codificando o referido polipéptido, mas o péptido aí divulgado é um péptido consistindo em 14 aminoácidos tendo uma actividade semelhante à motilina e não existe aí qualquer descrição da actividade de aumento da concentração de Ca e da actividade de indução da secreção da GH, divulgada na presente invenção.

O composto do tipo peptídico aqui descrito refere-se a um péptido tendo a actividade de aumento da concentração intracelular de iões de cálcio, a qual é representada pela fórmula (2) abaixo, em que, pelo menos, um aminoácido é

substituído por um aminoácido modificado; um seu análogo peptídico, em que, pelo menos, um aminoácido é substituído por um não-aminoácido; e um seu derivado peptídico em que o terminal amina e/ou o terminal carboxilo são modificados.

Como aqui utilizado, o péptido, o análogo do péptido e o derivado peptídico descritos acima são designados, colectivamente, como o composto do tipo peptídico.

No composto do tipo peptídico, vários aminoácidos podem ser substituídos por aminoácidos modificados e/ou não-aminoácidos. Na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2, é preferido, na presente invenção, que, normalmente, um ou mais aminoácidos do 1º ao 10º aminoácidos do terminal amina, de um modo preferido, o 1º ao 4º aminoácidos ou o 1º ao 5º aminoácidos do terminal amina, são substituídos por aminoácidos modificados e/ou não-aminoácidos. É particularmente preferido, que o 1º ao 5º aminoácidos sejam substituídos por aminoácidos modificados e/ou não-aminoácidos.

Na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2, podem ser adicionados ou eliminados um ou mais aminoácidos, para além do 1º ao 4º aminoácidos, de um modo preferido, o 1º ao 6º aminoácidos e, de um modo mais preferido, o 1º ao 10º aminoácidos do terminal amina.

O composto do tipo peptídico aqui descrito é, de um modo preferido, um composto peptídico o qual tem a actividade de aumento da concentração intracelular de iões de cálcio e induz a secreção da hormona do crescimento *in vivo*, em que, pelo menos, um aminoácido é substituído por um aminoácido modificado e/ou um composto não-aminoácido.

Ou seja, o composto do tipo peptídico aqui descrito é um composto do tipo peptídico tendo a actividade de aumento da concentração intracelular de iões de cálcio e/ou a acção de indução da secreção da hormona do crescimento *in vivo*, em que um aminoácido na cadeia peptídica é substituído por um aminoácido modificado e/ou um composto não-aminoácido.

Os exemplos do composto incluem os compostos em que, no péptido apresentado na SEQ ID N°: 1, 2 ou 3, se encontra acilado um grupo hidroxilo do aminoácido Ser 3, os compostos em que, no péptido apresentado na SEQ ID N°: 4 ou 5, se encontra acilado um grupo hidroxilo do 25º aminoácido Ser ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

Outros exemplos incluem os compostos em que no péptido apresentado na SEQ ID N°: 10, 11, 16 ou 17, se encontra acilado um grupo hidroxilo do aminoácido Ser 3 ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

Ainda outros exemplos incluem os compostos em que, no péptido apresentado na SEQ ID N°: 22, 25, 26 ou 27, se encontra acilado um grupo hidroxilo do aminoácido Ser 3 ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

Ainda outros exemplos incluem os compostos em que, no péptido apresentado na SEQ ID N°: 29 ou 30 ou 31, se encontra acilado um grupo hidroxilo do aminoácido Ser 3 ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

Ainda outros exemplos incluem os compostos em que, no péptido apresentado na SEQ ID N°: 28, se encontra acilado um

grupo hidroxilo do aminoácido Thr 3 ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

O grupo acilo introduzido num grupo hidroxilo por acilação na presente invenção é um grupo formado pela remoção de um grupo hidroxilo de, e. g., um ácido carboxílico orgânico, um ácido sulfônico orgânico ou um ácido fosfórico orgânico.

O ácido carboxílico orgânico inclui, e. g., ácidos gordos e o seu número de átomos de carbono é, de um modo preferido, cerca de 2 a 35, de um modo mais preferido, cerca de 6 a 18 e, de um modo muito preferido, cerca de 8 a 16. Esses ácidos gordos incluem, e. g., ácido octanóico (de um modo preferido, ácido caprílico), ácido decanóico (de um modo preferido, ácido cáprico) e ácido dodecanóico (de um modo preferido, ácido laurílico [sic: ácido láurico]), assim como os seus ácidos gordos monoeno ou polieno.

No ácido sulfônico orgânico ou no ácido fosfórico orgânico, o seu número de átomos de carbono é, de um modo preferido, cerca de 2 a 35.

São também aqui descritos quaisquer compostos do tipo peptídico ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, incluindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 1, em que se encontra acilado um grupo hidroxilo da 3^a Ser.

Ou seja, são também aqui descritos quaisquer compostos do tipo peptídico ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, incluindo péptidos modificados com ácidos gordos, em que se encontra acilado um grupo hidroxilo da 3^a Ser, na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 8, de um modo preferido,

na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 1 e, de um modo mais preferido, na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 9.

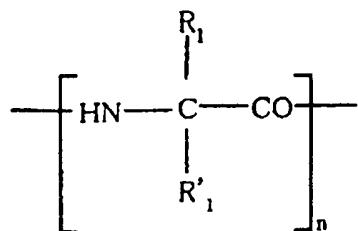
Além disso, é também aqui descrito qualquer composto peptídico ou os sais farmaceuticamente aceitáveis, incluindo péptidos modificados com ácidos gordos, em que se encontra acilado um grupo hidroxilo da Thr 3, na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 8, de um modo preferido, na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 1 e, de um modo mais preferido, uma sequência de aminoácidos em que, na sequência de aminoácidos estabelecida estabelecida na SEQ ID N°: 9, o resíduo de aminoácido serina na 3^a posição a partir do terminal amina é convertido em treonina.

Além disso, é aqui descrito um composto ou os sais farmaceuticamente aceitáveis representados pela fórmula (2):



em que X é uma parte correspondente a um átomo de hidrogénio num grupo amina do aminoácido do terminal amina e representa H ou um alquilo saturado ou não saturado ou um grupo acilo contendo um ou mais átomos de carbono; Y é uma parte correspondente a um grupo hidroxilo num grupo carboxilo α do aminoácido do terminal carboxilo e representa OH, OZ ou NR₆R₇, no qual Z é um catião farmaceuticamente aceitável ou um grupo alquilo inferior linear ou ramificado; e R₆ e R₇ podem ser iguais ou diferentes e representam H ou um grupo alquilo inferior linear ou ramificado.

Aqui, AA1 representa:

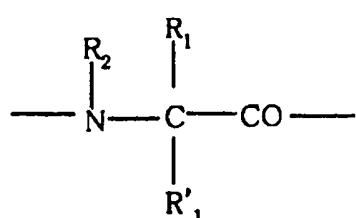


em que n é 1 ou 2, R₁ e R₁' podem ser iguais ou diferentes e representarem hidrogénio ou um grupo substituinte, desde que, quando n é 2, os dois grupos substituintes R₁ possam ser iguais ou diferentes; isto aplica-se, também, a R₁'.

Os exemplos do grupo substituinte incluem (1) uma cadeia alquilo saturada ou não saturada, contendo um ou mais átomos de carbono, os quais se ligam num modo da ligação seleccionado do grupo consistindo em éster, éter, tioéster, tioéter, amida e carbamida, através ou não de uma cadeia alquilo contendo um ou mais átomos de carbono, (2) H ou uma cadeia alquilo saturada ou não saturada, contendo um ou mais átomos de carbono e (3) uma cadeia lateral do aminoácido natural.

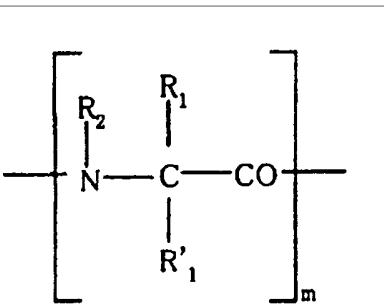
Além disso, o grupo substituinte pode ser uma cadeia alquilo saturada ou não saturada, contendo um ou mais átomos de carbono, a qual é ligada através de uma ligação persulfureto ou tiocarbamida, através ou não de uma cadeia alquilo contendo um ou mais átomos de carbono.

AA2 representa:



em que R_1 e R_1' têm os mesmos significados, como definido acima e R_2 representa H ou um grupo alquilo saturado ou não saturado contendo 1 a 6 átomos de carbono ou AA2 representa $-\text{CH}_2-\text{CH}(R_1)-\text{CH}_2-$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}(R_1)-\text{CO}-$, no qual R_1 tem o mesmo significado como definido acima.

AA3 representa:



em que m é um número inteiro de 1 ou mais e R_1 , R_1' e R_2 têm os mesmos significados, como definido acima, contanto que, quando m é um número inteiro de 2 ou mais, os dois grupos substituintes R_1 possam ser iguais ou diferentes; isto aplica-se, também, a R_1' e R_2 .

O alquilo saturado ou não saturado contendo um ou mais átomos de carbono, que é representado por X, é, de um modo preferido, alquilo C_{1-20} , tais como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, n-heptilo, n-hexilo, n-decilo, vinilo, propanilo ou hexenilo.

O acilo representado por X, inclui o acilo de ácido carboxílico C_{1-10} , tais como formilo, acetilo, propionilo ou benzoílo ou acilo de ácido sulfônico C_{7-13} , tais como benzenossulfonilo, naftaleno, sulfonilo ou semelhantes.

O grupo representado por R_1 ou R_1' é, de um modo preferido, um grupo representado por, e. g., a fórmula (2):



(em que n é um número inteiro de 0 a 10, P é $-\text{CO-O-}$, $-\text{O-CO-}$, $-\text{O-}$, $-\text{CO-S-}$, $-\text{CS-S-}$, $-\text{S-CO-}$, $-\text{S-}$, $-\text{CO-NH-}$, $-\text{NH-CO-}$ ou $-\text{CO-NH-CO-}$, Q é H ou alquilo C_{1-20} , representado por X, descrito acima). Além disso, P pode ser, também, $-\text{CO-}$.

Além disso, P pode ser $-\text{S-S-}$ ou $-\text{NH-CS-}$. Em cada $-\text{NH-}$ -descrito acima, H pode ser substituído por um grupo alquilo C_{1-35} saturado ou não saturado, um grupo arilo C_{6-20} ou um grupo aralquilo C_{7-13} .

De um modo mais preferido, P é:

$-\text{CO-O-}$, $-\text{CO-}$, $-\text{O-}$, $-\text{S-}$, $-\text{S-S-}$, $-\text{CO-S-}$, $-\text{CO-NH-}$, $-\text{NH-CO-}$ ou $-\text{NH-CS-}$.

O grupo representado por R_1 ou R_1' pode ser um grupo tendo Q ligado directamente a $-(\text{CH}_2)_n$, não através de P .

É preferido, que o grupo alquilo inferior representado por Z, R6 ou R7 seja alquilo C_{1-6} , tais como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, i-butilo, n-pentil ou n-hexilo.

Depois, são descritos compostos peptídicos. (1) Exemplos preferidos de AA1: (A) aminoácidos ou péptidos, tais como Ser, Gly-Ser ou $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CO-}$, em que uma parte de ligação peptídica entre dois resíduos de aminoácido é $-(\text{CH}_2)_2-$ e (B)

aminas primárias, por exemplo, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2-$, em que uma parte de ligação peptídica entre dois aminoácidos é $-(\text{CH}_2)_2-$; $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{R}_1)\text{CH}_2-$, em que uma parte de ligação peptídica entre dois aminoácidos é $-(\text{CH}_2)_2-$, em que R_1 tem os mesmos significados, como definido acima; e $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2-$.

Como (A) aminoácidos ou péptidos, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4\text{-COOH}$, $\text{NH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{-COOH}$ e $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-COOH}$ podem ser, também, exemplificados.

(2) Exemplos preferidos de AA2: (A) aminoácidos, tais como Ser, homoSer, Cys, homoCys, Asp, Glu, Lys, Ala, Val, Leu, homoLeu, Ile, homoIle, ornitina, ácido aminoadípico, metionina, etionina, butionina e S-metilcisteína, entre os quais a Ser é, particularmente, preferida e (B) estruturas para além de resíduos de aminoácido; por exemplo, podem ser referidas $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}_1)\text{-CO-}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}_1)\text{-CH}_2-$, etc., em que R_1 tem os mesmos significados, como definido acima.

Em particular, são preferidos os aminoácidos (a) com uma cadeia lateral hidrofóbica, tais como leucina, valina, norleucina, homoleucina, homoisoleucina, naftilalanina ou os seus análogos, triptofano, fenilalanina, ciclo-hexilalanina, etc. ou os seus N-metilaminoácidos. Além disso, são preferidos os aminoácidos (b) com uma cadeia lateral tendo um grupo funcional com capacidade de modificação com um grupo acilo, grupo alquilo, grupo alquenilo ou grupo aralquilo, tais como serina, homoserina, treonina, cisteína, homocisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, ácido adípico, lisina, ornitina, etc. e os seus N-metilaminoácidos. Um grupo acilo, grupo alquilo, grupo alquenilo ou grupo aralquilo, etc., estão ligados a cadeias laterais dos aminoácidos (b) através de uma ligação

éster, amida, persulfureto, éter, tioéter, tioéster, carbamida ou tiocarbamida. Além disso, podem ser ligados um grupo alquilo ou aralquilo ao carbono α do aminoácido.

(3) Exemplos preferidos de AA3: Aminoácidos ou péptidos, tais como Phe ou um péptido tendo uma sequência de aminoácidos da 4^a Phe à 28^a Arg do terminal amina, na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2 ou 3 ou péptidos tendo uma sequência de aminoácidos, em que, na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2 ou 3, um aminoácido é eliminado sequencialmente, iniciando no aminoácido do terminal carboxilo até à 5^a Leu do terminal amina. Por exemplo, AA3 inclui:

Phe Leu,

Phe Leu Ser,

Phe Leu Ser Pro,

Phe Leu Ser Pro Glu,

Phe Leu Ser Pro Glu His,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala Lys,

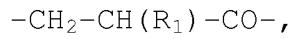
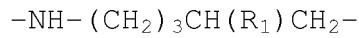
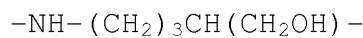
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln,

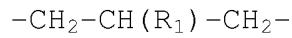
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro e

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg.

Obviamente, os aminoácidos exemplificados como AA3 podem ser L-aminoácidos ou D-aminoácidos. Além disso, um a vários aminoácidos (de um modo preferido, até cerca de 1/3 da sequência de aminoácidos), nas sequências de aminoácidos exemplificadas como AA3, podem ser substituídos por unidades de aminoácido não naturais ou unidades de não-aminoácido, por exemplo:



ou



em que R_1 tem os mesmos significados, como definido acima. Quando AA3 contém vários grupos representados pelas fórmulas acima e vários grupos representados por R_1 , estes grupos são iguais ou diferentes.

Além disso, qualquer aminoácido exemplificado como AA3 pode ter grupos substituintes representados por R₁, descritos acima. Quando estão presentes vários grupos R₁ num grupo representado por AA3, estes grupos R₁ podem ser iguais ou diferentes.

São apresentados abaixo exemplos preferidos dessas cadeias laterais, quando os aminoácidos que constituem o péptido têm um grupo hidroxilo, grupo mercapto, grupo imina ou grupo amina nas suas cadeias laterais. Nos exemplos seguintes, R8 é um grupo alquilo saturado ou não saturado contendo um ou mais átomos de carbono. Essa cadeia alquilo pode ter os mesmos significados, como definido para a cadeia alquilo descrita acima representada por X.

- A) Cadeia lateral de Ser; -CH₂-O-CO-R8 ou -CH₂-O-R8,
- B) Cadeia lateral de homoSer; -CH₂-CH₂-O-CO-R8 ou -CH₂-CH₂-O-R8,
- C) Cadeia lateral de Cys; -CH₂-S-CO-R8 ou -CH₂-S-R8,
- D) Cadeia lateral de homoCys; -CH₂-CH₂-S-CO-R8 ou -CH₂-CH₂-S-R8,
- E) Cadeia lateral de Asp; -CH₂-COO-R8 ou -CH₂-CO-NH-R8,
- F) Cadeia lateral de Glu; -CH₂-CH₂-COO-R8 ou -CH₂-CH₂-CO-NH-R8
- G) Cadeia lateral de Lys; -(CH₂)₄-NH-CO-R8,
- H) Cadeia lateral do ácido aminoadípico; -CH₂-CH₂-CH₂-COO-R8 ou CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH-R8,

I) Cadeia lateral da ornitina; $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{R}8$.

J) Uma cadeia lateral alquilo num aminoácido, tais como Ala, Val, Leu, homoleucina, Ile, homoisoleucina, S-metilcisteína, metionina, etionina ou butionina pode ser um grupo alquilo modificado mostrado na fórmula (2), como descrito acima.

Além disso, é aqui descrito um agente para aumentar a concentração intracelular de iões de cálcio ou um agente para induzir a secreção da GH, compreendendo um péptido parcial consistindo em aminoácidos do terminal amina até ao 13º, 14º ou 15º aminoácidos na sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2 ou 3 como definido nas reivindicações. Neste caso, não é sempre necessário que as respectivas unidades de aminoácido constituindo o péptido parcial sejam quimicamente modificadas.

É além disso, aqui descrito o seguinte composto do tipo peptídico.

Um derivado da grelina, refere-se a um composto do tipo peptídico, em que a estrutura química da grelina natural é parcialmente modificada e, grelina de cadeia curta, refere-se a um péptido consistindo em menos de 27 ou 28 aminoácidos, o qual é derivado da grelina natural com 27 a 28 aminoácidos, pela eliminação de alguns aminoácidos. Além disso, um resíduo de aminoácido na posição n, refere-se a um resíduo de aminoácido na posição n em relação ao terminal amina.

O aminoácido do terminal amina da grelina ou do seu derivado grelina de cadeia curta pode ser qualquer aminoácido (o aminoácido do terminal amina da grelina natural é a glicina) desde que o grupo α -amina do referido aminoácido não esteja protegido ou possa ser um D- ou L-aminoácido, mas é, de um modo preferido, alanina, valina, ácido aminoisobutanóico ou ácido butanóico.

O 2º resíduo pode ser qualquer aminoácido (e. g. serina na grelina natural), de um modo preferido, um aminoácido tendo uma cadeia lateral pequena, tais como alanina, serina, histidina, norvalina ou um composto não-aminoácido.

O 1º e 2º resíduos podem ser um δ -aminoácido correspondendo a dois aminoácidos, por exemplo, ácido 5-aminopentanóico, ácido 5-amino-5-dimetilpentanóico, ácido 2,5-diaminopentanóico, etc., exemplificados nos Exemplos.

Os resíduos de aminoácido seleccionados na 3ª e 4ª posições podem ser D- ou L-aminoácidos, D- ou L-N-metilaminoácidos ou uma combinação destes aminoácidos. Em particular, é preferido, que o aminoácido na 3ª posição seja um L-aminoácido ou os aminoácidos, na 3ª e na 4ª posição, sejam L-aminoácidos.

A configuração estérica dos resíduos de aminoácido seleccionados na 3ª e 4ª posições pode ser apropriadamente seleccionada, dependendo da sequência de aminoácidos na 1ª e 2ª posições. Ou seja, ambos os resíduos da 3ª e 4ª posições são, de um modo preferido, L-aminoácidos, no caso da sequência de aminoácidos Gly-Ser na 1ª e 2ª posições da grelina natural, enquanto que ambos os resíduos da 3ª e 4ª posições podem ser D-aminoácidos, no caso de outra sequência de aminoácidos, tal como Aib-His. Além disso, se os resíduos na 1ª e 2ª posições são

um δ-aminoácido (e. g., ácido aminopentanóico) tendo um comprimento de 2 aminoácidos, os resíduos na 3^a e 4^a posições podem ser L- ou D-aminoácidos.

Os resíduos de aminoácido seleccionados na 3^a e 4^a posições são, de um modo preferido, D- ou L-aminoácidos, tais como leucina, valina, norleucina, homoleucina, homoisoleucina, naftilalanina e seus homólogos, triptofano, fenilalanina e ciclo-hexilalanina ou seus D- ou L-N-metilaminoácidos .

Os resíduos de aminoácido seleccionados na 3^a e 4^a posições são, de um modo mais preferido, aminoácidos hidrofóbicos aromáticos, tais como naftilalanina e os seus homólogos, triptofano, fenilalanina e ciclo-hexil alanina, de entre os aminoácidos hidrofóbicos descritos acima.

Além disso, os resíduos de aminoácido seleccionados na 3^a e 4^a posições são, de um modo preferido, aminoácidos básicos, tais como lisina, arginina e histidina. É, especialmente, preferida lisina.

A molécula grelina deve ser básica devido a estes aminoácidos básicos melhorando, deste modo, adicionalmente, a actividade de libertação de Ca.

Os resíduos de aminoácido seleccionados na 3^a e 4^a posições são, de um modo preferido, os que têm grupos funcionais nas suas cadeias laterais, os quais podem ser modificados com um grupo acilo (grupo alcanilo, grupo alcenonilo ou grupo arilalcanilo), um grupo alquilo ou um grupo aralquilo e os exemplos preferidos desses resíduos de aminoácidos incluem serina, homoserina,

treonina, cisteína, homocisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, ácido adípico, lisina, ornitina, etc.

Os aminoácidos tendo estas cadeias laterais reactivas podem ser D- ou L-aminoácidos ou os seus D- ou L-N-metilaminoácidos correspondentes, mas é, particularmente, preferido, que o resíduo da 3^a posição seja um L-aminoácido ou que ambos os resíduos da 3^a e 4^a posições sejam L-aminoácidos.

Além disso, a cadeias laterais destes aminoácidos podem estar ligadas a um grupo acilo, tais como grupo alcanilo (o seu número de átomos de carbono é de 2 a 35, de um modo preferido, 6 a 18, de um modo mais preferido, 8 a 12), um grupo alcenonilo (o seu número de átomos de carbono é de 2 a 35, de um modo preferido, 6 a 18, de um modo mais preferido, 8 a 12), um grupo arilalcanilo (grupo benzoílo, fenacetilo, fenilbutirilo, naftoílo, naftilacetilo ou naftilpropionilo, etc.), um grupo alquilo (o seu número de átomos de carbono é de 2 a 35, de um modo preferido, 6 a 18, de um modo mais preferido, 8 a 12) ou um grupo aralquilo (grupo benzilo, fenetilo, fenilpropilo, fenilbutilo, fenilpentilo, naftilmetyl, etc.), através de uma ligação carbamato, tiocarbamato, éster, amida, persulfureto, éter, tioéter ou tioéster. Além disso, o alquilo e os grupos aralquilo anteriormente referidos podem ser ligados, sem ser através da ligação aos átomos de carbono α dos aminoácidos na 3^a e 4^a posições.

A combinação dos resíduos de aminoácido seleccionados na 3^a e 4^a posições é, de um modo preferido, uma combinação de um aminoácido tendo uma cadeia lateral hidrofóbica, como o resíduo de aminoácido da 3^a posição e um aminoácido hidrofóbico, como o resíduo de aminoácido da 4^a posição.

O resíduo de aminoácido da 3^a posição, tendo uma cadeia lateral hidrofóbica é, de um modo preferido, um aminoácido modificado no carbono α , no qual (a) foi introduzida uma cadeia alquilo saturada ou não saturada, contendo um ou mais átomos de carbono, através ou não de um grupo alquíleno, contendo um ou mais átomos de carbono e através de uma ligação éster, éter, tioéter, amida ou persulfureto ou (b) foi introduzida uma cadeia alquilo saturada ou não saturada, contendo um ou mais átomos de carbono. Em particular, é mais preferido, um aminoácido modificado, em cujo carbono α foi introduzida uma cadeia alquilo saturada, contendo um ou mais átomos de carbono.

O grupo carboxilo do aminoácido na 4^a posição pode ser uma amida, uma alquilamida (e. g., metilamida ou etilamida) ou uma aralquilamida (e. g., benzilamida, adamantanamida ou adamantananalquilamida).

Além disso, pode ser ligado um grupo básico, tal como um grupo amina ou um grupo guanidida, à alquil ou aralquilamida. O grupo básico inclui, e. g., $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$, e $-\text{CONHCH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$.

Pode ser adicionado um aminoácido básico, tais como arginina, lisina e histidina, ao grupo carboxilo do aminoácido na 4^a posição e este aminoácido básico pode ser um D- ou L-aminoácido, um racemato ou D- ou L-N-metilaminoácido.

O grupo carboxilo do aminoácido pode ser uma alquil ou aralquilamida, como descrito acima. Além disso, pode ser adicionado um grupo básico, tais como um grupo amina ou um grupo

guanidida à alquil ou aralquilamida. O grupo básico inclui os exemplificados acima.

Como uma sequência de aminoácidos do aminoácido na 5^a posição e aminoácidos subsequentes, pode ser adicionada, ao aminoácido na 4^a posição, uma sequência de qualquer comprimento, consistindo em leucina na 5^a posição e aminoácidos subsequentes, até o aminoácido na 28^a posição da grelina humana ou de rato.

Essas sequências de aminoácidos são, de um modo preferido, grelina (1-5), grelina (1-6), grelina (1-7), grelina (1-8), grelina (1-9), grelina (1-10) e grelina (1-11), em que grelina (m-n) se refere a um péptido tendo uma sequência de aminoácidos nas posições m a n a partir do terminal amina da grelina. Em particular, é preferida a grelina (1-5).

O seu terminal carboxilo é, de um modo preferido, uma alquil ou aralquilamida, como descrito acima.

Além disso, pode ser ligado um grupo básico, tais como um grupo amina ou um grupo guanidida à alquil ou aralquilamida. O grupo básico inclui os exemplificados acima.

Além disso, pode ser adicionado um aminoácido básico, tais como arginina, lisina e histidina, ao aminoácido do terminal carboxilo de um derivado de grelina eliminado no terminal carboxilo, em que foi adicionada uma sequência de aminoácidos de qualquer comprimento, consistindo nos aminoácidos do aminoácido na 5^a posição até ao aminoácido na 28^a posição, ao terminal carboxilo da grelina (1-4).

Este aminoácido básico pode ser um D- ou L-aminoácido, um racemato ou D- ou L-N-metilaminoácido.

O grupo carboxilo do aminoácido básico pode ser uma alquil ou aralquilamida, como descrito acima. Além disso, pode ser ligado um grupo básico, tais como grupo amina ou grupo guanidida, à alquil ou aralquilamida. O grupo básico inclui os exemplificados acima.

O aminoácido do terminal carboxilo da grelina (1-5), grelina (1-6) e grelina (1-7) pode ser um D- ou L-aminoácido ou o seu D- ou L-N-metilaminoácido correspondente.

Além disso, podem ser adicionados aminoácidos, básicos, tais como arginina, lisina e histidina, a resíduos na 5^a, 6^a e 7^a posição e estes aminoácidos básicos podem ser D- ou L-aminoácidos, racematos ou D- ou L-N-metilaminoácidos.

O grupo carboxilo desse aminoácido básico pode ser uma alquil ou aralquilamida, como descrito acima. Além disso, pode ser ligado um grupo básico, tais como grupo amina ou grupo guanidida, à alquil ou aralquilamida. O grupo básico inclui os exemplificados acima.

Numa forma de realização preferida aqui descrita, no caso em que o terminal carboxilo é uma alquil ou aralquilamida, como descrito acima, o composto peptídico da presente invenção pode ser um derivado amida em que é, adicionalmente, ligado um grupo amina ao grupo alquilo ou aralquilo. Especificamente, pode ser referido um composto peptídico em que o terminal carboxilo é, e. g., aminoetilamida.

O composto do tipo peptídico aqui descrito em que o terminal carboxilo é uma amida ou um derivado de amida, como descrito acima, é um composto útil, devido à sua resistência à decomposição por enzimas, tais como carboxipeptidases *in vivo*.

De um modo semelhante o composto do tipo peptídico da presente invenção, incluindo o N-metilaminoácido é, também, um composto útil, devido à sua resistência a enzimas.

O composto do tipo peptídico aqui descrito pode ser obtido sob uma forma normal. Por exemplo, este pode ser isolado a partir de uma fonte natural, como acima ou produzido por tecnologia de ADN recombinante e/ou síntese química. Além disso, quando é necessária uma modificação (e. g., acilação) dos resíduos de aminoácido, o composto peptídico pode ser submetido a uma reacção de modificação, por métodos bem conhecidos na técnica.

Especificamente, o composto do tipo peptídico aqui descrito pode ser obtido por cultura de células hospedeiras, transformadas com um vector de expressão contendo um ADN codificando o péptido aqui descrito e, depois, recuperando o péptido pretendido a partir da cultura.

Pode ser obtido um composto, tendo o péptido pretendido modificado por, e. g., acilação nas células, por selecção das células hospedeiras. Quando o referido péptido não é modificado, pode ser realizada uma reacção de modificação, tal como, acilação, de acordo com o necessário, através de métodos bem conhecidos na técnica. Na reacção de acilação, podem ser, também, utilizadas enzimas, tal como lipase.

O vector no qual o gene deverá ser integrado inclui, e.g., vectores de *E. coli* (pBR322, pUC18, pUC19, etc.), vectores de *Bacillus subtilis* (pUB110, pTP5, pC194, etc.), vectores de levedura (tipo YEp, tipo YRp, tipo YIp) ou vectores de células animais (retrovírus, vírus vaccinia, etc.), mas podem ser, também, utilizados quaisquer outros vectores com capacidade de manter o gene pretendido de forma estável, em células hospedeiras. O vector é introduzido em células hospedeiras adequadas. Para integrar o gene pretendido num plasmídeo e introduzir o plasmídeo em células hospedeiras, podem ser utilizados métodos descritos em *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989).

Para expressar o gene do péptido pretendido no plasmídeo acima, é ligado operativamente um promotor, a montante do referido gene.

O promotor utilizado aqui utilizado pode ser qualquer promotor adequado, compatível com células hospedeiras utilizadas para a expressão do gene pretendido. Por exemplo, pode ser utilizado o promotor lac, promotor trp, promotor lpp, promotor λPL, promotor recA, etc., no género *Escherichia*, como células hospedeiras a serem transformadas; pode ser utilizado o promotor SP01, promotor SP02, etc., no género *Bacillus*; pode ser utilizado o promotor GAP, promotor PH05, promotor ADH, etc., em leveduras; e pode ser utilizado o promotor derivado de SV40, promotor derivado de retrovírus, etc., em células animais.

O vector contendo o gene pretendido, obtido nesta forma, é utilizado para transformar células hospedeiras. As células hospedeiras incluem microrganismos (por exemplo, o género *Escherichia*, o género *Bacillus*, etc.), leveduras (o género

Saccharomyces, o género *Pichia*, o género *Candida*, etc.), células animais (células CHO, células COS, etc.), etc. O meio de cultura é, de um modo preferido, um meio líquido e, de um modo particularmente preferido, o meio contém uma fonte de carbono, uma fonte de azoto, etc. necessárias para o crescimento das células transformadas a serem cultivadas. Se pretendido, podem ser adicionados vitaminas, promotores de crescimento, soro, etc.

Para produção directa do péptido modificado com um ácido gordo, as células são, de um modo preferido, as que têm a actividade de uma protease de processamento, com capacidade para cortar um local adequado num polipéptido precursor do referido péptido e a actividade de acilação do resíduo de serina no referido péptido. As células hospedeiras tendo essa actividade de processamento de protease e actividade de acilação da serina podem ser obtidas, pela transformação de células hospedeiras com um vector de expressão contendo um ADNC codificando o referido polipéptido precursor e, depois, pela selecção das células transformadas, pela confirmação de se estas produzem o péptido modificado com um ácido gordo, tendo uma actividade de libertação de Ca ou uma actividade de indução da secreção da GH.

Após a cultura, o péptido aqui descrito é separado e purificado a partir da cultura, de uma forma normal. Para a extração do produto pretendido a partir dos microrganismos ou células cultivados, por exemplo, os microrganismos ou células após a cultura são recolhidos e suspensos num tampão contendo uma desnaturante de proteínas (e. g. cloridrato de guanidina) e os microrganismos ou as células são rebentados por sonicação, etc. e, depois, são centrifugadas. Para purificar o produto pretendido a partir do sobrenadante, podem ser apropriadamente combinados métodos de separação e purificação, tais como

filtração em gel, ultrafiltração, diálise, SDS-PAGE, várias técnicas cromatográficas, tendo em consideração o peso molecular, solubilidade, carga (ponto isoeléctrico), afinidade, etc., do produto pretendido.

O composto peptídico aqui descrito pode ser sintetizado quimicamente de uma forma habitual. Por exemplo, aminoácidos tendo grupos protectores são condensados por um método em fase líquida e/ou um método em fase sólida, de forma a estender uma cadeia peptídica, depois, todos os grupos protectores são daí removidos, utilizando um ácido e o produto bruto, resultante, é purificado pelas técnicas de purificação acima, para originar o composto peptídico pretendido. Um resíduo de aminoácido pode ser selectivamente acilado, no local pretendido, por uma acilase ou aciltransferase.

Encontram-se bem estabelecidos vários métodos para a produção de péptidos e o composto do tipo peptídico aqui descrito pode ser, também, facilmente produzido por esses métodos conhecidos. Por exemplo, o composto do tipo peptídico pode ser sintetizado pelo método clássico de síntese peptídica ou pelo método em fase sólida.

Depois, é descrito um processo de produção do composto peptídico aqui descrito, através de uma combinação de tecnologia de ADN recombinante e síntese química, por referência a exemplos.

Os ésteres activos de péptidos do terminal amina, por exemplo,

(1) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Osu,

(2) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Osu

(3) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-Osu,

são sintetizados

quimicamente e são, depois, ligados a péptidos do terminal carboxilo, produzidos por tecnologia de ADN recombinante ou seja, respectivamente, (4) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR, (5) LSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR e (6) SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR; ou seja, (1) é ligado a (4), (2) a (5) e (3) a (6), pelo que, são obtidos compostos peptídicos, cada consistindo respectivamente, em 28 aminoácidos. Especificamente, XXXXZSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR é expresso em *E. coli* seguido pela protecção dos seus grupos amina com Boc₂(O) para originar Boc-XXXXZSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR. Depois, o péptido, resultante, é convertido em NH₂-SPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR, por quebra com uma enzima selectiva para o terminal carboxilo do aminoácido Z. Este composto é misturado com Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-Osu numa solução aquosa entre neutra e alcalina débil e o BocGlySer(Bu)Ser(R10)FLSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR, resultante, é tratado com ácido trifluoroacético, pelo que, o produto pretendido pode ser obtido.

A notação acima de aminoácidos de uma letra está de acordo com uma descrição em *Cellular Molecular Biology*, 3^a edição publicada a 10 de Dezembro de 1997 por Newton Press Co, Ltd.

Além disso, Boc representa t-butiloxicarbonilo, Osu representa um resíduo derivado de N-hidroxissuccinimida, pela eliminação de hidrogénio do seu grupo hidroxilo, Bu representa um grupo butilo e R10 representa o grupo substituinte do aminoácido, modificado de acordo com a presente invenção.

Os sais do composto do tipo peptídico aqui descrito são, de um modo preferido, sais farmaceuticamente aceitáveis, incluindo, por exemplo, sais com bases inorgânicas, sais com bases orgânicas, sais com ácidos inorgânicos, sais com ácidos orgânicos e sais com aminoácidos básicos ou acídicos.

Os exemplos preferidos dos sais com bases inorgânicas, incluem sais de metais alcalinos, tais como sais de sódio, sais de potássio, etc.; sais de metais alcalino-terrosos, tais como sais de cálcio, sais de magnésio, etc.; e sais de alumínio, sais de amónio, etc.

Os exemplos preferidos dos sais com bases orgânicas incluem sais com trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, diciclo-hexilamina, N,N'-dibenziletlenodiamina, etc.

Os exemplos preferidos dos sais com ácidos inorgânicos incluem sais com ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc.

Os exemplos preferidos dos sais com ácidos orgânicos incluem sais com ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido mállico, ácido metanossulfônico, ácido benzenossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, etc.

Os exemplos preferidos dos sais com aminoácidos básicos incluem sais com arginina, lisina, ornitina, etc. e os exemplos adequados dos sais com aminoácidos acídicos, incluem sais com o ácido aspártico, ácido glutâmico, etc.

Entre estes sais, os sais de sódio e os sais de potássio são os mais preferidos.

O composto do tipo peptídico aqui descrito ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, tem baixa toxicidade e tem uma acção indutora da secreção da GH e estes podem ser administrados como tal ou após misturados com veículos, excipientes, veículos intensificadores, etc., conhecidos, farmaceuticamente aceitáveis, a um mamífero (por exemplo, humano, murganho, rato, coelho, cão, gato, bovino, cavalo, porco, macaco, etc.). No caso da injecção intravenosa num adulto, a dose diária é de 0,01 a 5 mg/kg, de um modo preferido, 0,04 a 1,5 mg/kg. Esta dose é, desejavelmente, administrada uma vez a três vezes cada dia. O composto do tipo peptídico aqui descrito é combinado com veículos farmaceuticamente aceitáveis e pode ser oral ou parentérico, sob a forma de preparações farmacêuticas sólidas, tais como comprimidos, cápsulas, grânulos, pós, etc. ou como preparações farmacêuticas líquidas, tais como xaropes, injecções, etc.

Os veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem uma ampla variedade de veículos orgânicos ou inorgânicos que são, normalmente, utilizados como materiais farmacêuticos e estes são combinados como veículos, lubrificantes, ligantes, desintegrantes, em preparações farmacêuticas sólidas ou como solventes, adjuvantes, agentes suspensores, agentes que conferem isotonicidade, tampões e agentes suavizantes, em preparações farmacêuticas líquidas.

De acordo com a necessidade, podem ser, também, utilizados aditivos farmacêuticos, tais como conservantes, antioxidantes, agentes corantes, adoçantes, etc.

Os exemplos preferidos dos veículos incluem, e.g., lactose, açúcar branco, D-manitol, amido, celulose cristalina, ácido silícico leve anidro, etc. Os exemplos preferidos dos lubrificantes incluem estearato de magnésio, estearato de cálcio, talco, sílica coloidal, etc.

Os exemplos preferidos dos ligantes incluem celulose cristalina, açúcar branco, D-manitol, dextrina, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetylcelulose, polivinilpirrolidona, etc.

Os exemplos preferidos dos disintegrantes incluem amido, carboximetilcelulose, carboximetilcelulose de cálcio, croscalcumelose de sódio, carboximetilamido de sódio, etc.

Os exemplos preferidos dos solventes incluem água para injecção, álcool, propilenoglicol, macrogol, óleo de sésamo, óleo de milho, etc.

Os exemplos preferidos dos solubilizantes incluem polietilenoglicol, propilenoglicol, D-manitol, benzoato de benzilo, etanol, trisaminometano, colesterol, trietanolamina, carbonato de sódio, citrato de sódio, etc.

Os exemplos preferidos dos agentes de suspensão incluem tensioactivos, tais como estearil trietanolamina, laurilsulfato de sódio, ácido laurilaminopropiónico, lecitina, cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio e monoestearato de glicerina

e polímero hidrofílicos, tais como polivinilálcool, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose, hidroximetilcelulose, hidroxietilcelulose e hidroxipropilcelulose.

Os exemplos preferidos dos agentes que conferem isotonicidade incluem cloreto de sódio, glicerina, D-manitol, etc.

Os exemplos preferidos dos tampões incluem soluções tampão, tais como fosfatos, acetatos, carbonatos, citratos, etc.

Os exemplos preferidos dos agentes suavizantes incluem álcool benzílico, etc.

Os exemplos preferidos dos conservantes incluem p-oxiesterbenzoatos, clorobutanol, álcool benzílico, álcool fenetílico, ácido desidroacético, ácido sórbico, etc.

Os exemplos preferidos dos antioxidantes incluem sulfitos, ácido ascórbico, etc.

A composição farmacêutica acima proporciona um efeito igual ou mais elevado do que o efeito da GH, após administração e pode reduzir vários efeitos secundários causados pela administração da GH.

Como doenças atribuíveis à deficiência ou diminuição da GH, doenças às quais pode ser aplicada a composição farmacêutica ou os efeitos da composição farmacêutica, incluem, mas não estão limitadas a activação dos osteoblastos e reconstituição óssea em pessoas com nanismo e humanos normais, aumento de força muscular

e da quantidade muscular em adultos deficientes em GH, melhoria de motilidade em adultos deficientes em GH, tratamento queimaduras graves em crianças, sua utilização combinada com gonadotrofinas na indução da ovulação, prevenção de anomalias no metabolismo das proteínas pela administração de prednisona, promoção da "educação" das células T em distúrbios imunitários graves, o efeito de inibição da redução do peso corporal dos idosos e o efeito de aumento de tecidos gordos adiposos e prevenção da atrofia dérmica

Além disso, as doenças ou efeitos não directamente correlacionados com deficiência ou diminuição da GH incluem, e.g., o efeito de aumento do fluxo pulsátil, como mostrado no Exemplo 7 e, deste modo, este é eficaz no tratamento de doenças cardíacas, tal como insuficiência cardíaca, etc.

O efeito da composição farmacêutica não está limitado a humanos. Ou seja, este tem um efeito na promoção do crescimento em animais, na redução de gordura na carne, etc., que é igual ou superior à da GH administrada.

Por exemplo, como mostrado no Exemplo 13, a composição farmacêutica da presente invenção apresenta uma acção promotora do apetite após administração ventricular ou administração intravenosa, consequentemente, esta pode ser utilizada como um promotor do apetite, no tratamento da anorexia ou sitofobia.

Além disso, como mostrado no Exemplo 14, a composição farmacêutica aqui descrita tem uma acção promotora da motilidade e da secreção de ácidos gástricos do estômago e, consequentemente, pode ser, também, utilizada como um agente no tratamento doenças funcionais do estômago, tais como dispepsia

não-diabrotica, atonia gástrica leve súbita, dispepsia funcional e refluxo esofágico.

Além disso, como mostrado por exemplo no Exemplo 15, a composição farmacêutica aqui descrita apresenta uma acção de promoção do crescimento celular na medula óssea, duodeno e jejuno, por administração intravenosa e, deste modo, pode ser utilizada como um agente de protecção da túnica mucosa do intestino delgado, um agente para a prevenção de lesões da túnica mucosa no intestino delgado, durante a nutrição intravenosa e um agente para o tratamento da osteoporose.

Além disso, a composição farmacêutica descrita acima tem um efeito no tratamento das doenças ou para melhorar as patologias físicas descritas abaixo.

Por exemplo, pode ser utilizada no tratamento estimulante, para a libertação de hormonas do crescimento em idosos, na prevenção de efeitos secundários catabólico de corticóides açúcares, prevenção e tratamento da osteoporose, estímulo do sistema imunitário, promoção do tratamento de danos, promoção da reparação de ossos partidos, tratamento do atraso no crescimento, tratamento da insuficiência renal ou insuficiência funcional atribuível ao atraso do crescimento, tratamento de patologias de insuficiência correlacionadas com patologias de insuficiência fisiológica, incluindo crianças deficientes na hormona do crescimento e doenças crónicas, tratamento da obesidade e atraso do crescimento correlacionado com a obesidade, tratamento do atraso do crescimento correlacionado com a síndrome de Plauda-Villi e síndrome de Taner, promoção da recuperação de doentes queimados e redução da hospitalização, tratamento do atraso do crescimento intrauterino, má-formação

esquelética, doença hipercorticóide e síndrome de Cushing, indução da libertação da hormona do crescimento pulsátil, substituição da hormona do crescimento em doentes com stress, má-formação da cartilagem, síndrome de Noonan, esquizofrenia, depressão, doença de Alzheimer, tratamento do atraso na reparação de danos e privação fisico-social, tratamento da insuficiência pulmonar e dependência de orgão respiratório, diminuição da reacção catabólica das proteínas após operação significativa, diminuição da perda de proteína e cachexia causada por doenças crónicas, tais como cancro e SIDA, tratamento do hiperinsulinismo, incluindo nesidioblastose do pâncreas, terapia com adjuvante para a indução da ovulação e tratamento de doentes com repressão imunitária, melhoria da força muscular e motilidade, manutenção da espessura da pele em idosos, homeostase metabólica e homeostase renal, estímulo dos osteoblastos, a reformação óssea e estímulo do crescimento da cartilagem, de forma a estimular o crescimento do timo e prevenir a deterioração da função tímica que acompanha o envelhecimento.

Além disso, são, também, esperados os efeitos seguintes em animais. Por exemplo, é feita referência a um aumento na taxa de crescimento dos animais, um aumento na produção de leite e da pelagem em animais, estímulo do sistema imunitário em animais de estimação, tratamento de doenças causadas pela idade avançada em animais de estimação, promoção do crescimento de animais domésticos e um aumento da pelagem em ovelhas.

Um anticorpo cujo抗原 é um péptido modificado com um ácido gordo aqui descrito, tendo uma actividade de libertação de Ca ou uma actividade de indução da secreção da GH, pode ser obtido através de um método conhecido na técnica. O anticorpo

pode ser um anticorpo monoclonal ou policlonal e pode ser obtido através de um método conhecido na técnica. Além disso, um método de medição do péptido modificado com um ácido gordo, utilizando o referido anticorpo e um kit de medição, utilizando o referido método de medição pode utilizar, também, um método conhecido na técnica.

Como descrito no Exemplo 17, são, respectivamente, preparados anticorpos contra os péptidos do terminal amina e carboxilo da grelina e, dado que este último reconhece serina na 3^a posição, modificada com um ácido gordo, ambos os anticorpos podem ser utilizados para separar e quantificar grelina modificada com um ácido gordo e grelina a partir da qual o ácido gordo foi eliminado.

Os anticorpos contra péptidos do terminal amina e carboxilo da grelina podem ser obtidos através de um método conhecido e estes podem ser anticorpos monoclonais ou policlonais.

Pode ser, também, produzido, da mesma forma, um anticorpo que reconhece, especificamente, uma cadeia lateral do 3º resíduo de aminoácido (de um modo preferido, um ácido gordo) e que se liga a um péptido parcial do terminal amina do composto do tipo peptídico, para o presente composto do tipo peptídico, tendo um aminoácido modificado na 3^a posição do terminal amina ou um seu sal farmaceuticamente aceitável. Além disso, pode ser, também, produzido, da mesma forma, um anticorpo que se liga, especificamente, ao péptido tendo um aminoácido modificado, contra o composto do tipo peptídico aqui descrito ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

É aqui, também, descrito um kit de teste compreendendo uma combinação de um anticorpo que reconhece, especificamente, uma cadeia lateral do aminoácido modificado e um anticorpo que reconhece aminoácidos (ou um péptido), excluindo o aminoácido modificado e/ou um composto não-aminoácido, de um modo preferido, um anticorpo contra um péptido parcial do terminal carboxilo do composto do tipo peptídico ou de um seu sal farmaceuticamente aceitável, como descrito acima.

É aqui descrito um método de ensaio em que o composto do tipo peptídico, tendo um aminoácido modificado, de um modo preferido, um aminoácido acilado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável e o composto do tipo peptídico não contendo um aminoácido modificado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, são separados e detectados pela utilização do referido kit de teste.

Depois, o método de ensaio e o kit de teste descritos acima são descritos por referência às suas formas de realização, que, no entanto, não pretendem limitar a presente invenção.

Ou seja, o método de ensaio inclui, por exemplo, (i) um método de quantificação do composto do tipo peptídico, etc., da presente invenção, numa solução de teste, o qual comprehende permitir a reacção competitiva de um material de teste numa solução de teste e o composto do tipo peptídico marcado, etc., da presente invenção, com um anticorpo contra o composto do tipo peptídico, etc., da presente invenção e, depois, a determinação da proporção do composto do tipo peptídico marcado, etc., da presente invenção, ligado ao referido anticorpo e (ii) um método de quantificação das proteínas, etc., da presente invenção, numa solução de teste, comprehendendo permitir a reacção de uma

solução de teste com o anticorpo aqui descrito, insolubilizado num veículo e outro anticorpo marcado aqui descrito, simultaneamente ou sucessivamente e, depois, a medição da actividade do agente de marcação no veículo insolubilizante e/ou a actividade do agente de marcação não capturado no veículo insolubilizante. Nos métodos de quantificação (i) e (ii), é preferido, que um anticorpo seja um anticorpo que reconheça uma região do terminal amina da proteína, etc., aqui descrito, enquanto que outro anticorpo seja um anticorpo que reaja com uma região do terminal carboxilo da proteína, etc. aqui descrito.

No método de ensaio, o composto do tipo peptídico, etc., aqui descrito, pode ser utilizado o anticorpo monoclonal contra o referido composto (também designado, depois, como anticorpo anti-proteína), não, apenas, para quantificar a proteína, etc., aqui descrito, mas, também, para a sua detecção por coloração de tecidos, etc.

Para estes objectivos, pode ser utilizada a própria molécula de anticorpo e uma fracção $F(ab')_2$, Fab' ou Fab da molécula de anticorpo.

O método de quantificação do composto do tipo peptídico, etc., aqui descrito, pela utilização do referido anticorpo, não é, particularmente, limitado, desde que o método compreenda a detecção da quantidade de anticorpo correspondente à quantidade de antigénio (e. g., a quantidade de proteína), o antigénio ou um conjugado antigénio-anticorpo numa solução de teste, através meios químicos ou físicos e o cálculo deste com base numa curva padrão preparada utilizando soluções padrão, contendo quantidades conhecidas do antigénio. Por exemplo, de um modo preferido, são utilizados a nefelometria, o método competitivo,

o método imunométrico e o método de sanduíche, mas o método de sanduíche descrito depois é, de um modo preferido, particularmente, utilizado no que respeita à sensibilidade e especificidade.

Para um método de medição utilizando uma marcação no método de ensaio aqui descrito, a marcação inclui, e. g., um isótopo radioactivo, uma enzima, um material fluorescente e um material luminescente.

O isótopo radioactivo inclui, por exemplo, ^{125}I , ^{131}I , ^3H , ^{14}C , etc.

A enzima é, de um modo preferido, uma enzima estável com actividade específica elevada, que inclui, por exemplo, β -galactosidase, β -glucosidase, fosfatase alcalina, peroxidase e desidrogenase do malato.

O material fluorescente inclui, por exemplo, fluorescamina e isocianato de fluoresceína.

O material luminescente inclui, por exemplo, luminol, derivados do luminol, luciferina e lucigenina.

Além disso, pode ser, também, utilizado um sistema biotina-avidina para a ligação da marcação ao anticorpo ou antigénio.

Posteriormente, a presente invenção é descrita mais detalhadamente por referência aos Exemplos. A menos que especificado de outra forma, os meios de manipulação genética

estiveram de acordo com *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989).

Exemplo 1. Criação de um estirpe celular expressando GHS-R e medição de actividade de libertação de Ca.

Para o ensaio de um aumento na concentração intracelular de iões de cálcio (actividade de libertação de Ca) ocorrendo após a ligação de um secretagogo da GH (GHS) ao receptor do GHS (GHS-R), foi criada uma estirpe celular expressando GHS-R de rato, da seguinte forma. Foi obtido um ADNC completo do GHS-R de rato por RT-PCR (reacção em cadeia da polimerase - transcriptase reversa) em que foi utilizado ADNc derivado de cérebro de rato como molde. Foram sintetizados iniciadores sentido e antissentido consistindo nas sequências nucleotídicas seguintes, a partir da sequência nucleotídica conhecida de GHS-R de rato [K. K. McKee et al., *Molecular Endocrinology* **11**, 415-423 (1997)].

Iniciador sentido: 5'-ATGTGGAACGCGACCCCCAGCGA-3'

Iniciador antissentido: 5'-ACCCCCAATTGTTCCAGACCCAT-3'

O ADNc amplificado foi ligado ao vector pCDNAIII (Invitrogen) para construir o vector de expressão GHSR-pCDNAIII. As células CHO foram transformadas através do vector de expressão e as células transformadas, expressando GHS-R de forma estável, foram seleccionadas num meio contendo G418 1 µg/mL. A estirpe celular CHO-GHSR62 seleccionada respondeu a GHRP-6 10^{-10} a 10^{-9} M (hexapéptido de Libertação da Hormona do Crescimento). Foi medida a modificação na concentração intracelular de iões de

cálcio (actividade de libertação de Ca) através de um sistema FLIPR (Molecular Device). Antes desta medição, foram colocadas 4×10^4 células CHO-GHSR62 numa microplaca de 96 poços com paredes negras (Corning, Ltd) e foram cultivadas durante 12 a 15 horas. Depois, as células foram incubadas com Fluo4 fluorescente 4 μM (Molecular Probe Co., Ltd), durante 1 hora e foram lavadas quatro vezes com BSS de Hank (Solução Salina Equilibrada de Hank), contendo Hepes 20 mM ([N-2-hidroxietil]-piperazina-N-[ácido 2-etanossulfónico]) e probenecida 2,5 mM e a actividade de libertação de Ca foi ensaiada por adição a uma amostra e medição da modificação da fluorescência.

Exemplo 2. Purificação de um péptido indutor da secreção da GH endógena

Utilizando as células CHO-GHSR62 descritas no Exemplo 1, foi examinada uma ampla variedade de tecidos e órgãos derivados de rato em termos da sua actividade de libertação de Ca e, consequentemente, foi verificado que um extracto peptídico derivado do estômago de rato tem uma actividade significativa de libertação de Ca, mesmo numa pequena quantidade de 0,5 mg. Consequentemente, foi purificado um péptido tendo a actividade de libertação de Ca, a partir de um extracto de estômago de rato, por vários tipos de cromatografia.

Foram levadas à ebuição 40 g de estômago de rato, fresco, durante 5 minutos, em 5 vezes água em ebuição, para inactivar as proteases aí presentes. Após o arrefecimento, a amostra fervida foi colocada em AcOH 1 M-HCl 20 mM, seguida da extracção do péptido com um misturador Polytron. O extracto foi

centrifugado a 11000 rpm durante 30 min. e o sobrenadante foi concentrado em cerca de 40 mL num evaporador. O concentrado foi precipitado com acetona, pela adição de acetona a este, numa concentração de 66% e, após a remoção dos precipitados formados, a acetona no sobrenadante foi evaporada. O sobrenadante foi aplicado numa coluna pré-empacotada Sep-Pak C18 de 10 g (Waters Co., Ltd), anteriormente equilibrada com TFA (ácido trifluoroacético) a 0,1%, foi lavado com CH₃CN a 10%/TFA a 0,1% e, depois, foi eluído com CH₃CN a 10%/TFA a 0,1%. A amostra foi liofilizada, após o solvente no eluído ter sido evaporado. A amostra liofilizada foi dissolvida em AcOH 1 M e absorvida em SP-Sephadex C-25 (tipo H⁺), previamente equilibrada com AcOH 1 M. A amostra foi eluída gradualmente com AcOH 1 M, depois, com piridina 2 M e, finalmente, com piridina-AcOH 2 M (pH 5,0), pelo que, foram obtidas 3 fracções ou seja, respectivamente, SP-I, SP-II e SP-III. A fracção SP-III foi aplicada a uma coluna de filtração em gel Sephadex G-50 e foi ensaiada uma alíquota de cada fracção, para a actividade de libertação de Ca, pela utilização das células CHO-GHSR62. Na Fig. 1a é mostrado um perfil de cromatografia em coluna Sephadex G-50 e as fracções activas (fracções 43 a 48 na Fig. 1a), tendo pesos moleculares de cerca de 3000, foram fraccionadas por cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) por permuta iônica CM numa coluna TSK CM-2SW (4,6 x 250 mm, Tosoh Corp.) a pH 6,4. As fracções activas por CM-HPLC foram fraccionadas secundariamente por CM-HPLC, na mesma coluna, a pH 4,8 (Fig. 1b). As fracções activas (tempo de eluição de 55 a 56 minutos, na Fig. 1b) foram purificadas até à homogeneidade por HPLC de fase reversa numa coluna μ Bondasphere C-18 (3,9 x 150 mm, Waters Co., Ltd). Foram purificados 16 μ g de um péptido tendo uma actividade de libertação de Ca e designado como grelina, a partir de 40 g de estômago de rato.

Exemplo 3. Análise estrutural da grelina

A sequência de aminoácidos da grelina purificada derivada de rato foi determinada por um sequenciador de péptidos (ABI 494, Applied Biosystems Co, Ltd). A grelina era um péptido composto por 28 resíduos de aminoácido, consistindo na sequência seguinte: Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg em que Xaa é um aminoácido não identificado. Com base na sequência nucleotídica do ADNC de rato, foi estimado que Xaa fosse Ser, indicando uma determinada modificação da Ser no péptido.

Consequentemente, a grelina não modificada com serina na 3^a posição do terminal amina, foi sintetizada quimicamente por um sintetizador de péptidos (ABI 433A, Applied Biosystems Co, Ltd). Dado que o tempo eluição da grelina sintética não modificada em HPLC de fase reversa foi, significativamente, diferente do da grelina natural (Fig. 2a), foi verificado que a grelina sintética não modificada era mais, significativamente, hidrofílica do que a grelina natural.

A partir do resultado acima, foi verificado que na grelina natural, a serina na 3^a posição do terminal amina (3^a serina) foi modificada com um resíduo hidrofóbico.

Para revelar o grupo modificador da 3^a serina, a grelina purificada foi analisada por espectrometria de massa de ionização por electrovaporização (ESI-MS). O peso molecular determinado ($3314,9 \pm 0,7$) da grelina natural foi superior em cerca de 126 ao peso molecular (3188,5) do péptido da grelina não modificada que foi estimado a partir da sequência

nucleotídica do ADNc. A partir do resultado acima, foi verificado que o grupo hidroxilo da 3^a serina da grelina natural foi modificada com o ácido gordo n-octanoílo (C8:0).

Para confirmar isto, o péptido n-octanoíl(C8:0)grelina foi sintetizado quimicamente e examinado para o seu tempo eluição em HPLC de fase reversa. Na síntese química do péptido n-octanoílico (C8:0), foi sintetizado um péptido em que todos os grupos funcionais excepto o grupo hidroxilo da 3^a serina foram protegidos pelo método Fmoc em fase sólida, utilizando um sintetizador de péptidos (ABI 433A, Applied Biosystems Co, Ltd) e, depois, o péptido pretendido foi obtido por acilação do grupo hidroxilo da 3^a serina com ácido n-octanóico e etil-3-carbodi-imida (3-dimetilaminopropilo), na presença de 4-(dimetilamino)piridina. O péptido n-octanoílico sintético apresentou o mesmo tempo eluição que a grelina natural purificada (Fig. 2a). Além disso, o péptido n-octanoílico sintético e um fragmento de péptido na 1^a à 4^a posições a partir do terminal amina (Gly1-Phe4) que foi obtido por tratamento da grelina natural com quimiotripsina, apresentaram o mesmo tempo de retenção em HPLC de fase reversa.

A partir do resultado acima, foi concluído que a grelina natural derivada de rato tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 2, em que o grupo hidroxilo da 3^a serina foi acilado com ácido n-octanóico (ácido caprílico) (Fig. 2c).

Além disso, grelina humana foi purificada a partir de um extracto de estômago humano e foi verificado que a sua estrutura tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 3, em

que o grupo hidroxilo da cadeia lateral da 3^a serina foi acilado com ácido n-octanóico (ácido caprílico) (Fig. 4a).

As estruturas das grelinas derivadas de rato e de humano foram determinadas, utilizando os purificados das fracções activas na Fig. 1b, como fracções do primeiro pico (tempo de eluição de 55 a 56 minutos) e, após purificação, foi, também, analisada a estrutura de outras fracções activas na Fig. 1b, da mesma forma, indicando a presença de, não, apenas, ácido caprílico (C8:0) mas, também, seu ácido monoeno (C8:1), ácido cáprico (C10:0) e o seu ácido monoeno (C10:1) e ácido láurico (C12:0) e o seu ácido monoeno (C12:1) como o ácido gordo modificador da 3^a serina.

Além disso, foram purificadas grelinas de galinha, enguia e rã, a partir de extractos de estômago, da mesma forma que no Exemplo 2 e foram analisados em termos da sua estrutura, da mesma forma que no Exemplo 3. Foi verificado que a grelina de galinha tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 25, a grelina de enguia tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 26 e a grelina de rã tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 27 e, em todas as grelinas, o grupo hidroxilo da cadeia lateral da 3^a serina foi acilado com ácido n-octanóico (ácido caprílico).

Além disso, foram purificadas grelinas de rã (*Xenopus laevis*), peixe (truta arco-íris) e caninas, a partir de extractos de estômago, da mesma forma que no Exemplo 2 e foram analisadas para a sua estrutura, da mesma forma que no Exemplo 3.

Foi verificado que a grelina de rã tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 28, a truta arco-íris grelina tem a sequência de aminoácidos apresentada nas

SEQ ID N°: 29 e 30 e a grelina canina tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 31 e, em todas as grelinas, o grupo hidroxilo da cadeia lateral da 3^a serina ou treonina foi acilado com ácido n-octanóico (ácido caprílico).

Foram obtidas a grelina-23, consistindo em 23 resíduos de aminoácido, mostrada na SEQ ID N°: 29 e a grelina-20 de consistindo em 20 resíduos de aminoácido, mostrada na SEQ: ID N°: 30, a partir da truta arco-íris.

Exemplo 4. Actividade de libertação de Ca da grelina.

A grelina natural e a grelina sintética modificada com n-octanoílo apresentaram uma actividade de libertação de Ca, mas a grelina sintética não modificada não apresentou uma actividade significativa de libertação de Ca (Fig. 2b). Além disso, uma vez que o ácido n-octanóico ou uma mistura de ácido n-octanóico e grelina sintética não modificada não apresentaram uma actividade significativa de libertação de Ca, foi verificado que o resíduo ácido n-octanóico na grelina natural constitui uma estrutura importante da actividade de libertação de Ca. Depois, grelina refere-se a [0-n-octanoil-serina 3]-grelina (Fig. 2c).

Em células CHO-GHSR62, a grelina apresenta uma actividade mais elevada de aumento da concentração intracelular de iões de cálcio (actividade de libertação de Ca) do que a GHRP-6, enquanto que a GHRH (hormona de libertação da GH, expressa como GRF na Fig. 3^a) não apresenta actividade de libertação de Ca (Fig. 3b). A actividade de libertação de Ca da grelina foi identificada numa concentração de 10^{-11} M ou superior e a sua EC₅₀ foi de 2,5 nM. A actividade de libertação de Ca da grelina foi

inibida na presença de antagonista específico ([D-Lys 3]-GHRP-6) 10^{-4} M paro GHS-R [R. G. Smith, et al., *Science* **260**, 1640-1643 (1993)] e a actividade de libertação de Ca foi restabelecida numa concentração elevada de grelina, na ausência do antagonista (Fig. 3b). O resultado acima indica que a actividade de libertação de Ca da grelina é inibida de um modo antagonístico, pelo antagonista específico paro GHS-R.

Exemplo 5. ADNc para um precursor da grelina e sua expressão em vários órgãos

A sequência de aminoácidos da grelina não apresentava qualquer homologia com as sequências de aminoácidos de qualquer péptido conhecido, mas em resultado de uma pesquisa de homologia na base de dados GenBank, foi encontrada a mesma sequência numa sequência EST de rato (Marcação de Sequência Expressa) (Nº de aceitação do GenBank AI549172). Foram sintetizados seguintes os iniciadores de PCR, com base nesta sequência EST:

Iniciador sentido: 5'-TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA-3'

Iniciador antissentido: 5'-AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT-3'

Estes 2 iniciadores foram utilizados em RT-PCR, em que foi utilizado um ADNc derivado de estômago de rato como molde. As condições de PCR utilizaram 35 ciclos, cada consistindo em 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 1 min. O fragmento de ADN amplificado foi utilizado como uma sonda, para rastrear uma biblioteca de ADNc de estômago de rato. Foi obtido um ADNc completo, codificando o derivado da grelina de rato, por rastreio de cerca de 2×10^5 fagos recombinantes.

O ADNc da grelina de rato era composto por 501 bases mostradas na SEQ ID N°: 6, codificando um precursor da grelina (pré-pró-grelina) composto por 117 aminoácidos (Fig. 4a). Os 23 resíduos de aminoácido do terminal amina do precursor da grelina apresentaram propriedades de péptido sinal. A grelina inicia na glicina 24 e os 2 últimos aminoácidos (Pro-Arg) na grelina madura eram numa sequência que sofre quebra com uma protease.

Foi sujeita a rastreio, uma biblioteca de ADNc de estômago humano, utilizando ADNc de grelina de rato, sob condições de pouco graves, de forma a obter um ADNc completo da grelina humana. A biblioteca de ADNc de estômago humano foi preparada a partir de poli(A)⁺ARN gástrico humano (Clontech, Ltd) pela utilização de um kit de síntese de ADNc (Pharmacia, Ltd). O ADNc completo da grelina humana, deste modo, obtido era composto por 511 bases mostradas na SEQ ID N°: 7, codificando um precursor da grelina humana (pré-pró-grelina) consistindo em 117 aminoácidos (Fig. 4a). A homologia ao nível da sequência de aminoácidos, entre os precursores da grelina, derivados de rato e de humano, foi de 82,9%, revelando que as grelinas são altamente conservadas entre espécies.

O poli(A)⁺ARN isolado a partir de vários tecidos de rato foi analisado, de forma a conhecer a distribuição da grelina nos tecidos (Fig. 4b). Pela análise de transferência de Northern dos tecidos de rato, foi identificado um ARNm precursor da grelina com 0,62 kb, no estômago. Foram, também, identificadas duas bandas ténues no ventrículo e estas correspondiam a ARNm com 6,2 kb e 1,2 kb, os quais eram maiores do que o ARNm no estômago, sugerindo, deste modo, a existência de um processamento de ARNm diferente do do estômago. A partir do resultado acima, foi

verificado que o estômago é um local principal de expressão da grelina.

Exemplo 6. Efeito da grelina sobre a secreção das hormonas pituitárias

Foi examinado, *in vitro* e *in vivo*, se grelina tem ou não actividade de indução da secreção da GH. Em primeiro lugar, foi examinado o efeito da grelina sobre as células cultivadas primárias da pituitária anterior num ensaio *in vitro*. Foram recolhidas pituitárias anteriores, a partir de ratos SD do sexo masculino com 4 semanas e foram dispersadas por tratamento com colagenase e as células foram recolhidas, lavadas duas vezes com meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) contendo FCS (soro bovino fetal) a 10% e um antibiótico e foram suspensas em meio DMEM, para preparar células cultivadas primárias da pituitária anterior. Foram inoculadas 5×10^4 células numa placa de cultura celular de 96 poços, revestida com poli-D-lisina e foram cultivadas durante 3 a 4 dias. O meio de cultura foi substituído por meio DMEM, contendo 0,1 mL de amostra e foi mantido a 37 °C, durante 15 minutos. Foi recolhida uma aliquote do meio de cultura, que foi medida por radioimunoensaio para as concentrações de várias hormonas pituitárias no meio de cultura. De entre as hormonas pituitárias, foram medidas GH, FSH, LH, PRL e TSH, utilizando um kit produzido por Biotrak/Amersham, Ltd e a ACTH foi medida, utilizando um kit EIA, de elevada sensibilidade, produzido por Peninsula Laboratories.

Quando foi adicionada grelina a células cultivadas primárias da pituitária anterior, foi verificado um aumento da concentração intracelular de iões de cálcio, enquanto que a grelina não modificada sintética apresentou, também, uma actividade ligeiramente aumentada de libertação de Ca (Fig. 5a). Este resultado indica que, tanto a grelina, como a grelina não modificada, actuam directamente sobre as células da pituitária. Depois, a actividade de indução da secreção da GH da grelina foi examinada, utilizando as células cultivadas primárias da pituitária anterior e pela adição de grelina 10^{-6} M, a concentração de GH na cultura estava aumentada, dependendo da concentração, mas não foi observado qualquer aumento nas concentrações de outras hormonas pituitárias (FSH, LH, PRL, TSH) (Fig. 5b).

A actividade de indução da secreção da GH pela grelina foi examinada *in vivo*. Após terem sido injectados intravenosamente 10 µg de grelina sintética num rato do sexo masculino (250 g), foi recolhido sangue, periodicamente, durante até 60 minutos, para medição da concentração das hormonas pituitárias no plasma, por radioimunoensaio. De entre as hormonas pituitárias, apenas a GH foi libertada no sangue e atingiu o nível máximo em 5 a 10 minutos após a injecção intravenosa da grelina. A partir deste resultado, foi verificado que grelina libertada a partir do estômago para o sangue, actua sobre as células da pituitária anterior e liberta GH no sangue e foi confirmado que a grelina é uma substância indutora da secreção da GH endógena específica, não identificada.

Exemplo 7. Aumento do débito cardíaco no rato

Foi examinado o efeito da administração aguda da grelina no sistema cardiovascular de um rato sob anestesia. Foram divididos ratos Wistar do sexo masculino (Carerie), pesando, cada, 220 a 250 g, aleatoriamente, em 4 grupos (grupos aos quais foram administradas, respectivamente, 10, 1, 0,5 e 0,2 µg de grelina), para examinar o efeito da administração aguda da grelina sobre o sistema cardiovascular. A grelina foi diluída com soro fisiológico e, depois, foi preparada uma dose de 10, 1, 0,5 ou 0,2 µg/rato e foram administrados, rapidamente, 120 µL, através de um tubo de injecção (PE50), o qual tinha sido inserido na veia jugular comum direita, para a medição do débito cardíaco.

A pressão sanguínea sistémica e o débito cardíaco foram medidos e a resistência vascular periférica foi calculada como um indicador dinâmico. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital e fixados na posição dorsal. Para a medição da pressão sanguínea média, foi inserida uma cânula de polietileno (PE50), cheia com heparina, na artéria femural direita. O débito cardíaco foi medido utilizando um medidor do débito cardíaco (CARDIOTHER M500R) do tipo de diluição térmico. Foi inserido um tubo de injecção (PE50), cheio com soro fisiológico, na veia jugular comum direita do rato e foi conservado no ventrículo direito. Foi inserido um micro-cateter na veia de veia jugular comum direita do rato e foi conservado na parte inicial da aorta. A infusão utilizou 100 µL de soro fisiológico à temperatura ambiente (25 °C). A medição do débito cardíaco foi iniciada, pressionando o botão MEDIDA do medidor do débito cardíaco do tipo de diluição, térmico e, simultaneamente, pela injecção da infusão (100 µL de soro fisiológico). O débito cardíaco foi medido 5 vezes, para a determinação do débito

cardíaco médio. A pressão sanguínea média e o débito cardíaco foram determinados aos 1, 5, 15 e 30 minutos, antes e após a administração da grelina. A resistência vascular periférica foi determinada pela divisão da pressão sanguínea média pelo débito cardíaco.

Tabela 1

	Peso corporal (g)	Débito cardíaco (mL/min/kg) após administração de 1 µg de grelina				
		0 min.	1 min.	5 min.	15 min.	30 min.
Média	230	347	382	367	341	338
SEM	3,7	14,3	10,2	11,5	7,9	8,8

Na tabela, SEM é a média do erro padrão.

Tabela 2

	Peso corporal (g)	Débito cardíaco (mL/min/kg) após administração de 1 µg de grelina				
		0 min.	1 min.	5 min.	15 min.	30 min.
Média	237	350	390	392	370	344
SEM	1,0	8,5	7,4	15,8	14,7	13,8

Na Tabela, SEM é a média do erro padrão.

Foi detectado um aumento do débito cardíaco, no grupo ao qual foi administrado 1 µg de grelina (Tabela 1) e no grupo ao

qual foram administrados 10 µg de grelina (Tabela 2), 1 a 5 minutos após a administração.

Exemplo 8. Isolamento da grelina e grelina-27, a partir de várias origens

Foi purificada grelina, a partir do extracto de estômago de rato, utilizando a actividade de libertação de Ca como um indicador, no método descrito no Exemplo 2. A fracção activa (tempo de eluição de 59 minutos na Fig. 1b) em CM-HPLC secundário foi purificada até à homogeneidade, por HPLC de fase reversa, numa coluna µBondasphere C-18 (3,9 x 150 mm, produzida por Waters Co, Ltd). Esta fracção foi analisada por espectrometria de massa de ionização por electrovaporização (ESI-MS), revelando um pico de peso molecular ($3187,2 \pm 0,9$) que era menor, em cerca de 126, do que o da grelina natural modificada com ácido octanóico (C8) consistindo em 28 aminoácidos. A determinação da sequência de aminoácidos deste péptido por um sequenciador de péptidos (ABI 494, produzido por Applied Biosystems Co, LTD) revelou que este é um péptido composto pelos seguintes 27 resíduos de aminoácido: Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg (Xaa é um aminoácido não identificado). Ou seja, este péptido era composto por uma sequência de aminoácidos em que foi eliminada a 13^a ou 14^a glutamina da grelina consistindo em 28 aminoácidos. Dado que a actividade de libertação de Ca deste péptido era semelhante à da grelina com 28 aminoácidos, como mostrado no Exemplo 9, este péptido foi designado como grelina-27. A grelina-27 humana foi isolada a partir do extracto de estômago humano, da mesma forma que a grelina de rato e foi confirmado que consistia na

sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 11. As fracções dos picos com tempos de retenção de 64 a 65 minutos em CM-HPLC secundário foram purificadas e analisadas por espectrometria de massa de ionização por electrovaporização (ESI-MS), revelando um pico do peso molecular ($3341,4 \pm 0,9$). Dado que este péptido modificado com um ácido gordo era composto por 28 aminoácidos, este revelou ser um péptido, em que a 3^a serina da grelina (28 aminoácidos) foi modificada com ácido decanóico (C10).

Foi clonado um ADNc codificando um precursor da grelina-27, obtido da biblioteca ADNc de estômago de rato preparada no Exemplo 5, por hibridação em placa, em que o fragmento de ADN amplificado por PCR, preparado no Exemplo 5, foi utilizado como uma sonda. A sequência nucleotídica do ADNc foi determinada e foi confirmado que codificava o precursor da grelina-27. O ADNc do precursor da grelina-27 de rato, resultante, era composto pela sequência nucleotídica estabelecida na SEQ ID N°: 14, codificando o precursor da grelina-27, tendo a sequência de aminoácidos (116 aminoácidos) estabelecida na SEQ ID N°: 12. Foi, também, clonado um ADNc para o precursor da grelina-27 humana, da mesma forma, como descrito acima e revelou consistir na sequência nucleotídica estabelecida na SEQ ID N°: 15, codificando o precursor da grelina-27 humana, tendo a sequência de aminoácidos (116 aminoácidos) estabelecida na SEQ ID N°: 13.

Foi clonado um ADNc codificando um precursor da grelina ou da grelina-27 derivada de porco, a partir de uma biblioteca de ADNc de porco, de acordo com o método descrito no Exemplo 5, por hibridação em placa, em que o fragmento de ADN amplificado por PCR, descrito no Exemplo 5, foi utilizado como uma sonda. Foi determinada a sequência nucleotídica do clone de ADNc,

resultante, e foi confirmado que codificava um precursor da grelina porcina ou um precursor da grelina-27 porcina. O ADNc, resultante, para o precursor da grelina porcina, era composto pela sequência nucleotídica estabelecida na SEQ ID Nº: 20, codificando um precursor da grelina, tendo a sequência de aminoácidos (118 aminoácidos) estabelecida na SEQ ID Nº: 18. O ADNc para o precursor da grelina-27 porcina era composto pela sequência nucleotídica estabelecida na SEQ ID Nº: 21, codificando o precursor da grelina-27, tendo a sequência de aminoácidos (117 aminoácidos) estabelecida na SEQ ID Nº: 19. Consequentemente, a grelina porcina (28 aminoácidos) e a grelina-27 porcina (27 aminoácidos) são compostas pelas sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID Nº: 16 e 17, respectivamente.

Foi clonado um ADNc, codificando um precursor da grelina derivado de enguia, *Xenopus laevis* ou truta arco-íris, a partir de várias bibliotecas de ADNc, de acordo com o método descrito no Exemplo 5, por hibridação em placa, em que o fragmento de ADN amplificado por PCR, descrito no Exemplo 5, foi utilizado como uma sonda. Foi determinada a sequência nucleotídica do clone de ADNc resultante e foi confirmado que codificava o precursor da grelina.

O ADNc resultante do precursor da grelina de enguia era composto pelos jogo de nucleótidos estabelecidos na SEQ ID Nº: 36, o ADNc para o precursor da grelina de rã era composto pelos nucleótidos estabelecidos na SEQ ID Nº: 37 e o ADNc para o precursor da grelina da truta arco-íris era composto pelos nucleótidos estabelecidos na SEQ ID Nº: 38 ou 39.

Foram obtidos o ADNc codificando o precursor da grelina-23 da truta arco-íris, estabelecido na SEQ ID N°: 38 e a o ADNc codificando o precursor da grelina-20, estabelecido na SEQ ID N°: 39.

Foi verificado, a partir das sequências nucleotídicas do ADNc acima, que o precursor da grelina de enguia tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 32, o precursor da grelina de rã tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 33 e o precursor da grelina da truta arco-íris tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 34 ou 35.

Foram obtidas a partir da truta arco-íris a sequência de aminoácidos do precursor da grelina-23, estabelecida na SEQ ID N°: 34 e a sequência de aminoácidos do precursor da grelina-20, na SEQ ID N°: 35.

Foi clonado um ADNc para um precursor da grelina bovina pelo método de PCR. Ou seja, foi realizada PCR, em que foi utilizado ADN sintético, tendo sequências nucleotídicas concebidas com base em sequências de aminoácidos conservadas entre as grelinas e as grelinas-27 derivadas de rato, humano e porco, como iniciador e foi utilizada uma biblioteca de ADNc de estômago de bovino como molde. O fragmento de ADN, deste modo, amplificado tem a sequência nucleotídica estabelecida na SEQ ID N°: 24, codificando uma parte do precursor da grelina-27 bovina estabelecida na SEQ ID N°: 23. Consequentemente, a grelina-27 de bovino tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID N°: 22. No fragmento de ADN amplificado pela PCR acima, utilizando uma biblioteca de ADNc de estômago de bovino como molde, não estava presente ADN codificando um precursor da grelina (28 aminoácidos).

Os aminoácidos das grelinas derivadas de rato, humano e porco e das grelinas-27 derivadas de rato, humano, porco e bovino eram muito semelhantes e, em particular, as sequências de aminoácidos do 1º ao 10º aminoácidos das 7 grelinas descritas acima, eram completamente idênticas entre si.

Exemplo 9. Comparação da actividade entre vários derivados da grelina

Foram examinados fragmentos peptídicos, obtidos por digestão parcial de grelinas derivadas de rato e de humano, com várias proteases ou péptidos sintetizados quimicamente, para a sua actividade de libertação de Ca, para determinar uma sequência de aminoácidos nuclear e o comprimento de cadeia óptimo de um ácido gordo modificador, necessário para a actividade de libertação de Ca. A actividade de libertação de Ca da grelina foi expressa em termos da concentração da grelina (EC_{50} , nM), na qual é atingida 50% da actividade máxima. Consequentemente, valores baixos de EC_{50} são indicadores de actividade mais elevada.

Tabela 3

Origem	SEQ ID N°:	Comparação da actividade entre vários derivados da grelina				Observação (EC ₅₀ , nM)	
		Aminoácidos	Ácido gordo	Actividade	de libertação de Ca		
		modificante					
humano	3	1-28	Acilo (C:8)	2,6	grelina natural		
humano	3	1-15	Acilo (C:8)	7,0			
humano	3	1-11	Acilo (C:8)	15			
rato	2	1-28	Acilo (C:8)	2,9	grelina natural		
rato	2	1-15	Acilo (C:8)	8,6			
rato	2	1-11	Acilo (C:8)	15			
rato	2	1-10	Acilo (C:8)	19			
rato	2	1-9	Acilo (C:8)	38			
rato	2	1-8	Acilo (C:8)	100			
rato	2	1-4	Acilo (C:8)	480			
rato	2	16-28	Acilo (C:8)	>10000			
rato	2	(1-28) + (14-28)	Acilo (C:8)	2,8	grelina-27		
rato	2	1-28	Acilo (C:16)	3,1			
rato	2	1-28	Acilo (C:10)	2,6			
rato	2	1-28	Acilo (C:6)	16			
rato	2	1-28	Acilo (C:4)	280			
rato	2	1-28	Acilo (C:2)	780			

A actividade de libertação de Ca da grelina está presente do lado do terminal amina. Um péptido proveniente do terminal amina até ao 4º aminoácido tem uma actividade de libertação de Ca suficiente e um péptido proveniente do terminal amina até ao 10º aminoácido mostra uma actividade significativa de libertação de Ca próximo do da grelina natural. Quando o comprimento de cadeia de ácido gordo modificador é C:2 (grupo acetilo), é produzida uma actividade suficiente e quando o comprimento de cadeia é C:8 (grupo octanoílo), é alcançada a actividade máxima

de libertação de Ca e, ainda, se o número de átomos de carbono do ácido gordo for, adicionalmente, aumentado para C:10 (grupo decanoílo) ou C:16, a actividade significativa de libertação de Ca não se altera. Ou seja, a actividade de libertação de Ca mais significativa é produzida, quando o ácido gordo modificador da 3^a serina do terminal amina contém 8 ou mais átomos de carbono.

Exemplo 10. Síntese de vários derivados da grelina

(1) Síntese de derivados petídicos

Os derivados de aminoácido que não Fmoc-^DSer (C₈H₁₇) e Fmoc-Ser (C₈H₁₇) e reagentes de síntese, foram adquiridos à Perkin Elmer, Novabiochem ou Watanabe Kagaku Co, Ltd. A extensão da cadeia peptídica foi realizada, principalmente, pela utilização do sintetizador Applied Biosystem 433A produzido por Perkin Elmer e foi construído um derivado de péptido protegido, em resina, pelo método Boc ou Fmoc. O péptido protegido, em resina, obtido pelo método Boc foi desprotegido com fluoreto de hidrogénio anidro (HF), na presença de p-cresol que, deste modo, libera o péptido que foi, então, purificado. O péptido protegido, em resina, obtido pelo método Fmoc foi desprotegido com ácido trifluoroacético (TFA) ou TFA diluído, contendo vários purificadores e o péptido libertado foi purificado. A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa numa coluna de C4 ou C18. A pureza do produto purificado foi confirmada por HPLC de fase reversa e a sua estrutura foi confirmada por análise da composição em aminoácidos e espectrometria de massa.

O péptido da presente invenção é produzido por um método de síntese peptídica convencional. Por exemplo, pode ser produzido

por um método descrito, nos capítulos 2 e 3 de "Biochemical Experimental Course 1, Protein Chemistry IV" (Tóquio Kagaku Dojin) ou em "Development of Medicines, a second series, volume 14, Peptide Synthesis (Hirokawa Shoten Co, Ltd). Consequentemente, os exemplos típicos do péptido da presente invenção são mostrados abaixo. Especificamente, a síntese de péptidos acilados ou alquilados é exemplificada abaixo. Além disso, foi feito reagir um derivado de grelina humana (que pode ser abreviado, depois, como hGrelina) ou um derivado de grelina de rato (que pode ser abreviado, depois, como rGrelina) com tripsina ou quimiotripsina ou com ambas as enzimas, sucessivamente, para originar os seguintes fragmentos da grelina: 19. Grelina (16-28), 20. hGrelina (1-15), 21. rGrelina (1-15), 23. hGrelina (1-11), 24. rGrelina (1-11), 25. Grelina (1-10), 26. Grelina (1-9), 27. Grelina (1-8) e 30. Grelina (1-4). Depois, estes fragmentos foram isolados por HPLC analítico e medidos para a sua actividade. 41. [N-Acetil]-Grelina (1-10) foi preparada de uma forma normal por tratamento da Grelina (1-10) com N-acetilsuccinimida. O composto Nº 2 (grelina de rato) utiliza um material natural e 10. [Ser³ (Butiril)]-rGrelina, 11. [Ser³(Hexanoil)]-rGrelina, 12. [Ser³(Decanoil)]-rGrelina, 13. [Ser³(Laurooil)]-rGrelina e 14. [Ser³(Palmitoil)]-rGrelina foram sintetizadas, da mesma forma que na síntese do Composto 1 (hGrelina) e, depois, foram medidas para a sua actividade.

[Abreviaturas Principais]

Resina HMP; resina de 4-hidroximetil-fenoximetilo

resina Fmoc amida; resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamidoetilo

Resina PAM; resina de fenilacetoadidometilo

HBTU; hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazole-1-il)-
1,1,3,3-tetrametilurónio

TBTU; tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazole-1-il)-
1,1,3,3-tetrametilurónio

HOEt; 1-hidroxibenzotriazole

DCC; diciclohexilcarbodi-imida

DIPCI; di-isopropilcarbodi-imida

TFA; ácido trifluoroacético

DIPEA; di-isopropiletilamina

TIPS; triisopropilsilano

Fmoc; fluorenilmetoxicarbonilo

Boc; *t*-butiloxicarbonilo

Trt; tritilo

But; *t*-butilo

Pmc; 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo

Prl; propionilo

PhPrl; fenilpropionilo

Bzl; benzilo

Bom; benziloximetilo

Tos; toluenosulfonilo

C1-Z; 2-cloro-benziloxicarbonilo

Pis; 2-fenilisopropilo

Mtt; 4-metiltritilo

DMF; *N,N*-dimetilformamida

NMP; *N*-metilpirrolidona

DMAP; 4-dimetilaminopiridina

HOSu; *N*-hidroxissucciniimida

Adod; ácido 2-aminododecanóico

Aib; ácido 2-aminoisobutílico

Ape; ácido 5-aminopentanóico

Cha; ciclo-hexilalanina

Dap; 2, ácido 3-diaminopropiónico

Nal; naftilalanina

Nle; norleucina

[Aminoácidos protectores utilizados em síntese]

Método Fmoc:

Boc-Gly, Fmoc-Gly, Fmoc-Ser (Bu^t), Fmoc-Ser (Trt), Fmoc-Glu (OBu^t), Fmoc-His (Boc), Fmoc-Gln (Trt), Fmoc-Arg (Pmc), Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Pro, Fmoc-Leu, Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-Phe, Fmoc- ^DPhe , Fmoc-Ser ($n\text{-C}_8\text{H}_{17}$), Fmoc- ^DSer ($n\text{-C}_8\text{H}_{17}$), Fmoc-Cys ($n\text{-C}_8\text{H}_{17}$), Fmoc-Asp (OPis), Fmoc-Ser (Bzl), Fmoc-Cys (Trt), Fmoc-Dap (Octanoílo), Fmoc-2- ^LNal , Fmoc-2- ^DNal , Fmoc-Nle, Fmoc-Lys (Mtt), Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Asp ($\text{O-C}_7\text{H}_{15}$)

Método Boc:

Boc-Gly, Boc-Ser (Bzl), Boc-Ser (Ac), Boc-Ser (Prl), Boc-Glu (OBzl), Boc-His (Bom), Boc-Gln, Boc-Arg (Tos), Boc-Lys (Cl-Z), Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-Val, Boc-Phe, Boc-Cys ($n\text{-C}_8\text{H}_{17}$), Boc-Ape Boc-Ser ($n\text{-C}_8\text{H}_{17}$)

[Equipamento utilizado]

(a) Sistema de HPLC analítico

Equipamento: Shimadzu LC-10A System

Coluna: YMC PROTEIN-RP (4,6 mmΦ x 150 mm)

Temperatura da coluna: 40 °C

Eluente: um gradiente linear de acetonitrilo 0 a 50%, durante 20 minutos, em ácido trifluoroacético a 0,1%

Caudal: 1 mL/min.

Detecção: UV (210 nm)

Volume de injecção: 10 a 100 µL

(b) Sistema de HPLC preparativa

Equipamento: Waters 600 Multisolvent Delivery System

Colunas: YMC-Pack-ODS-A (5 µm, 20 mm x 250 mm)

YMC-Pack-PROTEIN-RP (5 µM, C4, 10 mm x 250 mm)

YMC-Pack-PROTEIN-RP (5 µM, C4, 20 mm x 250 mm)

YMC-PROTEIN-RP (4,6 mmΦ x 150 mm)

Eluente: Um gradiente linear adequado de concentração de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1%

Caudal: 10 mL/min. (para a coluna com um diâmetro interior de 20 mm), 3 mL/min. (para a coluna com um diâmetro interior de 10 mm), 1 mL/min. (para a coluna com um diâmetro interior de 4,6 mm) Detecção: 210 nm, 260 nm

Injecção: 10 a 2000 µL (foram injectados 2000 ou mais µL através de uma bomba)

(c) Espectrómetro de massa

Equipamento: Finigan MAT TSQ700

Fonte de iões: ESI

Modo de detecção de iões: Positivo

Voltagem de vaporização: 4,5 kV

Temperatura do capilar: 250 °C

Fase móvel: Uma mistura de ácido acético e metanol a 0,2% (1:1)

Velocidade do fluxo: 0,2 mL/min.

Gama de varrimento: m/z 300 a 1500

(d) Análise da sequência de aminoácidos

Equipamento: Applied Biosystem 477A, sequenciador do modelo 492, produzido por Perkin Elmer

(e) Análise da composição em aminoácidos

Equipamento: Analisador de aminoácidos do modelo L-8500, produzido por Hitachi, Co, Ltd.

Amostra: A menos que especificado de outra forma, a amostra foi hidrolizada com HCl 6 M, a 110 °C, durante 24 horas, num tubo selado.

(2) Exemplo da síntese de um derivado tendo acil serina ou acil treonina (método Fmoc, derivados amida do terminal carboxílico)

Composto 1 hGrelina: GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Foi tratada Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-resina (403 mg, 0,25 mmol, ABI, Ltd) com piperazina a 20%, durante 20 minutos e foi submetida, repetidamente, à introdução de Fmoc-aminoácido por HBTU/HOBt e eliminação de Fmoc por piperazina, sequencialmente, para construir Fmoc-Ser(Bu^t)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-resina. Após Boc-Gly ter sido, finalmente, introduzido por DCC/HOBt, o péptido protegido, em resina, resultante, (1,3 g) foi tratado com uma solução de TFA

1%-TIPS 5%-cloreto de metileno (15 mL), durante 30 minutos. O péptido em resina foi filtrado, foi lavado várias vezes com cloreto de metileno (30 mL), foi lavado com DIEA a 5% (10 mL) e, depois, com cloreto de metileno (30 mL). O péptido de-Trt em resina, resultante, (cerca de 1,3 g) foi dilatado com NMP (10 mL), foram aí adicionados ácido octanóico (144,2 mg, 1,0 mmol) e DIPCI (126,2 mg, 1,0 mmol), na presença de DMAP (61,1 mg, 0,5 mmol) e foi permitida a reacção durante 8 horas. A resina foi recuperada por filtração e foi lavada com NMP e, depois, com cloreto de metileno, seguido de secagem sob vácuo, para originar cerca de 1,2 g de péptido protegido em resina, em que a cadeia lateral da 3^a serina foi adicionada de octanoílo. Foi adicionado um reagente desprotector (10 mL) a este produto, consistindo em TFA a 88%-fenol a 5%-TIPS a 2%-H₂O a 5% e a mistura foi agitada à temperatura ambiente, durante 2 horas. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi concentrado, seguido pela adição de éter aos resíduos resultantes, para formar precipitados. Os precipitados foram recuperados por filtração e secos, para originar cerca de 550 mg de péptido bruto. Foram dissolvidos 200 mg deste produto em 10 mL de água e foram aplicados à YMC-Pack-PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250 mm) e foram eluídos com um gradiente linear de 0 a 54% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar cerca de 120 mg do produto pretendido.

(3) Exemplo da síntese de um derivado tendo acil serina ou acil treonina (método Fmoc, compostos i amida do terminal carboxilo)

Composto 3 Grelina (1-9)-NH₂; GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPEH-NH₂

Foi tratada Fmoc-amida-resina (403 mg, 0,25 mmol, ABI, Ltd) com piperazina a 20%, durante 20 minutos e foi submetida, repetidamente, à introdução de Fmoc-aminoácido por HBTU/HOBt e eliminação de Fmoc por piperazina, sequencialmente, para construir Fmoc-Ser(Bu^t)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Bo c)-resina. Após Boc-Gly ter sido, finalmente, introduzido por DCC/HOBt, o péptido protegido, em resina, resultante, (cerca de 550 mg) foi tratado com uma solução de TFA 1%-TIPS 5%-cloreto de metíleno (10 mL), durante 30 minutos. O péptido em resina foi recuperado por filtração, foi lavado várias vezes com cloreto de metíleno (30 mL), foi lavado com DIEA a 5% (10 mL) e, depois, com cloreto de metíleno (30 mL). O péptido de-Trt em resina, resultante, (cerca de 750 mg) foi dilatado com NMP (10 mL), foram aí adicionados ácido octanóico (144,2 mg, 1,0 mmol) e DIPCI (126,2 mg, 1 mmol), na presença de DMAP (61,1 mg, 0,5 mmol) e foi permitida a reacção durante 4 horas. A resina foi recuperada por filtração e foi lavada com NMP e, depois, com cloreto de metíleno, seguido de secagem sob vácuo, para originar cerca de 800 mg de péptido protegido em resina, em que a cadeia lateral da 3^a serina foi adicionada de octanoílo. Foi adicionado TFA (10 mL) a este produto e foi misturado à temperatura ambiente, durante 30 minutos. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi concentrado, seguido pela adição de éter aos resíduos resultantes, para formar precipitados. Os precipitados foram recuperados por filtração e secos, para originar cerca de 250 mg de péptido bruto. Foram dissolvidos

cerca de 200 mg deste produto em 10 mL de ácido acético aquoso a 30%, foram aplicados à YMC-Pack-PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250 mm) e foram eluídos com um gradiente linear de 0 a 54% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar cerca de 150 mg do produto pretendido.

(4) Exemplo da síntese de um derivado tendo acil serina ou acil treonina (método Boc)

Composto 9 [Ser³(Propionil)]-rGrelina(1-28); GSS(CO-CH₂CH₃)
FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR

Foi construída grelina de rato protegida em resina (4-28), a partir de Boc-Arg (Tos)-Pam resina (0,75 g, 0,5 mmol) através de química Boc e Boc-Ser (CO-CH₂CH₃)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH e Boc-Gly-OH foram condensados com metade da resina (1,4 g). A resina resultante, 1,5 g, foi tratada com uma mistura de HF e p-cresol (8,5 mL: 1,5 mL), a 0 °C, durante 1 hora e o HF foi evaporado. Foi adicionado éter aos resíduos, pelo que foram obtidos 671 mg de péptido bruto. Esta amostra foi dissolvida em ácido acético a 50% (AcOH), foi aplicada a uma coluna preparativa YMC-Pack-ODS-A (5 µm, 20 mm x 250 mm) e foi eluída com um gradiente de 0 a 95% de concentração de acetonitrilo numa solução de TFA a 0,1%, a uma velocidade de 10 mL/min., durante 75 minutos. As fracções contendo o produto pretendido foram liofilizadas para originar 135,8 mg do péptido bruto. Uma parte (0,5 mg) deste produto foi aplicada na coluna de YMC-A-302 (C18, 4,6 mm mm x 150) e foi eluída com um gradiente de 15 a 19% de concentração de acetonitrilo, a um caudal de 1 mL/min. Este

processo de purificação foi repetido e as fracções pretendidas foram combinadas para originar 0,41 mg do produto pretendido.

Foram produzidos os seguintes derivados petídicos, tendo acil serina ou acil treonina, da mesma forma que na produção do Composto 3 ou 9 descrita acima.

Os resultados da espectrometria de massa e da análise da composição em aminoácidos dos derivados petídicos tendo acil serina ou acil treonina, são resumidos abaixo.

Composto 1. hGrelina

ESI-MS 3371,0 (teórico: 3370,9), composição em aminoácidos: Ser; 3,53 (4), Glx; 5,91 (6), Gly; 1,02 (1), Ala; 1,00 (1), Val; 0,96 (1), Leu; 2, Phe; 1,06 (1), Lys; 3,90 (4), His; 0,97 (1), Arg; 2,87 (3), Pro; 3,87 (4)

Composto 3. Grelina (1-9)-amida

ESI-MS [M+H]; 1085,7 (teórico: 1085,2), composição em aminoácidos: Ser; 2,45 (3), Glx; 0,98 (1), Gly; 0,99 (1), Leu; 1, Phe; 0,99 (1), His; 1,08 (1), Pro; 0,97 (1)

Composto 4. [Ser²(Octanoil), Ser³]-Grelina (1-9)-amida

ESI-MS [M+H]; 1085,8 (teórico: 1085,2), composição em aminoácidos: Ser; 2,46 (3), Glx; 0,98 (1), Gly; 0,99 (1), Leu; 1, Phe; 1,01 (1), His; 1,09 (1), Pro; 0,97 (1)

Composto 5. [Ser²(Octanoil)]-Grelina (1-9)-amida

ESI-MS [M+H]; 1211,7 (teórico: 1211,4), composição em aminoácidos: Ser; 2,48 (3), Glx; 1,00 (1), Gly; 1,01 (1), Leu; 1, Phe; 1,00 (1), His; 1,11 (1), Pro; 0,98 (1)

Composto 8. [Ser³(Acetil)]-rGrelina

ESI-MS 3231,0 (teórico: 3230,7), composição em aminoácidos: Ser; 3,50 (4), Glx; 5,90 (6), Gly; 0,98 (1), Ala; 2,00 (2), Leu; 2, Phe; 1,01 (1), Lys; 4,97 (5), His; 0,99 (1), Arg; 1,99 (2), Pro; 3,99 (4)

Composto 9. [Ser³(Propionil)]-rGrelina

ESI-MS 3245,0 (teórico: 3242,8), composição em aminoácidos: Ser; 3,42 (4), Glx; 5,93 (6), Gly; 1,00 (1), Ala; 2,00 (2), Leu; 2, Phe; 1,10 (1), Lys; 4,97 (5), His; 0,99 (1), Arg; 1,99 (2), Pro; 3,83 (4)

Composto 15. [Ser³(3-Fenilpropionil)]-hGrelina

ESI-MS 3377,0 (teórico: 3376,9), composição em aminoácidos: Ser; 3,06 (4), Glx; 5,92 (6), Gly; 0,93 (1), Ala; 0,98 (1), Val; 0,99 (1), Leu; 2, Phe; 1,13 (1), Lys; 4,03 (4), His; 1,08 (1), Arg; 3,00 (3), Pro; 3,76 (4)

Composto 16. [Ser³(3-Octenoil)]-hGrelina

ESI-MS 3369,0 (teórico: 3368,9), composição em aminoácidos: Ser; 3,59 (4), Glx; 5,91 (6), Gly; 1,00 (1), Ala; 1,02 (1), Val; 0,99 (1), Leu; 2, Phe; 1,15 (1), Lys; 3,97 (4), His; 0,98 (1), Arg; 2,93 (3), Pro; 3,88 (4)

Composto 28. Grelina (1-8)-amida

ESI-MS [M+H] 948,5 (teórico: 948,1), composição em aminoácidos: Ser; 2,45 (3), Glx; 0,97 (1), Gly; 0,99 (1), Leu; 1, Phe; 1,00 (1), Pro; 0,97 (1)

Composto 29. Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H] 819,6 (teórico: 819,0), composição em aminoácidos: Ser; 2,52 (3), Gly; 1,01 (1), Leu; 1, Phe; 1,02 (1), Pro; 1,09 (1)

Composto 30. Grelina (1-6)-amida

ESI-MS [M+H]; 722,4 (teórico: 721,8), composição em aminoácidos: Ser; 2,47 (3), Gly; 0,99 (1), Leu; 1, Phe; 1,00 (1)

Composto 31. Grelina (1-5)

ESI-MS [M+H] 636,5 (teórico: 635,8), composição em aminoácidos: Ser; 1,78 (2), Gly; 0,99 (1), Leu; 1, Phe; 1,02 (1)

Composto 32. Grelina (1-5)-amida

ESI-MS [M+H] 635,4 (teórico: 634,8), composição em aminoácidos: Ser; 1,67 (2), Gly; 1,01 (1), Leu; 1, Phe; 1,01 (1)

Composto 33-2. Grelina (1-4)-amida

ESI-MS [M+H] 522,2 (teórico: 521,6), composição em aminoácidos: Ser; 1,65 (2), Gly; 0,99 (1), Phe; 1

Composto 34. Grelina (1-3)-amida

ESI-MS [M+H] 375,2 (teórico: 374,4), composição em aminoácidos: Ser; 1,66 (2), Gly; 1

Composto 35. [Lys⁸]-Grelina (1-8)-amida

ESI-MS [M+H] 947,9 (teórico: 947,1), composição em aminoácidos: Ser; 2,70 (3), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,00 (1), Lys; 0,99 (1), Pro; 1,00 (1)

Composto 36. [Arg⁸]-Grelina (1-8)-amida

ESI-MS [M+H] 975,8 (teórico: 975,2), composição em aminoácidos: Ser; 2,70 (3), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,01 (1), Arg; 0,99 (1), Pro; 1,00 (1)

Composto 37. [Lys⁶]-Grelina (1-6)-amida

ESI-MS [M+H] 763,6 (teórico: 762,9), composição em aminoácidos: Ser; 1,80 (2), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,01 (1), Lys; 1,00 (1)

Composto 38. [Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida

ESI-MS [M+H] 650,5 (teórico: 649,8), composição em aminoácidos: Ser; 1,79 (2), Gly; 0,99 (1), Phe; 1, Lys; 0,99 (1)

Composto 39. [^DPhe⁴, Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida

ESI-MS [M+H] 650,5 (teórico: 649,8), composição em aminoácidos: Ser; 1,79 (2), Gly; 0,99 (1), Phe; 1, Lys; 0,99 (1)

Composto 40. [N-Aminopentanoil]-Grelina (3-7)-amida

ESI-MS [M+H] 774,7 (teórico: 774,0), composição em aminoácidos: Ser; 1,80 (2), Leu; 1, Phe; 1,01 (1), Pro; 1,00 (1)

Composto 43. [N-Glicil]-Grelina (3-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 732,7 (teórico: 731,9), composição em aminoácidos: Ser; 1,80 (2), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,01 (1), Pro; 1,00 (1)

Composto 44. [Leu²]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 845,7 (teórico: 845,1), composição em aminoácidos: Ser; 1,80 (2), Gly; 1,01 (1), Leu; 2, Phe; 1,02 (1), Pro; 0,99 (1)

Composto 45. [His²]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 869,7 (teórico: 869,0), composição em aminoácidos após hidrólise com ácido propiónico-ácido clorídrico (50/50), a 150 °C, durante 2 horas: Ser; 1,02 (2), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,00 (1), His; 0,95 (1), Pro; 0,99 (1)

Composto 46. [Lys²]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 860,7 (teórico: 860,1), composição em aminoácidos após hidrólise com ácido propiónico-ácido clorídrico (50/50), a 150 °C, durante 2 horas: Ser; 1,04 (2), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,00 (1), Lys; 1,00 (1), Pro; 1,00 (1)

Composto 47. [Gly²]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 789,5 (teórico: 788,9), composição em aminoácidos após hidrólise com ácido propiónico-ácido clorídrico (50/50), a 150 °C, durante 2 horas: Ser; 1,14 (2), Gly; 2,01 (2), Leu; 1, Phe; 1,00 (1), Pro; 1,00 (1)

Composto 59. [Thr³(Octanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3384,0 (teórico: 3384,9), composição em aminoácidos: Ala; 1,02 (1), Arg; 2,99 (3), Glx; 5,91 (6), Gly; 1,02 (1), His; 1,00 (1), Leu; 2 (2), Lys; 4,05 (4), Phe; 1,00 (1), Pro; 4,06 (4), Ser; 2,66 (3), Thr; 0,94 (1), Val; 0,96 (1)

Composto 60. [Leu², Thr³(Octanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3410,0 (teórico: 3411,0), composição em aminoácidos: Ala; 1,01 (1), Arg; 2,95 (3), Glx; 5,92 (6), Gly; 1,01 (1), His; 1,01 (1), Leu; 3 (3), Lys; 4,02 (4), Phe; 1,01 (1), Pro; 4,00 (4), Ser; 1,81 (2), Thr; 0,96 (1), Val; 0,97 (1)

Composto 69. [Ser³(4-Metilpentanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3343,0 (teórico: 3342,9), composição em aminoácidos: Ala; 1,00 (1), Arg; 2,97 (3), Glx; 5,86 (6), Gly; 1,02 (1), His; 1,01 (1), Leu; 2, Lys; 4,00 (4), Phe; 1,01 (1), Pro; 3,99 (4), Ser; 3,54 (4), Val; 0,98 (1)

Composto 75. [Lys⁷]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 850,5 (teórico: 850,0), composição em aminoácidos: Ser; 2,67 (3), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,00 (1), Lys; 1,00 (1)

(5) Exemplo da síntese de um terminal amina acilado derivado

Composto 6. [N-octanoil, Ser³]-Grelina (1-9)-amida;
C₇H₁₅CO-GSSFLSPEH-NH₂

Foi tratada resina Fmoc-amida (403 mg, 0,25 mmol, ABI, Ltd) com piperazina a 20%, durante 20 minutos e foi submetida, repetidamente, à introdução de Fmoc-aminoácido por HBTU/HOBt e eliminação de Fmoc por piperazina, sequencialmente, para construir Fmoc-Gly-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-resina. Após o tratamento com piperazina, o péptido em resina, resultante, (550 mg) foi lavado com NMP, foram aí adicionados DIPCI (126,2 mg, 1 mmol) e ácido octanóico (144,2 mg, 1,0 mmol), na presença de HOBt (135,1 mg, 1 mmol) e foi permitida a reacção durante 4 horas. A resina foi recuperada por filtração, lavada com NMP e, depois, com cloreto de metileno e seca sob vácuo, para originar cerca de 600 mg de péptido protegido em resina, em que o grupo amina da Gly do terminal amina foi adicionada de octanoílo. Este produto foi desprotegido com TFA (10 mL) (tratamento durante 30 minutos), para originar 200 mg de péptido bruto. A totalidade da amostra foi aplicada na YMC-Pack PROTEIN-RP (5 µm, C4, 20 mm x 250 mm) e foi eluída com um gradiente linear de 0 a 54% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (fluxo: 10 mL/min), durante 60 minutos. Foram obtidos cerca de 180 mg do produto pretendido.

Valores medidos: ESI-MS [M+H]; 1085,6 (teórico: 1085,2), composição em aminoácidos: Ser; 2,47 (3), Glx; 0,98 (1), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,02 (1), His; 1,09 (1), Pro; 0,96 (1)
(6) Exemplo da síntese de um derivado contendo serina, tendo uma cadeia lateral alquilo

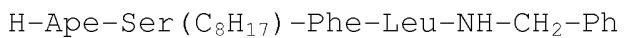
Composto 50. [Ser³(Octil)]-Grelina (1-7)-amida;
GSS (C₈H₁₇)FLSP-NH₂
Fmoc-Ser (C₈H₁₇)

Foi adicionado hidreto de sódio, sob arrefecimento em gelo, (3,19 g, 133 mmol) a uma solução de Boc-Ser (12,3 g, 53,9 mmol) em DMF (300 mL) e foi misturado à temperatura ambiente, durante 1,5 horas. Foi aí adicionado iodeto de octano (11,0 mL, 60,9 mmol) e foi misturado à temperatura ambiente, durante 16 horas. Após ter sido adicionada água (40 mL), gota a gota, à solução de reacção, sob arrefecimento em gelo, o solvente foi evaporado sob vácuo. Os resíduos resultantes foram purificados por aplicação a uma coluna de cromatografia em sílica gel (gel; Art9385, Merck, Ltd, eluente; diclorometano:metanol:ácido acético = 120:10:1), para originar 6,88 g de Boc-Ser (C₈H₁₇) (rendimento, 36,2%), sob a forma de uma matéria oleosa amarela pálida. Foi adicionado ácido trifluoroacético (120 mL) a este produto, Boc-Ser (C₈H₁₇) (6,88 g, 21,7 mmol), sob arrefecimento em gelo e foi misturado durante 0,5 horas à temperatura ambiente. Após o ácido trifluoroacético ter sido evaporado, os resíduos resultantes foram dissolvidos em éter dietílico (120 mL) e foi aí adicionado HCl 4 N-dioxano (22 mL) que foi misturado, durante 1 hora sob arrefecimento em gelo. Os cristais precipitados foram recuperados por filtração, para originar 5,23 g de H-Ser(C₈H₁₇).HCl (rendimento, 96,3%), sob a forma de cristais incolores. Após ter sido adicionada trietilamina (1,40 mL, 10 mmol) a uma suspensão (50 mL) deste produto H-Ser(C₈H₁₇).HCl (2,54 g, 10,0 mmol) em carbonato de hidrogénio de sódio a 10%, foi aí adicionada uma solução de Fmoc-Osu (5,00 g, 14,8 mmol) em 1,2-dimetoxietano (20 mL), gota a gota, ao longo de um período de 10 minutos e foi misturado à temperatura

ambiente, durante 16 horas. Os insolúveis foram filtrados, depois foi adicionado diclorometano ao filtrado e a fase orgânica foi separada e lavada com uma solução de NaCl a 13%. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado. Os resíduos resultantes foram purificados por aplicação coluna de cromatografia de sílica gel (gel; BW-300, Fuji Silicia Co, Ltd, eluente; diclorometano:metanol = 93:7), para originar 2,75 g de Fmoc-Ser (C_8H_{17}) (rendimento: 62,6%), sob a forma de cristais incolores. R_f = 0,45 (CHCl₃: MeOH = 9:1, sílica gel 60F₂₅₄, MERCK, Ltd). Fmoc-^DSer (C_8H_{17}): R_f = 0,45 (CHCl₃: MeOH = 9:1, sílica gel 60F₂₅₄, MERCK Co., Ltd).

Foi tratada Fmoc-amida resina (400 mg, 0,25 mmol, ABI, Ltd) com piperazina a 20%, durante 20 minutos e foi submetida, repetidamente, à introdução de Fmoc-aminoácido por HBTU/HOBt e eliminação de Fmoc por piperazina, sequencialmente, para construir Fmoc-Ser(Bu^t)-Ser(C_8H_{17})-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-pro-resina. Após Boc-Gly ter sido, finalmente, introduzido por DCC/HOBt, uma parte (250 mg) do péptido protegido em resina, resultante, foi tratado com TFA (10 mL), durante 30 minutos. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi concentrado, seguido pela adição de éter aos resíduos resultantes, para originar cerca de 120 mg de péptido bruto, sob a forma de precipitados. Este produto foi dissolvido em AcOH a 5% (10 mL), foi aplicado à YMC-Pack-ODS-A (5 µm, 20 mm x 250 mm) e foi eluído com um gradiente linear de 0 a 60% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar cerca de 40 mg do produto pretendido.

Composto 84. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina
(3-5)-benzilamida;



Foi colocada oxima resina (230 mg/0,25 mmol, Novabiochem, Ltd) num recipiente de reacção equipado com um filtro de vidro e Boc-Leu-OH · H₂O (190 mg, 0,75 mmol), previamente dissolvido em cloreto de metíleno (DCM) e seco sobre MgO₄, DCC (160 mg, 0,75 mmol), foram aí adicionados 5 mL de DCM e foi agitado durante a noite. O produto de reacção foi lavado várias vezes com uma quantidade adequada de DCM, DCM/EtOH (1:1) e DCM, por esta ordem. Após a introdução de Leu, <1> foram aí adicionados 10 mL de TFA/DCM a 25%, foi agitado durante 30 minutos e a resina foi lavada, várias vezes, com DCM, álcool isopropílico (iPrOH), DCM e DMF, por esta ordem e <2> foi introduzida no recipiente de reacção uma solução preparada pela dissolução de 0,75 mmol (3 equivalentes) de Boc-aminoácido, 0,75 mmol (3 equivalentes) de TBTU e 0,75 mmol (3 equivalentes) de HOBr e, depois, pela adição de 1,25 mmol (5 equivalentes) de DIPEA em 5 mL DMF num frasco Erlenmeyer e foi agitado durante 1 hora; esta operação foi realizada, repetidamente, para condensar os aminoácidos sequencialmente. Finalmente, foram obtidos 370 mg de resina Boc-NH-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Oxima. A resina foi suspensa em cerca de 5 mL de DMF, foram aí adicionados cloridrato de benzilamina (180 mg, 1,25 mmol), trietilamina (173 µL, 1,25 mmol) e ácido acético (72 µL, 1,25 mmol) e a mistura foi agitada. Após 24 horas, a resina foi filtrada, o filtrado foi evaporado e o péptido protegido com Boc, resultante, foi precipitado em 10 mL de HCl 1 N. Este produto foi lavado com água e seco, foram aí adicionados 5 mL de TFA e foi deixado reagir durante 30 minutos, eliminando, deste modo, Boc.

O TFA foi evaporado e o produto foi precipitado com éter (Et_2O), pelo que, foi obtido o produto pretendido [*N*-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-benzilamida, 110 mg. Os compostos 82, 83 e 85 foram sintetizados da mesma forma.

Os seguintes derivados peptídicos tendo alquilserina, excepto os Compostos 82 a 85, foram produzidos da mesma forma que na produção do Composto 50, descrita acima.

Os resultados da espectrometria de massa e da análise da composição em aminoácidos dos derivados petídicos tendo alquilserina, são resumidos abaixo.

Composto 17. [Ser³(Octil)]-hGrelina

ESI-MS; 3357,0 (teórico: 3356,9), composição em aminoácidos: Ser; 2,92 (3+1), Glx; 5,94 (6), Gly; 1,00 (1), Ala; 0,98 (1), Val; 0,99 (1), Leu; 2, Phe; 1,13 (1), Lys; 4,04 (4), His; 1,09 (1), Arg; 3,01 (3), Pro; 3,89 (4)

Composto 50. [Ser³(Octil)]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 805,5 (teórico: 805,0), composição em aminoácidos após hidrólise com ácido propiónico-ácido clorídrico (50/50), a 150 °C, durante 2 horas: Ser; 0,86 (2+1), Gly; 1,01 (1), Leu; 1, Phe; 1,06 (1), Pro; 0,95 (1)

Composto 51. [Ser³(Octil), ^DPhe⁴]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 805,4 (teórico: 805,0), composição em aminoácidos após hidrólise com ácido propiónico-ácido clorídrico (50/50), a 150 °C, durante 2 horas: Ser; 0,97 (2+1), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,05 (1), Pro; 1,16 (1)

Composto 52. [^DSer³(Octil)]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 805,4 (teórico: 805,0), composição em aminoácidos após hidrólise com ácido propiónico-ácido clorídrico (50/50), a 150 °C, durante 2 horas: Ser; 1,51 (2+1), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,00 (1), Pro; 1,00 (1)

Composto 53. [^DSer³(Octil), ^DPhe⁴]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 805,5 (teórico: 805,0), composição em aminoácidos após hidrólise com ácido propiónico-ácido clorídrico (50/50), a 150 °C, durante 2 horas: Ser; 1,51 (2+1), Gly; 1,00 (1), Leu; 1, Phe; 1,00 (1), Pro; 1,01 (1)

Composto 67. [Ser³(Bzl)]-hGrelina

ESI-MS M; 3335,0 (teórico: 3334,8), composição em aminoácidos: Ala; 1,00 (1), Arg; 2,96 (3), Glx; 5,92 (6), Gly; 1,00 (1), His; 1,01 (1), Leu; 2 (2), Lys; 4,00 (4), Phe; 1,02 (1), Pro; 4,08 (4), Ser; 3,58 (4), Val; 0,98 (1)

Composto 76. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil), Lys⁵]-Grelina (3-5)-amida

ESI-MS [M+H]; 591,5 (teórico: 590,8), composição em aminoácidos: Ser; 0,45 (1), Phe; 1, Lys; 1,00 (1)

Composto 77. [*N*-Aminopentanoilo, ^DSer³(Octil), ^DPhe⁴, Lys⁵] -Grelina (3-5)-amida

ESI-MS [M+H]; 591,5 (teórico: 590,8), composição em aminoácidos: Ser; 0,45 (1), Phe; 1, Lys; 1,01 (1)

Composto 78. [Aib¹, His², Ser³(Octil), Lys⁵] -Grelina (1-5)-amida

ESI-MS [M+H]; 714,6 (teórico: 713,9), composição em aminoácidos: Ser; 0,45 (1), Phe; 1, His; 1,01 (1), Lys; 1,00 (1)

Composto 79. [Aib¹, His², ^DSer³(Octil), ^DPhe⁴, Lys⁵] -Grelina (1-5)-amida

ESI-MS [M+H]; 714,5 (teórico: 713,9), composição em aminoácidos: Ser; 0,44 (1), Phe; 1, His; 1,00 (1), Lys; 1,01 (1)

Composto 81. [*N*-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)] -Grelina (3-5)-amida

ESI-MS [M+H]; 576,5 (teórico: 575,8), composição em aminoácidos: Ser; 0,49 (1), Leu; 1, Phe; 0,99 (1)

Composto 82. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina
(3-5)-metilamida

ESI-MS [M+H]; 590,6 (teórico: 589,8), composição em
aminoácidos: Ser; 0,49 (1), Leu; 1, Phe; 0,99 (1)

Composto 83. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina
(3-5)-etilamida

ESI-MS [M+H]; 604,3 (teórico: 603,8), composição em
aminoácidos: Ser; 0,50 (1), Leu; 1, Phe; 0,99 (1)

Composto 84. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina
(3-5)-benzilamida

ESI-MS [M+H]; 666,5 (teórico: 665,9), composição em
aminoácidos: Ser; 0,46 (1), Leu; 1, Phe; 0,98 (1)

Composto 85. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina
(3-5)-aminoetilamida

ESI-MS [M+H]; 619,6 (teórico: 618,9), composição em
aminoácidos: Ser; 0,47 (1), Leu; 1, Phe; 0,99 (1)

(7) Exemplo da síntese de um derivado contendo cisteína
tendo uma cadeia lateral alquilo

Composto 48. [Cys³(Octil)]-Grelina (1-7)-NH₂; GSC(C₈H₁₇)
FLSP-NH₂

Foi tratado Fmoc-amida-resina (403 mg, 0,25 mmol, ABI, Ltd) com piperazina a 20%, durante 20 minutos e foi submetido, repetidamente, à introdução de Fmoc-aminoácido por HBTU/HOBt e eliminação de Fmoc por piperazina, sequencialmente, para construir Fmoc-Ser(Bu^t)-Cys(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-Pro resina. Após Boc-Gly ter sido, finalmente, introduzido por DCC/HOBt, o péptido protegido em resina, resultante, (550 mg) foi tratado com TFA (10 mL), durante 30 minutos. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi concentrado, seguido pela adição de éter aos resíduos resultantes, para originar cerca de 120 mg de péptido bruto, sob a forma de precipitados. Este produto foi dissolvido em 10 mL de ácido acético a 5%, foi aplicado à YMC-Pack-ODS-A (5 µm, 20 mm x 250 mm) e foi eluído com um gradiente linear de 0 a 60% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar cerca de 44 mg do produto pretendido.

Composto 68. [Cys³(Trt)]-hGrelina;

GSC(C-Ph₃)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Foi tratado Fmoc-Arg(Pmc)-resina (403 mg, 0,25 mmol, ABI, Ltd) com piperazina a 20%, durante 20 minutos e foi submetido, repetidamente, à introdução de Fmoc-aminoácido por HBTU/HOBt e eliminação de Fmoc por piperazina, sequencialmente, para construir Fmoc-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t) -

His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP resina. Após Boc-Gly ter sido, finalmente, introduzido por DCC/HOBt, foi recuperado o péptido protegido, em resina, resultante, (1,4 g). Foi adicionado TFA (15 mL) a uma parte (400 mg) da resina, resultante e foi misturado, à temperatura ambiente, durante 1 hora. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi concentrado, seguido pela adição de éter aos resíduos resultantes, para formar precipitados. Foram dissolvidos cerca de 90 mg de precipitados em 40 mL de água, depois, foram aplicados à YMC-Pack-PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250 mm) e foram eluídos com um gradiente linear desde 0 a 54% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar cerca de 60 mg do produto pretendido.

Os seguintes derivados petídicos, tendo alquilcisteína, foram produzidos da mesma forma que na produção dos Compostos 48 ou 68, descrita acima.

Os resultados da espectrometria de massa e da análise da composição em aminoácidos dos derivados petídicos, tendo alquilcisteína, são resumidos abaixo.

Composto 18. [Cys³(Octil)]-rGrelina

ESI-MS; 3317,0 (teórico: 3316,9), composição em aminoácidos: Ser; 2,69 (3), Glx; 5,90 (6), Gly; 1,00 (1), Ala; 1,99 (2), Leu; 2, Phe; 1,02 (1), Lys; 4,97 (5), His; 0,99 (1), Arg; 1,98 (2), Pro; 3,87 (4)

Composto 48. [Cys³(Octil)]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 821,7 (teórico: 821,1), composição em aminoácidos após hidrólise com ácido propiónico-ácido clorídrico (50/50), a 150 °C, durante 2 horas: Ser; 0,60 (2), Gly; 1,08 (1), Leu; 1, Phe; 1,06 (1), Pro; 0,96 (1)

Composto 49. [Cys³(Octil), ^DPhe⁴]-Grelina (1-7)-amida

ESI-MS [M+H]; 821,6 (teórico: 821,1), composição em aminoácidos após hidrólise com ácido propiónico-ácido clorídrico (50/50), a 150 °C, durante 2 horas: Ser; 0,58 (2), Gly; 1,02 (1), Leu; 1, Phe; 1,06 (1), Pro; 0,97 (1)

Composto 68. [Cys³(Trt)]-hGrelina

ESI-MS 3503,0 (teórico: 3503,1), composição em aminoácidos: Ser; 2,42 (3), Glx; 5,77 (6), Gly; 1,00 (1), Ala; 1,01 (1), Val; 0,94 (1), Leu; 2, Phe; 0,99 (1), Lys; 3,94 (4), His; 0,99 (1), Arg; 2,92 (3), Pro; 3,81 (4)

(8) Exemplo da síntese de um derivado peptídico contendo N-metilaminoácidos

Composto 86. [*N*-Aminopentanoilo, Ser³(Octil), MePhe⁴, MeLeu⁵] -Grelina (3-5)-amida; NH₂-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-NH₂

Foi colocado Fmoc-amida resina (0,40 g, 0,25 mmol) num recipiente de reacção equipado com um filtro de vidro, foram aí adicionados 15 mL de piperidina a 20% em NMP e foi agitado durante 20 minutos, removendo, deste modo, o grupo Fmoc. Depois, foram aí adicionados 15 mL de NMP, 1,0 mmol (4 equivalentes) de Fmoc-MeLeu-OH, 1,0 mmol (4 equivalentes) de TBTU, 1,0 mmol (4 equivalentes) de HOBt e 1,0 mmol (4 equivalentes) de DIPEA e foram agitados durante 1 hora, para condensar Fmoc-MeLeu. Depois, a cadeia peptídica foi extendida por realização, repetida, da remoção do grupo Fmoc em piperidina a 20% e condensação do Fmoc-aminoácido (3 equivalentes) por hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfónio (3 equivalentes), na presença de 2,25 mmol (9 equivalentes) de DIPEA. A conclusão da reacção de condensação foi confirmada por desprotecção de uma pequena quantidade da resina com TFA e pelo seu exame por HPLC e espectrometria de massa (MS). Após ter sido obtido Boc-NH-(CH₂)₄-CO-Ser(O-C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-resina, esta resina foi tratada com TFA durante 30 minutos, pelo que a resina foi quebrada para desproteger o péptido. Após o TFA ter sido evaporado, o péptido foi lavado com éter (Et₂O), para originar 120 mg de NH₂-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-NH₂. Este produto foi aplicado à YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250 mm) e foi eluído com um gradiente linear de 0 a 54% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar 70 mg do produto pretendido. Após este derivado ter sido hidrolizado com ácido propiónico-HCl (50/50), a 150 °C durante 2 horas, a quantidade do péptido foi

quantificada utilizando a proporção entre a área do pico do ácido aminopentanóico detectado no analisador de aminoácidos e a do padrão de ácido aminopentanóico 10 nmol.

ESI-MS [M+H]⁺; 604,5 (teórico: 603,8), aminoácidos detectados após hidrólise com ácido propiónico HCl (50/50), a 150 °C durante 2 horas: Ser, Ape.

(9) Síntese de um derivado persulfureto misto

Composto 57. [Cys³(S-Heptil)]-hGrelina;

GSC(S-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Foi adicionado um reagente desprotector (15 mL) consistindo em TFA a 88%-fenol a 5%-TIPS a 2%-H₂O a 5%, a um péptido protegido em resina-HMP (1 g), obtido por síntese, da mesma forma que na produção do Composto 68 e, depois, foi misturado à temperatura ambiente, durante 2 horas. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi concentrado, seguido pela adição de éter aos resíduos resultantes, pelo que, foram obtidas cerca de 550 mg de pó de [Cys³]-hGrelina bruta. Este produto foi aplicado à YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250 mm) e foi eluído com um gradiente linear de 0 a 54% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As frações pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar 300 mg de [Cys³]-hGrelina (1-28). Foram dissolvidos 40 mg (11,4 µmol) deste produto em água (20 mL), foi aí adicionado 1 mL de solução de 4,4'-ditiodipiridina (7,5 mg, 34,2 µmol) em acetonitrilo e foi deixado durante 1 hora. Após ter sido confirmada a conclusão da

reacção, a solução de reacção foi lavada várias vezes com clorofórmio, para remover o excesso de 4,4'-ditiodipiridina e do derivado piridona. A camada aquosa (10 mL) contendo [tiopiridilCys³]-hGrelina (1-28) foi ajustada para pH 7,4 com NH₃ aq. A 5 % e foi aí adicionada uma solução de 1-heptano[sic.]tiol (4,5 mg, 34,2 µmol), em 2 mL acetonitrilo. Após 1 hora, a solução de reacção foi aplicada à YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250 mm) e foi eluída com um gradiente linear de 0 a 54% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar 15 mg do produto pretendido.

Composto 57. [Cys³(S-Heptil)]-hGrelina

ESI-MS 3391,0 (teórico: 3391,0), composição em aminoácidos: Ser; 2,76 (3), Glx; 5,81 (6), Gly; 0,99 (1), Ala; 1,01 (1), Val; 0,95 (1), Leu; 2, Phe; 0,99 (1), Lys; 3,95 (4), His; 0,99 (1), Arg; 2,93 (3), Pro; 3,84 (4)

(10) Exemplos da síntese de um derivado tendo uma amida numa cadeia lateral na 3^a posição e éster na direcção inversa

Composto 55. [Asp³(NH-Heptil)]-hGrelina;

GSD(NH-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Foi tratado Fmoc-Arg(Pmc)-HM-resina (403 mg, 0,25 mmol, ABI, Ltd) com piperazina a 20%, durante 20 minutos e foi submetido, repetidamente, à introdução de Fmoc-aminoácido por

HBTU/HOBt e eliminação de Fmoc por piperazina, sequencialmente, para construir Fmoc-Ser(Bu^t)-Asp(OPis)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP resina. Após Boc-Gly ter sido, finalmente, introduzido por DCC/HOBt, o péptido protegido, em resina, resultante, (1,3 g) foi tratado com uma solução de TFA-cloreto de metileno a 4% (15 mL), durante 15 minutos. O péptido em resina foi recuperado por filtração, foi lavado várias vezes com cloreto de metileno (30 mL), foi lavado com DIEA a 4% (10 mL) e, depois, com cloreto de metileno (30 mL).

O péptido de-Pis em resina, resultante, (cerca de 1,3 g) foi dilatado com NMP (10 mL), foram aí adicionados cloridrato de carbodiimida solúvel em água (191,7 mg, 1,0 mmol), HOBt (135,2 mg, 1,0 mmol) e n-heptilamina (115,2 mg, 1,0 mmol) e foi permitida a reacção durante 8 horas.

A resina foi recuperada por filtração, lavada com NMP e cloreto de metileno e seca sob vácuo, para originar cerca de 1,2 g de péptido protegido em resina, em que o resíduo Asp 3 se encontrava heptilamidado. Foi aí adicionado um reagente de desprotecção (10 mL), consistindo em TFA a 88%-fenol a 5%-TIPS a 2%-H₂O a 5% e foi misturado à temperatura ambiente, durante 2 horas. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi concentrado, seguido pela adição de éter aos resíduos resultantes, para formar precipitados. Os precipitados foram recuperados por filtração e secos, para originar cerca de 550 mg de péptido bruto.

Foram dissolvidos 200 mg deste produto em 10 mL água e foram aplicados à YMC-PackPROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250 mm) e

foram eluídos com um gradiente linear de 0 a 54% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar cerca de 120 mg do produto pretendido.

Composto 61. [Lys³(Octanoil)]-hGrelina;

GSK (CO-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Foi tratado Fmoc-Arg(Pmc)-HM-resina (403 mg, 0,25 mmol, um produto de ABI, Ltd) com piperazina a 20%, durante 20 minutos e foi submetido, repetidamente, à introdução de Fmoc-aminoácido por HBTU/HOBt e eliminação de Fmoc por piperazina, sequencialmente, para construir Boc-Gly-Ser(tBu)-Lys(Mtt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP resina. Foram tratados cerca de 300 mg do péptido protegido em resina, resultante, com solução de TFA 1%-TIPS 5%-cloreto de metíleno (15 mL), durante 60 minutos.

O péptido em resina foi recuperado por filtração e lavado várias vezes com cloreto de metíleno (30 mL), lavado com DIEA a 10% (10 mL) e, depois, com cloreto de metíleno (30 mL). O péptido de-Mtt em resina resultante (cerca de 300 mg) foi dilatado com NMP (2 mL), foi aí adicionado ácido octanóico (40 µL, 0,25 mmol) e DCC (52 mg, 0,25 mmol), na presença de HOEt (34 mg, 0,25 mmol) e foi permitida a reacção durante a noite.

A resina foi recuperada por filtração, lavada com NMP e, depois, com cloreto de metileno e seca sob vácuo, para originar cerca de 300 mg de péptido protegido em resina, em que o 3º resíduo de lisina foi adicionado de octanoílo. Foi aí adicionado um reagente desprotecção (5 mL) consistindo em TFA a 88%-fenol a 5%-TIPS a 2%-H₂O a 5% e foi misturado à temperatura ambiente, durante 2 horas. A resina foi removida por filtração e o filtrado foi concentrado, seguido pela adição de éter aos resíduos resultantes, para formar precipitados. Os precipitados foram separados por filtração e foi seco, para originar cerca de 234 mg de péptido bruto.

Este produto foi dissolvido em 6 mL de ácido acético, foi aplicado à YMC-Pack ODS-A (5 µm, 20 mm x 250 mm) e foi eluído com um gradiente linear de 0 a 60% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar cerca de 100 mg de pó. Este produto foi dissolvido em 2 mL de ácido acético a 50%, foi aplicado à YMC-PackPROTEIN-RP (5 µm, C4, 20 mm x 250 mm) e foi eluído com um gradiente linear de 0 a 60% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar cerca de 52 mg de pó.

Os compostos seguintes foram produzidos, da mesma forma que na preparação dos Compostos 55 ou 61, descrita acima.

Os resultados da espectrometria de massa e da análise da composição em aminoácidos dos derivados petídicos sintetizados pelo método Fmoc convencional, são resumidos abaixo.

Composto 54. [Asp³(O-Heptil)]-hGrelina (1-28)

ESI-MS 3371,0 (teórico: 3370,9), composição em aminoácidos:
Asx; 0,99 (1), Ser; 2,70 (3), Glx; 5,87 (6), Gly; 1,01 (1), Ala;
1,01 (1), Val; 0,94 (1), Leu; 2, Phe; 1,00 (1), Lys; 4,02 (4),
His; 1,00 (1), Arg; 2,98 (3), Pro; 3,84 (4)

Composto 55. [Asp³(NH-Heptil)]-hGrelina (1-28)

ESI-MS 3370,0 (teórico: 3369,9), composição em aminoácidos:
Asx; 0,88 (1), Ser; 2,95 (3), Glx; 5,97 (6), Gly; 1,21 (1), Ala;
1,03 (1), Val; 0,98 (1), Leu; 2, Phe; 1,00 (1), Lys; 3,94 (4),
His; 0,92 (1), Arg; 2,91 (3), Pro; 3,99 (4)

Composto 56. [Dap³(Octanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3370,0 (teórico: 3369,9), composição em
aminoácidos: Ala; 1,02 (1), Arg; 2,94 (3), Glx; 5,94 (6), Gly;
1,00 (1), His; 0,91 (1), Leu; 2 (2), Lys; 3,93 (4), Phe; 0,99
(1), Pro; 4,01 (4), Ser; 2,88 (3), Val; 0,98 (1), Dap; N.D.

Composto 58. [Adod³]-hGrelina (1-28)

ESI-MS M; 3355,0 (teórico: 3355,0), composição em
aminoácidos: Ala; 1,01 (1), Arg; 2,91 (3), Glx; 5,95 (6), Gly;
1,01 (1), His; 0,91 (1), Leu; 2 (2), Lys; 3,94 (4), Phe; 0,99
(1), Pro; 4,02 (4), Ser; 2,88 (3), Val; 0,96 (1)

Composto 61. [Lys³(Octanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3412,0 (teórico: 3412,0), composição em aminoácidos: Ala; 1,05 (1), Arg; 3,05 (3), Glx; 6,02 (6), Gly; 1,00 (1), His; 1,00 (1), Leu; 2 (2), Lys; 5,11 (5), Phe; 0,97 (1), Pro; 4,20 (4), Ser; 2,68 (3), Val; 1,00 (1)

Composto 62. [Trp³]-hGrelina

ESI-MS M; 3343,0 (teórico: 3343,9), composição em aminoácidos: Ala; 1,00 (1), Arg; 3,03 (3), Glx; 5,94 (6), Gly; 1,01 (1), His; 1,01 (1), Leu; 2 (2), Lys; 4,00 (4), Phe; 0,99 (1), Pro; 3,96 (4), Ser; 2,60 (3), Trp; N.D., Val; 0,98 (1)

Composto 63. [Phe³]-hGrelina

ESI-MS M; 3305,0 (teórico: 3304,8), composição em aminoácidos: Ala; 0,99 (1), Arg; 2,96 (3), Glx; 5,86 (6), Gly; 1,00 (1), His; 1,00 (1), Leu; 2 (2), Lys; 3,98 (4), Phe; 2,01 (2), Pro; 3,99 (4), Ser; 2,67 (3), Val; 0,98 (1)

Composto 64. [Cha³]-hGrelina

ESI-MS M; 3411,0 (teórico: 3410,9), composição em aminoácidos: Ala; 1,02 (1), Arg; 3,01 (3), Glx; 5,92 (6), Gly; 1,01 (1), His+Cha; 2,01 (1+1), Leu; 2 (2), Lys; 4,02 (4), Phe; 1,01 (1), Pro; 4,03 (4), Ser; 2,72 (3), Val; 0,97 (1)

Composto 65. [2-^LNal³]-hGrelina

ESI-MS M; 3354,0 (teórico: 3354,9), composição em aminoácidos: Ala; 1,00 (1), Arg; 2,95 (3), Glx; 5,87 (6), Gly; 1,02 (1), His; 1,01 (1), Leu; 2 (2), Lys; 3,98 (4), Phe; 1,01 (1), Pro; 3,94 (4), Ser; 2,73 (3), Val; 0,97 (1), Nal; N.D. (1)

Composto 66. [2-^DNal³]-hGrelina

ESI-MS M; 3355,0 (teórico: 3354,9), composição em aminoácidos: Ala; 1,02 (1), Arg; 2,95 (3), Glx; 5,96 (6), Gly; 1,00 (1), His; 0,92 (1), Leu; 2(2), Lys; 3,94 (4), Phe; 0,99 (1), Pro; 4,02 (4), Ser; 2,91 (3), Val; 0,98 (1), Nal; N.D. (2)

Composto 70. [Leu³]-hGrelina

ESI-MS M; 3270,0 (teórico: 3270,8), composição em aminoácidos: Ala; 0,99 (1), Arg; 2,95 (3), Glx; 5,88 (6), Gly; 1,01 (1), His; 1,00 (1), Leu; 3 (3), Lys; 3,96 (4), Phe; 1,00 (1), Pro; 3,89 (4), Ser; 2,65 (3), Val; 0,97 (1)

Composto 71. [Ile³]-hGrelina

ESI-MS M; 3270,0 (teórico: 3270,8), composição em aminoácidos: Ala; 0,98 (1), Arg; 2,96 (3), Glx; 5,87 (6), Gly; 0,99 (1), His; 1,01 (1), Ile; 0,98 (1), Leu; 2 (2), Lys; 3,97 (4), Phe; 1,00 (1), Pro; 3,97 (4), Ser; 2,65 (3), Val; 0,98 (1)

Composto 72. [Lys³(Octanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3286,0 (teórico: 3285,8), composição em aminoácidos: Ala; 1,02 (1), Arg; 2,94 (3), Glx; 5,95 (6), Gly; 0,99 (1), His; 0,92 (1), Leu; 2 (2), Lys; 4,92 (5), Phe; 0,99 (1), Pro; 4,02 (4), Ser; 2,91 (4), Val; 0,99 (1)

Composto 73. [Nle³]-hGrelina

ESI-MS M; 3270,0 (teórico: 3270,8), composição em aminoácidos: Ala; 1,01 (1), Arg; 2,98 (3), Glx; 5,92 (6), Gly; 1,02 (1), His; 1,01 (1), Leu; 2 (2), Lys; 4,01 (4), Phe; 1,01 (1), Pro; 4,01 (4), Ser; 2,71 (3), Val; 0,98 (1), Nle; N.D. (1)

Composto 74. [Val³]-hGrelina

ESI-MS M; 3256,0 (teórico: 3256,8), composição em aminoácidos: Ala; 0,98 (1), Arg; 2,96 (3), Glx; 5,84 (6), Gly; 1,00 (1), His; 1,01 (1), Leu; 2 (2), Lys; 3,97 (4), Phe; 0,99 (1), Pro; 3,94 (4), Ser; 2,64 (3), Val; 1,97 (2)

Composto 80. [Aib¹, His², ^DNal³, ^DPhe⁴, Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida; Ipamorelina

ESI-MS [M+H]; 712,5 (teórico: 711,9), composição em aminoácidos: Phe; 1, His; 1,00 (1), Lys; 1,00 (1)

Exemplo 11. Comparação da actividade entre compostos do tipo peptídico derivados da grelina

As actividades de libertação de Ca dos compostos do tipo peptídico derivados da grelina, sintetizados no Exemplo 10 e do péptido da Grelina natural foram medidas, da mesma forma que no Exemplo 1.

(1) Modificação de uma cadeia lateral da 3^a serina

A. Posição de um grupo octanoílo

A característica estrutural significativa da grelina reside no grupo octanoílo do grupo hidroxilo da 3^a serina. Em primeiro lugar, foi examinado se é vantajoso para a actividade que a posição de serina a ser octanilizada seja a 3^a posição. Neste exame, foi utilizada a actividade intracelular de libertação de Ca em células CHO expressando o receptor da GSH de rato, como o indicador.

Com base na grelina (1-9) amida (um derivado de grelina de cadeia curta) cujo valor de EC₅₀ se manteve a 5,4 nM, foram sintetizados [serina² (octanoil), serina³]-grelina (1-9) amida, [serina² (octanoil)]-grelina (1-9) amida e [N^α-octanoil serina³]-grelina (1-9) amida e foi examinada a sua actividade intracelular de libertação de Ca.

Os resultados são resumidos na Tabela 4.

Tabela 4

Actividade do derivado da grelina 1	
Estrutura do Composto	EC ₅₀ da actividade de libertação de Ca (nM)
1. Grelina humana GSS(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,3
2. Grelina de rato GSS(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	1,5
3. Grelina (1-9)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂	5,4
4. [Sez²(Octanoil), Ser³]-Grelina (1-9)-amida H-Gly-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂	1100
5. [Ser²(Octanoil)]-Grelina (1-9)-amida H-Gly-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂	1400
6. [N-octanoil, Ser³]-Grelina (1-9)-amida C ₇ H ₁₅ CO-Gly-Leu-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂	>10000

A actividade foi reduzida para cerca de 1/200, por transferência de um grupo octanoílo da 3^a serina para 2^a serina, na grelina humana (EC₅₀ = 1100 nM).

O derivado tendo grupos octanoílo em ambas as 2^a e 3^a posições apresentou, também, uma actividade reduzida (EC₅₀ = 1400 nM).

Além disso, a actividade foi relativamente enfraquecida pela adição de N-octanoílo, apenas, no grupo amina do terminal amina (EC₅₀ > 10000 nM).

A partir destes resultados, foi verificado que a posição do aminoácido modificada com um grupo octanoílo é, particularmente, de um modo preferido, a 3^a posição na molécula da grelina.

B. Comprimento da cadeia de um ácido gordo

A actividade intracelular de libertação de Ca do derivado sem octanoílo, derivado da grelina de rato por eliminação do grupo octanoílo da cadeia lateral da 3^a serina foi de 3500 nM, em comparação com a actividade da grelina adicionada de octanoílo (2,6 nM) e, deste modo, é evidente que o grupo octanoílo da cadeia lateral da 3^a serina desempenha um papel muito importante na expressão da actividade.

Consequentemente, foi examinada a relação entre a actividade e o número de átomos de carbono do grupo acilo da cadeia lateral da serina, na grelina de rato, utilizando vários ácidos gordos saturados. Ou seja, foram determinadas as actividades de libertação de Ca intracelular dos derivados da grelina, em que o grupo hidroxilo da 3^a serina foi acilado com um grupo acetilo ($\text{CH}_3\text{CO}-$), grupo propionilo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-$), grupo butirilo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$), grupo hexanoílo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CO}-$), grupo decanoílo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$), grupo lauroílo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$) e grupo palmitoílo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$).

Os resultados são resumidos na Tabela 5.

Tabela 5

Actividade do derivado da grelina 2	
Estrutura do Composto	EC ₅₀ da actividade de libertação de Ca (nM)
7. [Ser³]-grelina de rato GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	3500
8. [Ser³(Acetil)]-rGrelina GSS(CO-CH ₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	780
9. [Ser³(Propionil)]-rGrelina GSS(CO-C ₂ H ₅)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	n.t.
10. [Ser³(Butiril)]-rGrelina GSS(CO-C ₃ H ₇)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	280
11. [Ser³(Hexanoil)]-rGrelina GSS(CO-C ₅ H ₁₁)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	16
12. [Ser³(Decanoil)]-rGrelina GSS(CO-C ₉ H ₁₉)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	1, 7
13. [Ser³(Laurooil)]-rGrelina GSS(CO-C ₁₁ H ₂₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	2, 4
14. [Ser³(Palmitoil)]-rGrelina GSS(CO-C ₁₅ H ₃₁)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	6, 5

Na tabela, "n.t." indica que a amostra não foi testada.

A influência do comprimento da cadeia do ácido gordo sobre a actividade foi incrementalmente significativa, com um valor de EC₅₀ de 780 nM para os derivados da grelina tendo um grupo acetilo (C2) e um valor de EC₅₀ de 280 nM para os derivados da grelina tendo um grupo butanoílo (C4), os derivados da grelina tendo o grupo hexanoílo (C7) ocasionaram um aumento adicional na actividade de libertação de Ca (valor de EO₅₀, 16 nM) e o grupo

octanoílo da grelina permitiu que actividade de libertação de Ca alcançasse um máximo (valor de $E_{O_{50}}$, 1,5 nM). Mesmo os derivados da grelina tendo o grupo decanoílo (C10) mantiveram uma actividade de libertação de Ca (valor de $E_{O_{50}}$, 1,7 nM) semelhante à da grelina e, além disso, o valor de $E_{C_{50}}$ foi de 2,4 nM para os derivados da grelina tendo um grupo lauroílo (C12) e 6,5 nM para os derivados da grelina tendo um grupo palmitoílo (C16), indicando, deste modo, que a actividade de libertação de Ca foi mantida, mesmo quando foi aumentado o comprimento da cadeia de ácido gordo.

C. Substituição de vários grupos acilo

Os derivados da grelina humana foram preparados pela ligação de ácido 3-fenilpropiónico ($\text{HO}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), como um exemplo típico de um ácido gordo aromático, ácido 3-octenóico ($(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{COH})$), como um exemplo típico de um ácido gordo não saturado ou ácido 4-metilpentanóico ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), como um exemplo típico de um ácido gordo ramificado, em vez de ácido gordo saturado, através de uma ligação éster, ao grupo hidroxilo da 3^a serina e a sua actividade foi examinada.

D. Conversão em grupos alquilo

Podem ser formados derivados da grelina, quimicamente estáveis, pela conversão da ligação éster, quimicamente instável, numa ligação éter ou tioéter, quimicamente estável ou semelhante. No entanto, será óbvio que a manutenção da actividade é uma imposição para esta conversão.

Consequentemente, foram examinados para a sua actividade, um derivado de éter da grelina humana em que a 3^a serina foi octilada (C_8H_{17}) e um derivado tioéter da grelina de rato em que a 3^a serina foi substituída por uma cisteína e foi octilada.

Além disso, foi preparado um derivado da grelina humana em que a 3^a serina foi benzilada (-CH₂Ph) e um derivado da grelina humana em que a 3^a serina foi substituída por cisteína e foi tritilada (-C(Ph)₃).

Os resultados são resumidos na Tabela 6. São mostradas as actividades de libertação de Ca do derivado da grelina humana, em que a 3^a serina foi benzilada (-CH₂Ph) e do derivado da grelina humana, em que a 3^a serina foi substituída por cisteína e tritilada (-C(Ph)₃), assim como, respectivamente, a dos Compostos 67 e 68, na Tabela 13. É, também, mostrada a actividade de libertação de Ca do derivado da grelina humana, em que foi ligado ácido 4-metilpentanóico ((CH₃)₂CH-CH₂CH₂CO₂H) ao grupo hidroxilo da 3^a serina, através de uma ligação éster, assim como, a do Composto 69, na Tabela 13.

Tabela 6

Actividade do derivado da grelina 3	
Estrutura do Composto	EC ₅₀ da actividade de libertação de Ca (nM)
15. [Ser³(3-Fenilpropionil)]-hGrelina GSS(CO-CH ₂ CH ₂ Ph)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,4
16. [Ser³(3-Octenoil)]-hGrelina GSS(CO-CH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ CH ₃)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,7
17. [Ser³(Octil)]-hGrelina GSS(C_8H_{17})FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,2
18. [Cys³(Octil)]-rGrelina GSC(C_8H_{17})FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	5,4

A introdução do grupo 3-octenoílo, como um exemplo de ácido gordo não saturado, na cadeia lateral da 3^a serina, ocasionou uma actividade de libertação de Ca semelhante à actividade dos derivados da grelina tendo um grupo octanoílo ($EC_{50} = 1,7\text{ nM}$).

De um modo interessante, mesmo se foi introduzido um grupo fenilpropionilo, a actividade de libertação de Ca foi mantida elevada ($EC_{50} = 1,4\text{ nM}$) e, mesmo se foi introduzido um grupo 4-metilpentanoílo (C6), como um exemplo de ácido gordo ramificado, o valor da EC_{50} foi de 4,4 nM, indicando que foi mantida a actividade de libertação de Ca (Composto 69 na Tabela 13), revelando, deste modo, que é não sempre necessário que o grupo acilo da cadeia lateral da 3^a serina seja um grupo alcanoílo de cadeia linear.

Além disso, os valores de EC_{50} dos derivados éter e tioéter, que era expectável serem quimicamente estáveis, em que a 3^a serina ou a 3^a cisteína foram octiladas, foram mantidos, respectivamente, em 1,2 nM e 5,4 nM, revelando deste modo que nem sempre é necessário que a cadeia lateral do resíduo de aminoácido na 3^a posição seja um grupo acilo.

Além disso, os valores de EC_{50} das grelinas em que o resíduo de aminoácido da 3^a posição foi substituído por Ser(Bzl) [ou seja, o derivado da grelina humana em que a 3^a serina foi benzilada ($-\text{CH}_2\text{Ph}$)] ou por Cys(Trt) [ou seja, o derivado da grelina humana em que a 3^a serina foi substituída por cisteína e tritilada ($-\text{C}(\text{Ph})_3$)] foram, respectivamente, de 7,6 nM e 20 nM, indicando, deste modo, que foi mantida a actividade de libertação de Ca (Compostos 67 e 68 na Tabela 13).

(2) Determinação da região activa

A actividade de libertação de Ca intracelular da grelina (16-28) contendo a região do terminal carboxilo original era relativamente baixa ($EC_{50} > 10000$ nM), enquanto que os valores da EC_{50} da grelina humana (1-15) e da grelina de rato (1-15), contendo, ambas, a região do terminal amina original, foram, respectivamente, 7,0 nM e 8,6 nM, indicando, deste modo, que a actividade intracelular de libertação de Ca foi mantida e foi, deste modo, revelado que o local activo da grelina está presente na região do terminal amina (Tabela 7).

Tabela 7

Actividade do derivado da grelina 4	
Estrutura do Composto	EC_{50} da actividade de libertação de Ca (nM)
19. Grelina (16-28) H-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-pro-Ala-lysLeu-Gln-Pro-Arg-OH	> 10000
20. hGrelina (1-15) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-OH	7,0
21. rGrelina (1-15) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-OH	8,6
22. [des Gln¹⁴]-rGrelina GSS(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQKAQ_RKESKKPPAKLQPR	1,5

Além disso, dado que as actividades da grelina humana e de rato (1-15) eram, praticamente, iguais, os aminoácido presentes na 11^a e 12^a posições (arginil-valil- na humana e -lisil-aranil- na de rato) não estão limitados a estes aminoácidos.

Os resultados da correlação entre a estrutura e a actividade, obtidos utilizando grelina humana ou de rato, podem ser aplicados, respectivamente, às grelinas de rato e humanas.

Além disso, a [des-glutamina¹⁴]-grelina de rato, preparada pela remoção da 14^a glutamina da grelina, apresenta uma actividade de libertação de Ca ($EC_{50} = 1,5$ nM) semelhante à da grelina de rato, indicando que o aminoácido intermédio da molécula da grelina pode ser eliminado.

(3) Comprimento da cadeia peptídica e introdução de um grupo básico no terminal carboxilo

Com base na verificação de que a grelina (1-15) têm uma actividade relativamente significativa, foi preparado um derivado por eliminação, de um modo adequado, de resíduos de aminoácido do terminal carboxilo da grelina (1-15) e a sua actividade foi avaliada.

Na Tabela 8 são mostradas as actividades dos derivados de cadeia curta, tendo ácido carboxílico no terminal carboxilo e os derivados de cadeia curta, amidados no terminal carboxilo.

Tabela 8

Actividade do derivado da grelina 5	
Estrutura do Composto	EC ₅₀ da actividade de libertação de Ca (nM)
23. hGrelina (1-11) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-OH	15
24. rGrelina (1-11) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-OH	15
25. Grelina (1-10) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH	19
26. Grelina (1-9) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-OH	38
27. Grelina (1-8) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-OH	100
28. Grelina (1-8)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-NH ₂	13
29. Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	2,6
30. Grelina (1-6)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-NH ₂	4,8
31. Grelina (1-5) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-OH	68
32. Grelina (1-5)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-NH ₂	6,2
33-1. Grelina (1-4) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-OH	480
33-2. Grelina (1-4)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe -NH ₂	160
34. Grelina (1-3)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-NH ₂	> 10000

A actividade de libertação de Ca da grelina (1-3) amida foi relativamente baixa (EC₅₀ > 10000 nM). A EC₅₀ da grelina (1-4),

adicionando fenilalanina à grelina (1-3), foi de 480 nM e a EC₅₀ do seu derivado amida do terminal carboxilo foi de 160 nM, revelando, deste modo, que estes têm uma actividade significativa de libertação de Ca.

Além disso, a actividade da grelina (1-5) amida, adicionando a leucina à grelina (1-4) amida foi de cerca de 26 vezes mais elevada (EC₅₀ = 6,2 nM) do que a da grelina (1-4) amida, revelando, deste modo, uma actividade de libertação de Ca ao mesmo nível que a da grelina natural.

A actividade mais elevada de libertação de Ca foi encontrada na grelina (1-7) amida e o seu valor de EC₅₀ foi quase equivalente à da grelina natural.

A partir do resultado acima, o factor estrutural, essencial para a expressão da actividade da grelina, pode ser atribuído à sequência do 4^a resíduo do terminal amina, mas uma vez que a sua afinidade para o receptor ou transdução de sinal da grelina é drasticamente melhorada pela adição de um resíduo, tal como leucina na 5^a posição, de um modo preferido, é adicionado um resíduo, tal como leucina, na 5^a posição.

Como é evidente a partir do resultado acima, a actividade de libertação de Ca tendeu a ser aumentada pela amidação do ácido carboxílico do terminal carboxilo.

Por exemplo, a actividade de libertação de Ca da grelina (1-9) após a amidação (EC₅₀ = 5,4 nM) foi cerca de 7 vezes mais elevada do que a actividade antes da amidação (EC₅₀ = 38 nM) e a actividade de libertação de Ca da grelina (1-4) após a amidação (EC₅₀ = 160 nM) foi cerca de 3 vezes mais elevada do que a

actividade antes da amidação ($EC_{50} = 480$ nM). Além disso, a actividade de libertação de Ca da grelina (1-8) amida ($EC_{50} = 13$ nM), produzida a partir da grelina (1-9) amida, por remoção do resíduo 9 de histidina básica, foi inferior à actividade da grelina (1-9) amida ($EC_{50} = 5,4$ nM), enquanto que a actividade de libertação de Ca da grelina (1-7) amida ($EC_{50} = 2,6$ nM), produzida pela remoção de ácido glutâmico 8, como aminoácido acídico, foi mais elevada do que a actividade antes da remoção ($EC_{50} = 13$ nM).

Um efeito de amidação é a neutralização da carga negativa do ácido carboxílico e o resultado acima indica que a basicidade do aminoácido do terminal carboxilo no derivado de cadeia curta contribui, significativamente, para o aumento da actividade.

Com base neste resultado, foram preparados derivados dotados de basicidade no terminal carboxilo, os quais são semelhantes à grelina (1-7) amida, apresentando actividade elevada e a sua actividade foi examinada.

Os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9

Actividade do derivado da grelina 6	
Estrutura do Composto	EC ₅₀ da actividade de libertação de Ca (nM)
35. [Lys⁸]-Grelina (1-8)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Lys-NH ₂	1,1
36. [Arg⁸]-Grelina (1-8)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Arg-NH ₂	1,1
37. [Lys⁶]-Grelina (1-6)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Lys-NH ₂	12
38. [Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Lys-NH ₂	10
39. [^DPhe⁴, Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)- ^D Phe-Lys-NH ₂	1700

A actividade de libertação de Ca da [lisina⁶]-grelina (1-6) amida, tendo lisina adicionada no terminal carboxilo da grelina (1-5) ($EC_{50} = 12$ nM), foi ligeiramente inferior à actividade da grelina (1-5) ($EC_{50} = 4,8$ nM), enquanto que a actividade de libertação de Ca da grelina (1-4), tendo lisina adicionada no terminal carboxilo ($EC_{50} = 10$ nM), foi cerca de 50 vezes mais elevada do que a actividade antes da adição ($EC_{50} = 480$ nM). Além disso, a actividade de libertação de Ca do derivado amida, tendo, respectivamente, arginina ou lisina adicionadas no terminal carboxilo da grelina (1-7) ($EC_{50} = 1,1$ nM), foi muito mais significativa do que a actividade da grelina (1-7) amida ($EC_{50} = 2,6$ nM).

Foi divulgado que, em quase todos os casos, a actividade é aumentada por dissimulação da acidez no terminal carboxilo e introdução de um grupo básico.

(4) Resíduo glicina e 2^a serina do terminal amina

Com base em ter sido verificado que a grelina (1-7) amida ($EC_{50} = 2,6$ nM) [Composto 29 na Tabela 8] ou a grelina (1-9) amida ($EC_{50} = 5,4$ nM) [Composto 3 na Tabela 4] têm actividade, foi examinada a influência da glicina e da 2^a serina do terminal amina sobre a actividade.

Os resultados são resumidos na Tabela 10.

Tabela 10

Actividade do derivado da grelina 7	
Estrutura do Composto	EC_{50} da actividade de libertação de Ca (nM)
40. [<i>N</i>-Aminopentanoil]-Grelina (3-7)-amida $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO-Ser}(\text{CO-C}_7\text{H}_{15})-\text{Phe-Leu-Ser-Pro-NH}_2$	3,4
41. [<i>N</i>-Acetil]-Grelina (1-10) $\text{CH}_3\text{CO-Gly-Ser-Ser}(\text{CO-C}_7\text{H}_{15})-\text{Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH}$	> 10000
42. [<i>N</i>-Tyr]-rGrelina $\text{YGSS}(\text{CO-C}_7\text{H}_{15})\text{FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR}$	120
43. [<i>N</i>-Glicil]-Grelina (3-7)-amida $\text{H-Gly-Ser}(\text{CO-C}_7\text{H}_{15})-\text{Phe-Leu-Ser-Pro-NH}_2$	380
44. [Leu²]-Grelina (1-7)-amida $\text{H-Gly-Leu-Ser}(\text{CO-C}_7\text{H}_{15})-\text{Phe-Leu-Ser-Pro-NH}_2$	42
45. [His²]-Grelina (1-7)-amida $\text{H-Gly-His-Ser}(\text{CO-C}_7\text{H}_{15})-\text{Phe-Leu-Ser-Pro-NH}_2$	35
46. [Lys²]-Grelina (1-7)-amida $\text{H-Gly-Lys-Ser}(\text{CO-C}_7\text{H}_{15})-\text{Phe-Leu-Ser-Pro-NH}_2$	24
47. [Gly²]-Grelina (1-7)-amida $\text{H-Gly-Gly-Ser}(\text{CO-C}_7\text{H}_{15})-\text{Phe-Leu-Ser-Pro-NH}_2$	78

A actividade da N^{α} -acetil-grelina (1-10), em que o grupo amina do terminal amina na grelina (1-10) foi bloqueado, foi relativamente baixa ($EC_{50} > 10000$ nM). Como descrito acima, a actividade da [N^{α} -ocatanoil, Serina³]-grelina (1-9) amida (Composto 6 na Tabela 1) foi, também, relativamente baixa ($EC_{50} > 10000$ nM) e, deste modo, o grupo amina do terminal amina não é, de um modo preferido, bloqueado, de forma a expressar a actividade de libertação de Ca.

Por outro lado, a actividade de libertação de Ca da N^{α} -aminopentanoil-grelina (3-7) amida, em que a glicina e a 2^a serina do terminal amina foram substituídas por ácido 5-amino-n-pantanóico ($NH_2-(CH_2)_4-CO-$) tendo um comprimento dos 2^{os} resíduos, foi, praticamente, mantida ($EC_{50} = 3,4$ nM), a actividade de libertação de Ca da [N^{α} -glicil]-grelina (3-7) amida, da qual tinha sido eliminada a 2^a serina foi inferior ($EC_{50} = 380$ nM) e a actividade de libertação de Ca da [N-tirosil]-grelina de rato, tendo um resíduo de tirosina adicionado no terminal amina da grelina de rato foi mais baixa ($EC_{50} = 120$ nM), pelo que é preferido, para obter uma actividade mais significativa que o grupo amina do terminal amina esteja presente numa posição de um comprimento de 2 resíduos, a partir do octanoílo do 3º resíduo de serina até ao terminal amina.

Além disso, os valores de EC_{50} dos derivados da grelina (1-7) amida em que a 2^a serina tinha sido substituída por leucina, glicina, histidina e lisina foram, respectivamente, de 42 nM, 78 nM, 24 nM e 35 nM, indicando uma actividade de libertação de Ca ligeiramente inferior à da grelina (1-7) amida.

Uma vez que este resultado indica que o 2º resíduo de serina ($-NH-CH(CH_2OH)-CO-$) pode ser substituído pela estrutura

parcial $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ no ácido aminopentanóico, o 2º resíduo de serina actua, pelo menos, como um espaçador para separar o grupo amina do terminal amina da grelina, através de uma distância pré-determinada do 3º grupo octanoílo. A razão pela qual foi mantida a actividade com a substituição do 2º resíduo de serina pelo ácido 5-aminopentanóico é a basicidade do terminal amina ter sido aumentada, pela introdução de alquilamina na sua estrutura.

Em resumo, é considerado que o grupo amina do resíduo de glicina do terminal amina confira basicidade ao terminal amina da molécula grelina, expressando, deste modo, a actividade da grelina e por isso o grupo amina no terminal amina não é, de um modo preferido, bloqueado.

Além disso, é considerado que o 2º resíduo de serina actua como um espaçador para separar o grupo amina do terminal amina do 3º grupo octanoílo, através uma distância pré-determinada e, consequentemente, o 2º resíduo de serina pode ser substituído por um aminoácido ou composto não-aminoácido tendo uma cadeia lateral relativamente menos volumosa. Ou seja, a posição do grupo octanoílo na molécula grelina é definida em relação ao grupo amina do terminal amina e esta relação posicional constitui uma parte da estrutura activa da grelina.

Ou seja, a cadeia lateral do 2º aminoácido é, de um modo preferido, relativamente menos volumosa, tais como na serina, alanina e norvalina e não um aminoácido tendo uma estrutura volumosa e é preferido, um resíduo de aminoácido que não limita a flexibilidade dos resíduos vizinhos, como o 2º aminoácido. Além disso, dado que a actividade de libertação de Ca da N^α -aminopentanoil-grelina (3-7) amida é, praticamente, mantida

($EC_{50} = 3,4$ nM), a 2^a serina pode ser substituída por um composto não-aminoácido.

(5) Actividade óptica do 3º e 4º resíduos de aminoácido

Com base na estrutura da grelina (1-7) amida, foram preparados os seus derivados, em que a 3^a L-serina e a 4^a L-fenilalanina tinham sido substituídas pelos L-aminoácidos correspondentes e foi examinada a influência que a configuração do 3º e 4º aminoácidos tem sobre a actividade de libertação de Ca. Especificamente, com base na [serina³(octil)]-grelina (1-7) amida ($EC_{50} = 5,8$ nM) [Composto 50 na Tabela 11] e na [cisteína³(octil)]-grelina (1-7) amida ($EC_{50} = 7,4$ nM) [Composto 48 na Tabela 11], que mantiveram uma boa actividade, foram preparados os seus derivados, em que a 3^a serina e a 4^a fenilalanina tinham sido substituídas pelos correspondentes L- ou D-aminoácidos.

Os resultados são resumidos na Tabela 11. A partir destes resultados, o 3º e o 4º aminoácidos são, de um modo preferido, L-aminoácidos.

Tabela 11

Actividade do derivado da grelina 8	
Estrutura do Composto	CE ₅₀ da actividade de libertação de Ca (nM)
48. [Cys³(Octil)]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser-Cys(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	7, 4
49. [Cys³(Octil), ^DPhe⁴]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser-Cys(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	3000
50. [Ser³(Octil)]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	5, 8
51. [Ser³(Octil), ^DPhe⁴]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser-Ser(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	2200
52. [^DSer³(Octil)]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	> 10000
53. [^bSer³(Octil), ^DPhe⁴]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	> 10000

(6) Modo de ligação de uma cadeia lateral na 3^a posição

Foram preparados derivados da grelina em que a ligação éster original foi substituída por éster na direcção inversa (Composto N° 54), uma amida (Compostos N° 55 e 56), um persulfureto (Composto N° 57) e metíleno (Composto N° 58), de forma a que a cadeia lateral na 3^a posição tivesse o mesmo comprimento que a da cadeia da grelina (-CH₂-O-CO-C₇H₁₅). Além disso, foram preparados derivados éster tendo um impedimento estérico no átomo de carbono β do aminoácido da 3^a posição (Compostos N° 59 e 60) e um derivado amida em que foram extendidas 3 unidades de metíleno (Composto N° 61). Os resultados são resumidos na Tabela 12.

Tabela 12

Actividade do derivado da grelina 9	
Estrutura do composto	EC ₅₀ da Actividade (nM)
54. [Asp³(O-Heptil)]-hGrelina GSD (O-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	5,1
55. [Asp³(NH-Heptil)]-hGrelina GSD (NH-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	11
56. [Dap³(Octanoil)]-hGrelina GS-NH- ¹ CH (CH ₂ NHCO-C ₇ H ₁₅) -CO-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2,6
57. [Cys³(S-Heptil)]-hGrelina GSC (S-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,4
58. [Adod³]-hGrelina GS-NH-CH (n-C ₁₀ H ₂₁) -CO-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	0,91
59. [Thr³(Octanoil)]-hGrelina GST (CO-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	10
60. [Leu², Thr³(Octanoil)]-hGrelina GLT (CO-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	46
61. [Lys³(Octanoil)]-hGrelina GSK (CO-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	32

A actividade do Composto 58, em que a cadeia lateral na 3^a posição tinha sido substituída, exclusivamente, por unidades de metileno, apresentou a actividade mais significativa (valor de EC₅₀ = 1 nM ou inferior). A actividade dos outros derivados foi variada, dependendo do tipo de ligação, mas foi confirmado que o modo de ligação de uma cadeia lateral do aminoácido 3 não exerce uma influência significativa sobre a actividade.

(7) Hidrofobicidade de uma cadeia lateral na 3^a posição

Foram preparados derivados em que o grupo Ser(octanoílo) 3 tinha sido substituído por um aminoácido hidrofóbico, a maioria

dos quais são aminoácidos naturais e a sua actividade foi examinada. Os resultados são resumidos na Tabela 13.

Tabela 13

10. Actividade de derivados da Grelina	
Estrutura do Composto	EC ₅₀ da Actividade (nM)
62. [Trp³]-hGrelina GSWFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	31
63. [Phe³]-hGrelina GSFFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2000
64. [Cha³]-hGrelina GS-Cha-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	19
65. [2-^INal³]-hGrelina GS- ^I Nal-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	8,2
66. [2-^DNal³]-hGrelina GS- ^D Nal-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	> 10000
67. [Ser³(Bzl)]-hGrelina GSS (CH ₂ -C ₆ H ₅) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	7,6
68. [CyS³(Tritil)]-hGrelina GSC (C-Ph ₃) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	20
69. [Ser³(4-Metilpentanoil)]-hGrelina GSS (CO-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	4,4
70. [Leu³]-hGrelina GSLFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	4400
71. [Ile³]-hGrelina GSIFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	> 10000
72. [Lys³]-hGrelina GSKFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	120
73. [Nle³]-hGrelina GS-Nle-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2800
74. [Val³]-hGrelina GSVFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1600

Os valores de EC₅₀ dos derivados tendo um aminoácido hidrofóbico aromático, tais como triptofano, ciclo-hexilalanina ou naftilanina na 3^a posição foram, respectivamente, 31 nM, 19 nM e 8,2 nM, indicando que a actividade de libertação de Ca foi mantida. Inesperadamente, quando foi introduzida fenilanina na 3^a posição, a actividade de libertação de Ca foi ligeiramente baixa, mas mesmo se tiverem sido introduzidos Ser(Bzl) ou Cys(Tritil), mais hidrofóbicos, na 3^a posição, a actividade de libertação de Ca foi mantida, de um modo semelhante e, deste modo, foi confirmado que é mais preferida a hidrofobicidade da cadeia lateral na 3^a posição para a expressão da actividade.

Por um lado, quando um aminoácido hidrofóbico alifático, tal como, a leucina, isoleucina, norleucina ou valina foi introduzido na 3^a posição, a actividade de libertação de Ca dos derivados foi, geralmente, mantida, mas, ligeiramente, abaixo dos derivados que introduzem o aminoácido aromático. A actividade do Composto 73, tendo norleucina na 3^a posição apresentou uma EC₅₀ = 2800 nM, enquanto que a actividade da 6-amino-norleucina (lisina; Composto 72), tendo um grupo amina adicionado a uma cadeia lateral da norleucina, foi aumentada para 120 nM, em termos de valores de EC₅₀, de forma que foi confirmado que, à semelhança da basicidade do terminal carboxilo, descrito acima é, também, preferida a basicidade de uma cadeia lateral na 3^a posição.

(8) Derivados grelina de cadeia curta

Como descrito acima, foi verificado que um fragmento da grelina dos aminoácidos 1 a 4 do terminal amina apresenta

actividade significativa e que esta actividade é, adicionalmente, aumentada pela adição de leucina na 5^a posição do fragmento referido; o 3º resíduo de aminoácido é, de um modo preferido, o que tem uma cadeia lateral hidrofóbica; a actividade é aumentada pela introdução de um resíduo básico; e os resíduos de aminoácido 1 e 2 podem ser substituídos por um composto não-aminoácido, tendo um comprimento de 2 resíduos, tal como um δ-aminoácido. Com base nestes resultados, foram preparados vários derivados de grelina de cadeia curta, baseados na região do terminal amina (1-5), como mostrado nos Compostos Nº 76 a 87, nas Tabelas 14 e 15 e as suas actividades foram examinadas. Os resultados são resumidos nas Tabelas 14 e 15.

O composto 80 é conhecido (Ipamorerin; K. Raum *et al.*, *Eur. J. of Endocrinol.*, **139**: 552-561, 1998).

Tabela 14

Actividade do derivado da grelina 11	
Estrutura do composto	EC ₅₀ da Actividade (nM)
75. [Lys⁷]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Lys-NH ₂	11
76.	12
[N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil), Lys⁵]-Grelina (3-5)-amida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Lys-NH ₂	
77. [N-Aminopentanoilo, ^DSer³(Octil), ^DPhe⁴, Lys⁵]-Grelina (3-5)-amida NH ₂ -(CH ₂) ₄ CO- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Lys-NH ₂	1600
78. [Aib¹, His², Ser³(Octil), Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida H-Aib-His-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Lys-NH ₂	34
79.	38

(continuação)

Actividade do derivado da grelina 11	
Estrutura do composto	EC ₅₀ da Actividade (nM)
[Aib¹, His², ^DSer³(Octil), ^DPhe⁴, Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida H-Aib-His- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Lys-NH ₂	
80. [Aib¹, His², ^DNal³, ^DPhe⁴, Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida H-Aib-His- ^D Nal- ^D Phe-Lys-NH ₂	2,5

Dado que a actividade de libertação de Ca do Composto 80 conhecido foi elevada (2,5 nM), foi, também, examinada a actividade do Composto 79 derivado de Composto 80, pela substituição da 2-D-naftilalanina na 3^a posição por D-octil serina e, em resultado, o seu valor de EC₅₀ foi de 38 nM, indicando que a actividade foi mantida. O Composto 77, tendo D-octil serina e D-fenilalanina na 3^a e 4^a posições, tendo a mesma estrutura de aminoácidos que o Composto 79, excepto os aminoácidos 1 e 2, apresentou uma actividade mais baixa (1600 nM) e estes resultados indicam que a sequência ou a estrutura dos aminoácidos 1 e 2 afectam, também, a configuração estérica das cadeias laterais do 3º e 4º aminoácidos, importantes para a manifestação da actividade.

Ou seja, no caso em que os aminoácidos 1 e 2 foram substituídos pelo ácido aminopentanóico, a actividade foi mantida em 34 nM, mesmo se 2-D-naftilalanina na 3^a posição e a D-fenilalanina na 4^a posição foram substituídas pelos seus L-aminoácidos correspondentes (Composto 78) e, deste modo, a sequência de aminoácidos (Gly-Ser) na 1^a ao 2^a posições da grelina requer a configuração L para os aminoácidos 3 e 4, mas, mesmo se os aminoácidos 3 e 4 tiverem a configuração D, a actividade é tornada significativa, pela introdução de outra sequência de aminoácidos, tal como Aib-His. Foi também

confirmado que, independentemente, da configuração L- ou D- na 3^a e 4^a posições, a actividade é expressa pela introdução de ácido aminopentanóico na 1^a e 2^a posições.

Tabela 15

Actividade do derivado da grelina 12	
Estrutura do Composto	EC ₅₀ da Actividade (nM)
81. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-amida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser (C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH ₂	11
82. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-metilamida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser (C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-CH ₃	12
83. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina(3-5)-etilamida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser (C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-C ₂ H ₅	22
84. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina(3-5)-benzilamida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser (C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅	98
85. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5), aminoetilamida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser (C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	3,5
86. [N-Aminopentanoilo, Ser³(Octil), MePhe⁴, MeLeu⁵]-Grelina (3-5)-amida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser (C ₈ H ₁₇)-MePhe-MeLeu-NH ₂	82
87. [^DLeu⁵]-hGrelina GSS(CO-C ₇ H ₁₅)F- ^D L-SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	220

Foi examinada a correlação entre a actividade e a estrutura da região do terminal carboxilo, utilizando [N-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5) baseada na região do terminal amina (1-5) da grelina. A actividade dos seus derivados, em que a leucina do terminal carboxilo na 5^a posição tinha sido

modificada com amida, metilamida, etilamida ou benzilamida foi mantida, mas tendeu a ser reduzida, como mostrado, respectivamente, por valores de EC₅₀ de 11 nM, 12 nM, 22 nM e 98 nM. Por outro lado, a actividade foi aumentada pela substituição da etilamida por aminoetilamida, como mostrado por um valor de EC₅₀ de 3,5 nM, revelando, deste modo, que é preferida a comunicação de basicidade ao terminal carboxilo da molécula da grelina.

Estes vários derivados amida do terminal carboxilo são compostos úteis, devido à sua resistência à decomposição *in vivo* com carboxipeptidases. O Composto 86 (EC₅₀ = 86 nM) contendo ácido N-metilamino é, também, um composto útil devido à sua resistência às enzimas.

Exemplo 12. Actividade de libertação de GH dos derivados da grelina em ratos

(1) Actividade de libertação de GH de vários derivados da grelina de cadeia longa em ratos

Foram administrados 18 nmol do Composto 17
([Ser³(Octil)]-hGrelina)/kg, 30 nmol do Composto 18
([Cys³(Octil)]-rGrelina)/kg, 100 nmol do Composto 65
([2-¹Nal³]-hGrelina)/kg ou 18 nmol do Composto 15
([Ser³(3-Fenilpropinil)]-hGrelina)/kg, rapidamente e
intravenosamente, em ratos da variedade IGS-SD (com cerca de 7
semanas), sob anestesia com Nembutal, para cada amostra (n = 3).
Quinze minutos após a administração, foi recolhido plasma e a
concentração da GH no plasma foi medida por radioimunoensaio
(Biotrak/Amersham). Separadamente, foram administrados,

respectivamente, albumina do soro bovino (BSA) a 0,2%-soro fisiológico, 6 nmol de rGrelina e hGrelina/kg ou 80 nmol de Ipamorelin/kg (Composto 80) a outros ratos, como controlo e as concentrações de GH no plasma foram comparadas, 15 minutos após a administração (para cada amostra, n = 3).

Os resultados são mostrados na Tabela 13. O Composto 17 ([Ser³(Octil)]-hGrelina), o Composto 18 ([Cys³(Octil)]-rGrelina) e o Composto 15 ([Ser³(3-PhPrl)]-hGrelina) apresentam uma actividade significativa de libertação de GH e a actividade de libertação de GH da [2-¹Nal³]-hGrelina apresentou uma boa correlação com a actividade intracelular de libertação de Ca.

Tabela 16

Composto administrado	Valor da EC ₅₀ (nM)	dose (nmol/kg)	nível de GH no plasma, 15 min. após a administração (ng/mL)			
			Rato 1	Rato 2	Rato 3	M ± S.D.
Soro fisiológico	—	—	32	52	59	49 ± 12
hGrelina	1,3	6	1802	1613	2203	1873 ± 301
rGrelina	1,5	6	2056	1082	1205	1448 ± 530
Ipamorelin (Composto 80)	2,5	80	377	260	1184	607 ± 503
[Ser ³ (Octil)]-hGrelina	1,2	18	1626	1602	1743	1657 ± 75
[Cys ³ (Octil)]-rGrelina	5,4	30	2786	2342	2354	2494 ± 253
[Ser ³ (Fenilpropionil)]-hGrelina	1,4	18	2119	2078	1581	1926 ± 299
[2- ¹ Nal ³]-hGrelina	8,2	100	1637	1576	1357	1524 ± 147

(2) Modificação de GH no plasma por administração de [Cys³(Octil)]-grelina de rato

Após o Composto 18 ([Cys(Octil)]-grelina de rato) ter sido administrado intravenosamente numa dose de 5 µg/cabeça, em ratos do sexo masculino da variedade Wistar (cerca de 260 a 280 g), sob anestesia com Nembutal, foi medida a GH libertada para o sangue. Foram, também, administrados soro fisiológico e grelina de rato (5 µg /cabeça), como controlo e foram comparados com o Composto 18.

Como mostrado nas Tabelas 17 a 19, a actividade da [Cys³(Octil)]-grelina de rato promotora da secreção da GH foi equivalente à da grelina natural de rato (ou seja, C_{max} da GH segregada foi cerca de 1100 ng/mL para ambas as grelinas) e, além disso, o tempo de secreção tendeu a prolongar-se. A actividade intracelular de liberação de Ca do Composto 18 foi 5,4 nM, em termos de EC₅₀.

Tabela 17

Modificação do nível de GH no plasma por administração de [Cys ³ (Octil)]-grelina de rato							
[Cys(C18) ³]-grelina de rato 5 µg/cabeça		Tempo (min)					
		0	5	10	15	20	30
Nível de GH no plasma (ng/mL)	Rato 1	377	338	687	927	900	469
	Rato 2	101	294	258	300	358	245
	Rato 3	59	476	949	1229	1417	704
	Rato 4	33	530	959	1451	1299	800
	Rato 5	32	613	1060	1561	1359	726
Média ± S.D.		120	450	783	1093	1067 ± 589	132
		± 146	± 133	± 324	± 506	445	± 229
						± 53	

Tabela 18

Soro fisiológico		Tempo (min)						
		0	5	10	15	20	30	60
Nível de GH no plasma (ng/mL)	Rato 1	0	88	129	133	116	107	430
	Rato 2	204	122	118	134	128	69	36
	Rato 3	77	0	0	0	0	0	11
	Rato 4	0	0	0	0	48	27	110
	Rato 5	0	0	0	0	0	0	210
Média ± S.D.		56	42	49	53	58	41	159
		± 89	± 58	± 67	± 73	± 61	± 47	± 170

Tabela 19

Modificação do nível de GH no plasma por administração de grelina de rato								
Grelina de rato 5 μg/cabeça		Tempo (min)						
		0	5	10	15	20	30	60
Nível de GH no plasma (ng/mL)	Rato 1	143	186	425	405	215	56	3
	Rato 2	10	1396	2028	1566	876	242	27
	Rato 3	838	163	443	681	419	120	36
	Rato 4	348	556	1387	1469	1293	663	100
	Rato 5	0	875	1380	1009	1414	452	20
Média ± S.D.		268	635	1133	1026	843	306	37
		± 348	± 517	± 690	± 498	± 525	± 250	± 37

Exemplo 13. Acção de aumento do apetite da grelina

(1) Acção de aumento do apetite por administração no ventrículo

Foi administrado soro fisiológico contendo grelina de rato, em várias concentrações, às 8:45 da manhã, nos ventrículos

cerebrais de ratos do sexo masculino da variedade Wistar (16 a 20 animais por grupo), pesando, cada, 300 a 325 g. Foi administrado soro fisiológico isento de grelina aos ventrículos, como controlo. Após a administração, foi permitida a alimentação *ad libitum* dos ratos e foi medida a quantidade de alimento ingerido ao longo de 2 horas após a administração. Como mostrado na Fig. 6, foi observado um aumento da quantidade de alimento ingerido, nos ratos aos quais foram administradas 50 pmol de grelina, intracerebroventricularmente e foi observado um aumento da quantidade de alimentos ingeridos, dependente da dose, em ratos aos quais foram administrados 200 pmol e 500 pmol de grelina, mas a quantidade de alimentos ingeridos foi reduzida nos ratos aos quais foram administrados 2 nmol de grelina. Normalmente, os ratos alimentam-se à noite, de forma que de manhã, os ratos estão com o estômago cheio e raramente se alimentam (ver o rato ao qual foi administrado soro fisiológico como controlo, na Fig. 6) e, deste modo, o aumento da quantidade de alimentos ingeridos através da administração de grelina no ventrículo cerebral, indica que grelina tem uma acção de aumento do apetite.

(2) Acção de aumento do apetite por administração intravenosa

Foram administrados 50 µg de grelina de rato/kg, intravenosamente, nas veias da cauda de ratos SD (Sprague-Dawley) (5 animais) e de ratos Wister (4 animais) do sexo masculino, com 9 meses e foi medida a quantidade de alimentos ingeridos durante 2 horas após a administração (avaliada das 16:00 às 19:00 da tarde). Como mostrado na Tabela 20, a quantidade de alimentos ingeridos foi aumentada, de um

modo evidente, pela administração intravenosa da grelina, em comparação com a quantidade de alimentos ingeridos sem administração de grelina de rato, a qual foi determinada utilizando o mesmo animal na mesma hora num outro dia. Ou seja, foi demonstrado que a grelina tem uma acção de aumento do apetite, mesmo por administração intravenosa.

Tabela 20

		Quantidade de alimentos ingerida (g)	
estirpe	Nº do Rato	Administração de grelina	Sem administração de grelina
S-D	1	3,2	2,2
	2	3,7	1,0
	3	3,2	0,1
	4	2,7	1,3
	5	2,6	0,8
	Média	3,1	1,1
	S.D.	0,4	0,8
Wister	6	2,3	0,2
	7	1,9	1,4
	8	1,6	0,1
	9	2,1	0,3
	Média	2,0	0,5
	S.D.	0,3	0,6

Exemplo 14. Aumento das funções gástrica pela grelina

Foi realizada seguinte experiência, para avaliar o efeito da grelina sobre a função gástrica. Foram submetidos a jejum ratos da estirpe SD do sexo masculino (7 a 8 semanas, pesando 200 a 280 g), durante 20 ou mais horas e foram, depois, utilizados na experiência. Os ratos foram anestesiados pela administração intraperitoneal de uretano (1,25 g/kg) e foram mantidos quentes, utilizando uma almofada de aquecimento e uma luz de aquecimento. Foi inserida uma cânula traqueal, o esófago foi ligado com fio de seda e cada rato foi submetido à seguinte operação de medição da secreção do ácido gástrico ou da motilidade gástrica. Na experiência utilizando o animal consciente, o rato foi submetido à operação da medição da secreção de ácido gástrico ou da mobilidade gástrica, sob anestesia leve, por inalação de éter.

Na experiência da secreção de ácido gástrico sob anestesia com uretano, a operação foi realizada de acordo com o método proposto por Ohno *et al.* [Ohno, T., *et al.*, *Jpn. J. Pharmacol.* **43**, 429-439 (1987)]. Resumidamente, o abdómen foi sujeito a incisão, na posição supina e o estômago e o duodeno foram expostos. Foi inserido um tubo de polietileno na parte dianteira do estômago, para preparar uma fistula gástrica aguda. Foi inserido outro tubo de polietileno no estômago, após divisão do duodeno e a parte circundante do piloro foi ligada e fixada. O conteúdo do estômago foi infundido com soro fisiológico, o qual foi ajustado para pH 7,0, num reservatório e foi aquecido a 37 °C. O caudal foi de 1,0 mL/min. O fluido de infusão foi ajustado para pH 7,0 por titulação com NaOH 100 mM, utilizando uma unidade fixadora de pH (Hiranuma, Comitite-8). Após ter sido confirmado que uma quantidade básica da secreção de ácido

gástrico estava estável, o produto químico do teste foi administrado intravenosamente e foi medida a taxa de secreção de ácido gástrico, em intervalos de 5 minutos. Foram utilizadas quatro ratos em cada grupo.

Na experiência durante a vigília, o rato foi submetido à mesma operação sob anestesia leve, por inalação de éter e, depois, foi realizado um pequeno corte no flanco e foi extraído um tubo de infusão a partir do corpo. O estômago e o duodeno expostos foram recolocados no abdómen, o local de excisão foi suturado e o animal foi imobilizado, deitado de costas, numa jaula de fixação de ratos do tipo Ballman e, após ter sido confirmado que o rato recuperou da anestesia, o rato foi submetido à experiência. O esôfago foi ligado, mas não foi inserida uma cânula na traqueia.

Na experiência para a medição da motilidade gástrica sob anestesia com uretano, foi utilizado um método com um balão miniaturizado, de acordo com o método proposto por Takeuchi e Nobuhara [Takeuchi, K. e Nobuhara, Y., *Digestive Diseases and Sciences* **30**, 1181-1188 (1985)]. Ou seja, foi inserido um balão cheio de água e um cateter de suporte no estômago, após divisão da parte dianteira do estômago. Este foi fixado de forma a situar-se numa glândula da linha gástrica e uma extremidade do cateter foi ligado a um transdutor de pressão (LPU-0.1-350-0-II, de Nihon Kohoden Corporation). Após ter sido confirmado que a motilidade gástrica estava estável, o produto químico de teste foi administrado intravenosamente, cumulativamente, em intervalos de 60 minutos. Para a motilidade gástrica, foram medidos a amplitude da pressão interna no estômago e o número de reacções de encolhimento na motilidade por encolhimento, tendo uma amplitude de H₂O de 20 ou mais cm, em

intervalos de 10 minutos. Foram utilizados quatro animais em cada grupo. Na experiência que utilizou animais conscientes, o rato foi submetido à mesma operação sob anestesia leve, por inalação de éter e, após o local de excisão ter sido suturado, o animal foi fixado na posição de pronação numa jaula de fixação de ratos do tipo Ballman. Após ter sido confirmado que o rato estava recuperado da anestesia, o animal foi submetido à experiência.

Foram dissolvidas grelina de rato e dicloridrato de histamina em soro fisiológico e foram administrados na veia da cauda, numa dose de 1 mL/kg. Foi administrado, subcutaneamente, sulfato de atropina, 30 minutos antes da administração da grelina, para verificar se a acção do nervo vago estava envolvida na acção da grelina ou se os feixes de nervo vago cervicais tinham sido cortados bilateralmente. Foi administrada, subcutaneamente, famotidina (Gaster®, produzida por Yamanouchi Pharmaceutical Co, Ltd.), 30 minutos antes da administração da grelina, para verificar o envolvimento do receptor H₂ da histamina na acção da grelina. Os resultados são mostrados como média ± erro padrão. A análise estatística foi realizada, utilizando testes múltiplos de comparação de Dunnett. O valor de P < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Como mostrado na Fig. 7A e na Tabela 21, a secreção de ácido gástrico foi promovida, de uma forma dependente da dose, após a administração intravenosa de grelina de rato, numa dose de 0,8 a 20 µg/kg, num rato sob anestesia de uretano.

No rato sob anestesia, a motilidade espontânea do estômago não foi, praticamente, observada antes da administração da grelina. Quando foi administrada grelina de rato

intravenosamente, numa dose de 0,8 a 20 µg/kg, num rato com esta patologia, tanto a amplitude como a frequência da motilidade gástrica foram promovidas, como mostrado nas Fig. 8A e B e na Tabela 21. Estas reacções foram observadas, imediatamente, após a administração da grelina de rato. A secreção de ácido gástrico foi aumentada pela administração de 20 µg/kg, atingiu o nível máximo ao fim de 20 minutos e diminuiu, gradualmente, durante 90 minutos após a administração. Como mostrado nas Fig. 7 A e B, a reacção máxima na acção promotora da secreção de ácido gástrico pela administração de 20 µg de grelina de rato/kg foi quase comparável à reacção induzida pela administração intravenosa de 3 mg de histamina/kg. A acção de promoção da amplitude da motilidade gástrica atingiu a reacção máxima em 10 minutos, em qualquer dose e a acção foi gradualmente reduzida pela administração de 20 µg de grelina/kg, até 50 minutos após a administração.

Além disso, como mostrado na Tabela 21, a acção de promoção da secreção gástrica induzida pela administração de 20 µg de grelina de rato/kg foi inibida, quase completamente, pelo pré-tratamento com atropina ou vagotomia cervical bilateral, mas esta acção não foi afectada pelo pré-tratamento da administração subcutânea de 1 mg de famotidina/kg, *i. e.*, um antagonista do receptor de H₂ da histamina. Além disso, a acção de promoção da motilidade gástrica induzida pela administração de grelina de rato foi completamente inibida pelo pré-tratamento com atropina ou vagotomia cervical bilateral. A partir destes resultados, foi confirmado que a acção de promoção da grelina sobre as funções gástricas não ocorre através do mecanismo histaminérgico, mas sim, através da activação do sistema do nervo vago.

A secreção de ácido gástrico foi promovida, em ratos conscientes, da mesma forma que nos ratos sob anestesia com uretano, pela administração intravenosa de grelina de rato (4 e 20 µg/kg). Em comparação com um rato sob anestesia, um rato consciente apresentou motilidade gástrica espontânea antes da administração do produto químico de teste e, mesmo neste estado, a motilidade gástrica foi promovida juntamente com a sua amplitude e frequência, pela administração de 0,8 a 20 µg de grelina de rato/kg, ao rato. A partir do resultado acima, foi confirmado que, pela administração intravenosa da grelina, a promoção da secreção de ácido gástrico e promoção da motilidade gástrica ocorre não, apenas, num rato anestesiado mas, também, num rato consciente.

Tabela 21

Tratamento	Secreção de ácido gástrico (μ equivalente/60 min in.)	Motilidade gástrica	
		Frequência (tempo/60 min)	Amplitude (cm H ₂ O/60 min.)
Soro fisiológico	17,6 ± 1,2	1,3 ± 1,0	1,7 ± 1,0
Grelina de rato	Injecção i.v. de 0,8 μ g/kg	24,5 ± 2,2	35,5 ± 18,1
	Injecção i.v. de 4 μ g/kg	23,5 ± 2,6	60,8 ± 25,6
	Injecção i.v. de 20 μ g/kg	43,3 ± 4,6 (*1)	100,5 ± 20,4 (*1)
Injecção intravenosa de 20 μ g de grelina de rato/kg	+ administração subcutânea de 1 mg de atropina/kg	26,1 ± 3,9 (*2)	0 (*3)
	+ remoção do nervo vago	18,4 ± 3,7 (*3)	0 (*3)
Injecção intravenosa de 20 μ g de grelina de rato/kg	+ administração subcutânea de 1 mg de famotidina/kg	43,0 ± 4,2	NT

Os símbolos na tabela indicam:
 *1, p <0,01; *2, p <0,05; e *3, p <0,01
 NT: Não testado.

Exemplo 15. Acção promotora do crescimento celular da grelina e dos derivados da grelina

Foi realizada a seguinte experiência, para examinar a acção promotora do crescimento celular da grelina administrada. Foram administrados, respectivamente, vinte μ g de grelina de rato ou de grelina de rato do tipo tioéter (Composto 18 [Cys³(octil)]-hGrelina)/kg nas veias da cauda de ratos Wister do

sexo masculino (7,5 semanas). Dezassete horas após a administração, foi administrada ^3H -timidina nas veias da cauda e, após 1 hora, foram excisados o duodeno, o jejuno e a medula óssea. Foi medida a incorporação ^3H -timidina nas fracções de ADN destes tecidos, para examinar a acção de promoção do crescimento celular da grelina e dos derivados da grelina. Os tecidos foram cortados finamente e foram homogeneizados, utilizando um homogenizador Polytron e, após a centrifugação, o sobrenadante foi precipitado com ácido tricloroacético, para originar uma fracção de ADN. A radioactividade da fracção de ADN foi medida por um contador de cintilação líquida.

Como mostrado na Tabela 22, a incorporação de ^3H -timidina nestes tecidos ou órgãos foi aumentada pela administração intravenosa de grelina de rato ou de grelina de rato do tipo tioéter e foi, deste modo, confirmado que grelina apresenta uma acção de promoção do crescimento celular, no duodeno, no jejuno e na medula óssea.

A duração do tempo de acção de promoção do crescimento celular, após a administração intravenosa de grelina foi semelhante à da após a administração de GHRH (hormona de libertação da hormona do crescimento), foi, portanto considerado que a acção de promoção do crescimento celular da grelina ocorre através da GH (hormona do crescimento), segregada, principalmente, a partir da pituitária. Foi considerado que a regulação da secreção da GH pela grelina, como um factor fisiológico, é razoável para a regulação do organismo e verificam-se menos efeitos adversos, os quais podem ocorrer por administração da GH.

Tabela 22

	Exemplo Comparativo	Grelina de rato	Grelina do tipo tioéter
Medula óssea (nos tecidos)	100,0 $\pm 17,8\%$	141,7 $\pm 30,1\%$	144,5 $\pm 16,5\%$
Duodeno (na fracção do ADN)	100,0 $\pm 14,2\%$	136,0 $\pm 17,8\%$	114,0 $\pm 11,7\%$
Jejuno (na fracção do ADN)	100,0 $\pm 6,8\%$	159,0 $\pm 7,5\%$	151,0 $\pm 23,6\%$

Os valores numéricos mostram a proporção (%) da incorporação do isótopo radioactivo, em relação à média (em triplicado) do exemplo comparativo (*i. e.*, o grupo ao qual foi administrado soro fisiológico).

Exemplo 16. Quantificação da grelina por anticorpos anti-grelina

Foi quantificada a grelina em vários tecidos vivos, por radioimunoensaio (RIA), utilizando anticorpos produzidos contra péptidos dos terminais amina e carboxilo da grelina de rato, como antigénios.

Foram imunizados coelhos com [C-Cys]-grelina de rato [1-11] (péptido com os aminoácidos 1 a 11 do terminal amina da grelina de rato, tendo cisteína ligada ao seu terminal carboxilo) e [C-Cys]-grelina de rato [13-28] (péptido com os aminoácidos 13 a 28 do terminal amina da grelina de rato, tendo cisteína ligada ao seu terminal carboxilo), como antigénios, para formar, respectivamente, o anticorpo contra o terminal amina

(anti-antigénio [C-Cys]-grelina de rato [1-11]) e anticorpo contra o terminal carboxilo (anti-antigénio [C-Cys]-grelina de rato [13-28]).

Como mostrado na Fig. 9a, a IC_{50} (concentração inibitória a 50%) da grelina de rato foi de 3,1 fmol, para a ligação entre a grelina de rato marcada com um isótopo radioactivo e o anticorpo contra o terminal amina. Este anticorpo contra o terminal amina, embora apresentando reactividade cruzada a 100% com a grelina humana sintetizada quimicamente e a grelina de rato, apresentou, apenas, uma reactividade cruzada a 0,3% com a n-hexanoil grelina de rato, em que a 3^a serina tinha sido modificada com grupo n-hexanoílo e reactividade cruzada a 20% com a n-decanoil grelina de rato, em que a 3^a serina tinha sido modificada com o grupo n-decanoílo. Além disso, o anticorpo terminal do amina não reagiu com a grelina a partir da qual o ácido gordo tinha sido libertado.

O anticorpo do terminal amina apresentou uma afinidade semelhante para grelina de rato (28 aminoácidos), grelina humana (28 aminoácidos) e grelina-27 (grelina, consistindo em 27 aminoácidos), encontradas em humanos e ratos. Consequentemente, foi confirmado que o anticorpo contra o terminal amina reconhece, especificamente, a grelina natural em que a 3^a serina foi modificada com um grupo n-octanoílo.

Como mostrado na Fig. 9b, a grelina de rato natural, modificada com o grupo n-octanoílo e a grelina de rato, modificada por remoção de n-octanoílo da grelina de rato natural, apresentaram um valor de IC_{50} semelhante, de 44 fmol, para a ligação entre a grelina de rato marcada com um isótopo radioactivo e o anticorpo contra o terminal carboxilo. Ou seja,

foi confirmado que o anticorpo contra o terminal carboxilo tem a mesma afinidade para a grelina modificada com um ácido gordo e para a grelina da qual foi libertado um ácido gordo.

Estes resultados revelaram que, no que respeita às grelinas que ocorrem em vários tecidos num organismo vivo, a grelina em que a 3^a serina foi modificada com um grupo n-octanoílo pode ser quantificada através de um anticorpo contra o terminal amina, enquanto que, tanto a grelina modificada com um ácido gordo, como a grelina da qual foi libertado um ácido gordo, podem ser quantificadas através de um anticorpo contra o terminal carboxilo.

A Tabela 23 mostra o resultado do exame dos conteúdos da grelina modificada com um ácido gordo e os conteúdos da grelina modificada com um ácido gordo e da grelina da qual foi libertado um ácido gordo, em vários tecidos de um organismo vivo.

Tabela 23

Tecidos	Quantidade de grelina de rato que reage com anticorpo (fmol/mg tecidos)	
	C-RIA	N-RIA
Hipotálamo	1,8 ± 0,3	<0,05
Pituitária	8,5 ± 3,1	<0,05
Tiróide	3,5 ± 2,0	<0,05
Glândula da mandíbula	8,8 ± 1,3	<0,05
Timo	3,5 ± 0,4	<0,05
Glândula adrenal	3,1 ± 0,4	<0,05

(continuação)

Tecidos	Quantidade de grelina de rato que reage com anticorpo (fmol/mg tecidos)	
	C-RIA	N-RIA
Átrio	2,3 ± 0,2	0,07 ± 0,01
Ventrículo	2,1 ± 0,1	<0,05
Aorta	2,4 ± 0,7	0,14 ± 0,03
Pulmão	3,1 ± 0,4	<0,05
Fígado	2,8 ± 0,5	<0,05
Pâncreas	2,6 ± 0,6	0,15 ± 0,05
Estômago	1779,8 ± 533,9	377,31 ± 55,83
Duodeno	106,7 ± 7,3	20,57 ± 0,69
Jejuno	60,2 ± 17,2	10,73 ± 5,44
Íleo	20,5 ± 5,1	0,16 ± 0,08
Ceco	15,1 ± 2,5	1,70 ± 5,44
Côlon	10,4 ± 0,7	<0,05
Rim	5,4 ± 0,3	<0,05
Espermário	2,8 ± 0,2	<0,05
Plasma (1 mL)	219,6 ± 71,8	4,02 ± 1,91

Na tabela, C-RIA indica o resultado da quantificação por radioimunoensaio, utilizando o anticorpo contra o terminal carboxilo, enquanto que N-RIA indica o resultado da quantificação com anticorpo contra o terminal amina.

Os valores numéricos na tabela indicam “média ± desvio padrão”.

Exemplo 17. Produção de grelina de rato (1-28) por um método de semi-síntese

Esquema de síntese

Neste exemplo, foi produzida rGrelina a partir dos fragmentos rGrelina (6-28) e Grelina (1-7), anteriormente preparados, respectivamente, por métodos de engenharia genética e de síntese química, como se segue.

Especificamente, foi expressa β -galactosidase 97-(QFE-SRHRR)-rGrelina (6-28) ou seja, uma proteína de fusão entre a β -galactosidase 97 e a rGrelina (6-28), no interior da qual está presente uma sequência de aminoácidos (-QFE-SRHRR-), tendo um local de quebra pela protease V8 e pela protease KexII, em *E. coli*. Esta proteína de fusão foi tratada com a protease V8, para excisar SRHRR rGrelina (6-28). Em seguida, todos os grupos amina da SRHRR rGrelina (6-28) foram protegidos com grupos Boc e o péptido resultante foi tratado com a protease KexII, para originar [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) da qual o grupo amina do terminal amina da Ser 6 tinha sido isolado. Este fragmento protegido foi condensado [com N^α-Boc]-rGrelina (1-5)-Osu, obtida por síntese química e a [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina resultante, foi tratada com um ácido, pelo que, foi produzida rGrelina.

Neste exemplo, foi descrita a semi-síntese da rGrelina, mas pode ser, também, sintetizada hGrelina, através deste método.

Além disso, neste exemplo, o fragmento (1-5) foi condensado com o fragmento (6-28), mas os fragmentos (1-2), (1-3) e (1-7)

do terminal amina, sintetizados quimicamente, podem ser, respectivamente, condensados com os fragmentos (3-28), (4-28) e (8-28) do terminal carboxilo, com um comprimento arbitrário, consistindo em aminoácidos da 28^a posição até à 3^a posição, construídos através de engenharia genética, para produção de grelina como uma proteína de fusão. Para a redução do número de passos na síntese química, é vantajosa a condensação entre (1-2) e (3-28) ou entre (1-3) e (4-28). Do ponto de vista da prevenção completa da racemização causada pela condensação, é, particularmente preferida a condensação entre (1-7) e (8-28), utilizando Pro 7.

Construção de vector de expressão pG97s rGR e expressão da grelina (6-28) como uma proteína de fusão

Foi obtido um fragmento de ADN da rGrelina (6-28) tendo uma sequência de aminoácidos QFE-SRHRR na região pré-pró, com base na sequência nucleotídica do ADNc da grelina de rato, por emparelhamento, utilizando um oligómero totalmente sintético.

Para inserir este fragmento de ADN em pG97SnPPH34 (JP-A 9-296000), o pG97SnPPH34 foi tratado com SalI e SmaI, eliminando, deste modo, o seu gene precursor da hormona paratiróide humana. O produto foi tratado com fosfatase alcalina e foi ligado com ligase de T4, ao fragmento do gene derivado da rGrelina, anteriormente tratado com SalI e cinase. O plasmídeo ligado foi transformado na estirpe DH5 de *E. coli*, para originar o plasmídeo pG97s rGR.

O plasmídeo pG97s rGR foi transformado em *E. coli* M25 (*ompT*) e o transformante resultante foi cultivado em 3 placas,

contendo, cada uma, 200 mL de meio de líquido *Terrific Broth* (triptona a 1,2%, extracto de levedura a 2,4%, glicose a 0,4%) e foi cultivado sob agitação, a 37 °C. Quando a concentração (OD₆₆₀) das célula bacterianas atingiu 0,8, foi aí adicionado isopropil-1-tio-β-D-galactopiranósido (IPTG), numa concentração final de 2 mM, para a expressão da proteína de fusão rGrelina (6-28). Além disso, as células bacterianas foram cultivadas durante 4 horas e, depois, foram recolhidas por centrifugação. A estrutura da proteína de fusão rGrelina (6-28) é como se segue:

Proteína de fusão rGrelina 6-28:

(β-Galactosidase-97S)-QFE-SRHRR rGrelina (6-28)

Processamento da proteína de fusão rGrelina 6-28 e purificação de [SRHRR]-rGrelina (6-28)

Foram suspensos 20 mL das células bacterianas resultantes, em tampão TE e as células bacterianas foram rebentadas com uma prensa francesa. Depois, os corpos de inclusão foram recolhidos por centrifugação a 3000 rpm, durante 15 minutos, foram suspensos, novamente, em 10 mL de tampão TE e água desionizada e foram centrifugados, pelo que, o corpo de inclusão foi lavado. O corpo de inclusão foi diluído com água desionizada de forma a que a sua OD₆₆₀ fosse reduzida para 50,0 e foi aí adicionado Tris-HCl (pH 8,2), numa concentração final de 50 mM e o corpo de inclusão foi dissolvido em ureia (concentração final: 3,5 M). Foi adicionado derivado V8D5 da protease rV8 (abreviado, depois, como V8D5) (JP-A9-47291), numa concentração final de 10 g/mL, a esta solução mantida a 30 °C e a solução foi tratada com a enzima a 30 °C, durante 20 minutos. A reacção foi terminada pela adição de ácido acético a 3% (AcOH).

Foi adicionado um excesso de 1,5 vezes de água desionizada à solução da reacção terminada da enzima V8D5, contendo [SRHRR]-rGrelina (6-28), depois, esta solução foi ajustada para pH 5,0 com NaOH 5 N, para precipitar o fragmento derivado da β -galactosidase que foi, então, removido por centrifugação a 5000 rpm, durante 10 minutos.

O sobrenadante contendo [SRHRR]-rGrelina (6-28) foi aplicado a uma coluna TSK-ODS 80Ts (diâmetro das partículas de resina de 20 μm , 50 mm I.D. x 100 mm, TOSOH Co., Ltd.), previamente equilibrada com TFA a 0,1%. O péptido pretendido foi eluído com um gradiente linear, de tampão A a 100% [0,8 mL/min., acetonitrilo 1%, TFA a 0,1%] até tampão B a 100% [acetonitrilo a 50%, TFA a 0,095%], a qual foi programada para terminar num volume de 5 colunas. Foram recolhidas as fracções contendo o péptido pretendido [SRHRR]-rGrelina (6-28) (cerca de 50 mg).

Purificação da [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28)

Foram adicionadas 6 moles equivalentes (19,2 mg, 6 x 15 μmol) de bicarbonato de di-t-butilo, à solução aquosa de acetonitrilo a 50%, contendo cerca de 50 mg (15 μmol) de [SRHRR]-rGrelina (6-28), depois, foi ajustada para pH 9 com trietilamina e deixada à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Foi adicionado ácido acético à solução de reacção, numa concentração final de 0,5% e, após o acetonitrilo ter sido evaporado, a solução foi adicionada à coluna pré-empacotada EMPORE-Octil (C8) HD 4 mm/1 mL, previamente equilibrada com acetonitrilo a 10%, contendo de TFA a 0,1% e, após a coluna ter sido lavada com solução de equilibração, a

[Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) foi eluída com acetonitrilo a 90%, contendo TFA a 0,095%. O acetonitrilo foi evaporado e foram obtidos 6 mL de solução contendo cerca de 30 mg do péptido pretendido.

A espectrometria de massa indicou, principalmente, dois péptidos, cujo peso molecular após a modificação Boc foi aumentado em 500 (peso molecular determinado, 3895) ou em 600 (peso molecular determinado, 3995) em relação ao peso molecular (peso molecular determinado = 3396, peso molecular teórico = 3398) antes da modificação Boc.

Quebra de [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) pela protease Kex2 e sua purificação.

Foram adicionados uma solução de cloreto de cálcio e Tris-HCl, pH 8,2, em concentrações finais de, respectivamente, 0,3 mM e 20 mM, à solução aquosa resultante da [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) (30 mg, 6 mL). Após ter sido aí adicionada uma solução da protease Kex2 (JP-A 10-229884), numa concentração de 1×10^5 unidades/mL, a amostra foi tratada com a protease a 30 °C, durante 60 minutos.

Em HPLC, desapareceu um pico da [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28), foi deslocado um pico da [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) em direcção à região da hidrofobicidade e foi observado um pico de um fragmento hidrofílico correspondente a Boc-SRHRR.

Após o desaparecimento do material de partida ter sido confirmado, a solução de reacção foi ajustada para pH 3,5 com

ácido acético aquoso e foi aplicada na coluna ODS-80Ts de cromatografia de fase reversa (volume da coluna de 1,66 cc, diâmetro das partículas da resina 20 µm, TOSOH Co., Ltd.), previamente equilibrada com acetonitrilo a 1,0%, contendo ácido acético a 1%. Após a coluna ter sido lavada com um volume de 5 colunas de solução de equilibração, a [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) foi eluída com um gradiente linear de acetonitrilo a 1,0% até acetonitrilo a 90,0%, contendo, ambas, ácido acético a 1%, a qual foi programada para terminar num volume de 5 colunas. As fracções principais foram liofilizadas, para originar 6,2 mg do péptido protegido pretendido.

Condensação do fragmento e desprotecção

Foram adicionados trietilamina (51,0 µL, 0,366 mmol) e uma solução de bicarbonato de di-t-butilo (78,0 mg, 0,0356 mmol), em TFE (4,00 mL), respectivamente, a uma solução de Grelina (1-5) (190 mg, 0,0301 mmol, Composto 31), em trifluoroetanol (TFE) (6,00 mL) e foram misturados, à temperatura ambiente, durante 13 horas. O solvente foi evaporado e foi adicionado éter (20,0 mL) aos resíduos resultantes, pelo que, foram obtidos 180,5 mg de [N^{α} -Boc]-rGrelina (1-5).

Depois, foi adicionado HOSu (5,20 mg, 0,0452 mmol) a uma solução de [N^{α} -Boc]-rGrelina (1-5) (22,0 mg, 0,0301 mmol), em DMF (1,00 mL) e foi aí adicionado DIPCI (7,30 µL, 0,0466 mmol), num banho a -30 °C. Após a mistura ter sido agitada no banho a -30 °C, durante 1 hora e, depois, à temperatura ambiente, durante 18 horas, o solvente foi evaporado e os resíduos resultantes foram convertidos em pó, com éter, para originar 14,1 mg de

[N^α-Boc]-rGrelina (1-5)-OSu, sob a forma de um éster de succinimida da [N^α-Boc]-rGrelina (1-5).

Depois, foram adicionados [N^α-Boc]-rGrelina (1-5)-OSu (3,3 mg, 3,96 µmol) e trietilamina (2,5 µL, 17,9 µmol) a uma solução de [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) (6,10 mg, 2,18 µmol), em DMF (0,6 mL), preparada pelo método recombinante e foram misturados à temperatura ambiente, durante 24 horas. O solvente foi evaporado, foi adicionado TFA (2,00 mL), sob arrefecimento em gelo, directamente aos resíduos resultantes e foi misturado à temperatura ambiente, durante 1,5 horas. O TFA foi evaporado e foi adicionado éter aos resíduos, pelo que, foram obtidos 6,2 mg de péptido bruto, contendo Grelina (1-28).

Este produto foi dissolvido em 2 mL de ácido acético a 5% (AcOH), foi aplicado à YMC-Pack-ODS-A (5 µm, 20 mm x 250 mm) e foi eluído com um gradiente linear de 0 a 95% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 10 mL/min.), durante 60 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas, foram liofilizadas, foram aplicadas à YMC-PackPROTEIN-RP (C4, 10 mm x 250 mm) e foram eluídas com um gradiente linear de 7,5 a 21,3% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 4,7 mL/min.), durante 30 minutos.

As fracções pretendidas foram recolhidas, foram liofilizadas, foram aplicadas à YMC-PackPROTEIN-RP (C4, 10 mm x 250 mm) e foram eluídas com um gradiente linear de 7,5 a 21,3% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1% (caudal: 4,7 mL/min.), durante 30 minutos. As fracções pretendidas foram recolhidas e liofilizadas, para originar 2,1 mg de rGrelina (1-28). Este produto apresentou um tempo de retenção em HPLC analítico concordante com o do padrão de

rGrelina (1-28) e apresentou uma actividade intracelular de libertação de Ca de EC₅₀=1,5 nM, a qual foi equivalente à da grelina natural. ESI-MS 3315,0 (teórico: 3314,8), composição em aminoácidos: Ser; 3,74 (4), Glx; 5,69 (6), Gly; 1,18 (1), Ala; 2,05 (2), Leu; 2, Phe; 0,98 (1), Lys; 4,98 (5), His; 1,03 (1), Arg; 1,96 (2), Pro; 4,01 (4)

Composto 87 [^Dleu⁵]-rGrelina (1-28)

Foram obtidas 0,8 mg de [^Dleu⁵]-rGrelina (1-28), como sub-produto na esterificação da [N^α-Boc]-rGrelina (1-5) com succinimida ou na condensação dos fragmentos. A sua actividade intracelular de libertação de Ca foi EC₅₀ = 220 nM.

ESI-MS 3315,0 (teórico: 3314,8), composição em aminoácidos: Ser; 3,80 (4), Glx; 5,92 (6), Gly; 1,23 (1), Ala; 2,07 (2), Leu; 2, Phe; 0,97 (1), Lys; 4,92 (5), His; 1,02 (1), Arg; 1,97 (2), Pro; 4,11 (4)

Análise de GC-MS da leucina, após hidrólise em D₂O/DCl: L-Leu; 1,17 (1), D-Leu; 0,83 (1)

Aplicabilidade Industrial

Pela administração do novo composto do tipo peptídico da presente invenção ou de um seu sal farmaceuticamente aceitável, em humanos ou animais, este demonstra um efeito de actividade excelente como uma preparação farmacêutica para a promoção do crescimento de crianças e melhoria do defeito de funções metabólicas causadas pela deficiência em GH, pela indução da

secreção da GH, sem causar efeitos secundários substanciais e o seu anticorpo demonstra um efeito de actividade excelente como um agente de diagnóstico de doenças atribuíveis à deficiência em GH e como um instrumento de investigação no campo da ciência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> KANGAWA, Kenji

<120> Novos Péptidos

<130> DS03F216 (EP)

<150> Documento JP 1999/210002

<151> 1999-7-23

<150> Documento JP 1999/338841

<151> 1999-11-29

<150> Documento JP 2000/126623

<151> 2000-4-26

<160> 39

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<223> Sequência de aminoácidos para uma região nuclear de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

1 5

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de rato

<400> 2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

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

20 25

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento humana

<400> 3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

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

20 25

<210> 4

<211> 117

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<223> Sequência de aminoácidos para a forma pré-pró de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de rato

<400> 4

Met	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Leu
1									10					15	
Trp	Met	Asp	Met	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His
	20							25					30		
Gln	Lys	Ala	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu
	35						40				45				
Gln	Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Trp	Leu	His	Pro	Glu	Asp	Arg	Gly	Gln
	50				55				60						
Ala	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro	Phe
	65				70				75			80			
Asp	Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Tyr	Gln	Gln	His	Gly	Arg
				85				90				95			
Ala	Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Glu
				100				105				110			
Ala	Pro	Ala	Asn	Lys											
				115											

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<223> Sequência de aminoácidos para a forma pré-pró de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento humana

<400> 5

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu			
1	5	10	15
Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His			
20	25	30	
Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu			
35	40	45	
Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln			
50	55	60	
Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe			
65	70	75	80
Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln			
85	90	95	
Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu			
100	105	110	
Ala Pro Ala Asp Lys			
115			

<210> 6

<211> 501

<212> ADNC

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<221> CDS

<222> (31) ... (381)

<223> Sequência de bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de rato

<400> 6

tccagatcat	ctgtcctcac	caccaaggcc	atg	gtg	tct	tca	gct	act	48
			Met	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	
			1				5		
atc	tgc	agt	ttg	cta	ctc	ctc	agc	atg	96
Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	
								Trp	
			10				15		20
gca	ggt	tcc	agc	ttc	ttg	agc	cca	gag	144
Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	
								His	
			25				30		35
aag	gaa	tcc	aag	aag	cca	cca	gct	aaa	192
Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	
								Gln	
			40				45		50
ggc	tgg	ctc	cac	cca	gag	gac	aga	gga	240
Gly	Trp	Leu	His	Pro	Glu	Asp	Arg	Gly	
								Gln	
			55				60		65
gag	ctg	gaa	atc	agg	ttc	aat	gct	ccc	288
Glu	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro	
								Phe	
			75				80		85
tca	gga	gct	cag	tac	cag	cag	cat	ggc	336
Ser	Gly	Ala	Gln	Tyr	Gln	Gln	His	Gly	
								Arg	
			90				95		100
cag	gat	atc	ctc	tgg	gaa	gag	gtc	aaa	381
Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	
								Glu	
			105				110		115
taaccactga	caggacttgtt	ccctgtaccc	tcctcctaag	caagaactca	catccagctt	441			
ctgcctcc	tgcaactccc	agcactctcc	tgctgactta	caaataatg	ttcaagctgt	501			

<210> 7

<211> 511

<212> ADN

<220>

<221> CDS

<222> (34) ... (384)

<213> *Homo sapiens*

<223> Sequência de bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento humana

<400> 7

gcaggccccac	ctgtctgcaa	cccagctgag	gcc atg ccc tcc cca	45
			Met Pro Ser Pro	
			1	
ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg	93			
Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Gly Met Leu Trp Leu Asp Leu				
5	10	15	20	
gcc atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag	141			
Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln				
25	30	35		
cag aga aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct	189			
Gln Arg Lys Glu Ser Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala				
40	45	50		
cta gca ggc tgg ctc cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca	237			
Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala				
55	60	65		
gag gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc	285			
Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile				
70	75	80		

aag ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag 333
Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys
85 90 95 100
ttt ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac 381
Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp
105 110 115
aag tgatcgccca caagccttac tcacctctct ctaagtttag aagcgctcat 434
Lys

ctggcttttc gcttgcttct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga 494
ataaatgttc aaacttgt 511

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<223> Sequência de aminoácidos para uma região nuclear de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento

<400> 8

Gly Ser Ser Phe

1

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<223> Sequência de aminoácidos para uma região nuclear de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento

<400> 9

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln

1 5 10

<210> 10

<211> 27

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento de rato

<400> 10

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu

1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 11

<211> 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento humana

<400> 11

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Arg	Val	Gln	Arg	Lys	Glu
1															15
Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Arg					
											20		25		

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<223> Sequência de aminoácidos para a forma pré-pró de péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento de rato

<400> 12

Met	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Leu
1															15
Trp	Met	Asp	Met	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His
															30
Gln	Lys	Ala	Gln	Arg	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln
															45
Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Trp	Leu	His	Pro	Glu	Asp	Arg	Gly	Gln	Ala
															60
Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro	Phe	Asp
															80
Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Tyr	Gln	Gln	His	Gly	Arg	Ala
															95
Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Glu	Ala
															110
Pro	Ala	Asn	Lys												
															115

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<223> Sequência de aminoácidos para a forma pré-pró de péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento humana

<400> 13

Met	Pro	Ser	Pro	Gly	Thr	Val	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Met	Leu
1									10					15	
Trp	Leu	Asp	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His
					20				25					30	
Gln	Arg	Val	Gln	Arg	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln
					35			40					45		
Pro	Arg	Ala	Leu	Ala	Gly	Trp	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	Gly	Gln	Ala
					50			55				60			
Glu	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro	Phe	Asp
					65			70			75			80	
Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Gln	Tyr	Gln	Gln	His	Ser	Gln	Ala
					85				90			95			
Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala
					100				105			110			
Pro	Ala	Asp	Lys												
					115										

<210> 14
<211> 498
<212> ADNC
<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<221> CDS

<222> (31) ... (378)

<223> Sequênciade bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento de rato

<400> 14

tccagatcat	ctgtcctcac	caccaaggcc	atg	gtg	tct	tca	gcg	act	48
			Met	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	
			1				5		
atc	tgc	agt	ttg	cta	ctc	ctc	agc	atg	96
Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	
								Trp	
								Met	Asp
									Met
									Ala
gca	ggt	tcc	agc	ttc	ttg	agc	cca	gag	144
Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	
								His	
								Gln	
								Lys	
								Ala	Gln
								Arg	Lys
25				30			35		
gaa	tcc	aag	aag	cca	cca	gct	aaa	ctg	192
Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	
								Gln	Pro
								Arg	Arg
								Ala	Leu
40				45			50		Glu
tgg	ctc	cac	cca	gag	gac	aga	gga	caa	240
Trp	Leu	His	Pro	Glu	Asp	Arg	Gly	Gln	
								Ala	Glu
								Glu	Glu
55				60			65		Glu
ctg	gaa	atc	agg	ttc	aat	gct	ccc	ttc	288
Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro	Phe	
								Asp	
								Val	
								Gly	
75					80			Ile	
gga	gct	cag	tac	cag	cag	cat	ggc	cg	336
Gly	Ala	Gln	Tyr	Gln	Gln	His	Gly	Arg	
								Ala	
								Leu	
								Gly	
90					95			Lys	
gat	atc	ctc	tgg	gaa	gag	gtc	aaa	gag	100
Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Glu	
								Ala	
								Pro	
								Ala	
105					110			Asn	
taaccactga	caggacttgtt	ccctgtactt	tcctcctaag	caagaactca	catccagctt	438			
ctgcctcctc	tgcaactccc	agcactctcc	tgctgactta	caaataatg	ttcaagctgt	498			

<210> 15

<211> 508

<212> ADN

<220>

<221> CDS

<222> (34) . . . (381)

<213> *Homo sapiens*

<223> Sequência de bases de ADNc codificando a forma pré-pró para péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento humana

<400> 15

```

gcaggccac ctgtctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca          45
                      Met Pro Ser Pro

                           1

ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg  93
Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu Trp Leu Asp Leu
   5                  10                  15                  20

gcc atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag 141
Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
   25                 30                 35

aga aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct cta 189
Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu
   40                 45                 50

gca ggc tgg ctc cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca gag 237
Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala Glu
   55                 60                 65

gat gaa ctg gaa gtc cggtt aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc aag 285
Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys
   70                 75                 80

```

ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag ttt	333		
Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys Phe			
85	90	95	100
ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac aag	381		
Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp Lys			
105	110	115	
tgatcgccca caagccttac tcacctctct ctaagtttag aagcgctcat	431		
ctggctttc gcttgcttct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga	491		
ataaatgttc aaactgt	508		

<210> 16

<211> 28

<212> PRT

<213> *Sus scrofa* (porco)

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento porcina

<400> 16

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys			
1	5	10	15
Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg			
20	25		

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> *Sus scrofa* (porco)

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento porcina

<400> 17

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Lys	Val	Gln	Arg	Lys	Glu
1															15
Ser	Lys	Lys	Pro	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Pro	Arg					
											20				25

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> *Sus scrofa* (porco)

<223> Sequência de aminoácidos para a forma pré-pró de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento porcina

<400> 18

Met	Pro	Ser	Thr	Gly	Thr	Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	Leu
1															15
Leu	Met	Ala	Asp	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu
															30
20															
His	Gln	Lys	Val	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Ala	Ala	Lys
															45
35															
Leu	Lys	Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Trp	Leu	Gly	Pro	Glu	Asp	Ser	Gly
															60
50															
Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Glu	Asp	Lys	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro
															80
65															
Cys	Asp	Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Ser	Asp	Gln	His	Gly
															95
85															
Gln	Pro	Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Thr
															110
100															
Glu	Ala	Pro	Ala	Asp	Lys										
115															

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> *Sus scrofa* (porco)

<223> Sequência de aminoácidos para a forma pré-pró de péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento porcina

<400> 19

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu
1 5 10 15
Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu
 20 25 30
His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu
 35 40 45
Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly Glu
 50 55 60
Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Cys
 65 70 75 80
Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly Gln
 85 90 95
Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr Glu
 100 105 110
Ala Pro Ala Asp Lys
 115

<210> 20

<211> 494

<212> ADN

<220>

<221> CDS

<222> (9) ... (362)

<213> *Sus scrofa* (porco)

<223> Sequência de bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento porcina

<400> 20

ctgaggcc	atg	ccc	tcc	acg	ggg	acc	att	tgc	agc	ctg	ctg	ctc	ctc	47			
Met	Pro	Ser	Thr	Gly	Thr	Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu						
1						5						10					
agc	gtg	ctc	ctc	atg	gca	gac	ttg	gcc	atg	gcg	ggc	tcc	agc	ttc	ttg	95	
Ser	Val	Leu	Leu	Met	Ala	Asp	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu		
15						20						25					
agc	ccc	gaa	cac	cag	aaa	gtg	cag	cag	aga	aag	gag	tcc	aag	aag	cca	143	
Ser	Pro	Glu	His	Gln	Lys	Val	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro		
30						35				40				45			
gca	gcc	aaa	ctg	aag	ccc	cg	gcc	ctg	gaa	ggc	tgg	ctc	ggc	cca	gaa	191	
Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Trp	Leu	Gly	Pro	Glu		
50						55				60							
gac	agt	ggt	gag	gtg	gaa	ggc	acg	gag	gac	aag	ctg	gaa	atc	cg	ttc	239	
Asp	Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Glu	Asp	Lys	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe		
65						70				75							
aac	gcc	ccc	tgt	gat	gtt	ggg	atc	aag	ttg	tca	ggg	gct	cag	tcc	gac	287	
Asn	Ala	Pro	Cys	Asp	Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Ser	Asp		
80						85				90							
cag	cac	ggc	cag	ccc	ctg	ggg	aaa	ttt	ctc	cag	gac	atc	ctc	tgg	gaa	335	
Gln	His	Gly	Gln	Pro	Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu		
95						100				105							
gag	gtc	act	gag	gcc	ccg	gcc	gac	aag	tgattgtccc	tgagaccagc					382		
Glu	Val	Thr	Glu	Ala	Pro	Ala	Asp	Lys									
110						115											
cac	ct	tc	gtt	ct	cc	cc	at	gc	ct	cc	agg	ac	gct	tcc	actatca	442	
cac	cc	ca	g	tc	tg	gg	at	gc	tgg	g	gt	gaataaa	catt	cag	act	gg	494

<210> 21

<211> 491

<212> ADN

<220>

<221> CDS

<222> (9) ... (359)

<213> *Sus scrofa* (porco)

<223> Sequência de bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento porcina

<400> 21

ctgaggcc	atg	ccc	tcc	acg	ggg	acc	att	tgc	agc	ctg	ctg	ctc	ctc	47		
Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu																
1		5								10						
agc	gtg	ctc	ctc	atg	gca	gac	ttg	gcc	atg	gcg	ggc	tcc	agc	ttc	ttg	95
Ser Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu																
15		20								25						
agc	ccc	gaa	cac	cag	aaa	gtg	cag	aga	aag	gag	tcc	aag	aag	cca	gca	143
Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala																
30		35							40				45			
gcc	aaa	ctg	aag	ccc	cgg	gcc	ctg	gaa	ggc	tgg	ctc	ggc	cca	gaa	gac	191
Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp																
50		55							60							
agt	ggt	gag	gtg	gaa	ggc	acg	gag	gac	aag	ctg	gaa	atc	cgg	ttc	aac	239
Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn																
65		70							75							
gcc	ccc	tgt	gat	gtt	ggg	atc	aag	ttg	tca	ggg	gct	cag	tcc	gac	cag	287
Ala Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln																
80		85							90							

cac ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc tgg gaa gag 335
His Gly Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu
95 100 105
gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccagc 379
Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys
110 115

<210> 22
<211> 27
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento bovina

<400> 22

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Glu
1															15
<hr/>															
Ala	Lys	Lys	Pro	Ser	Gly	Arg	Leu	Lys	Pro	Arg					
											20			25	

<210> 23
<211> 89
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

<223> Sequência aminoácidos parcial para a forma pré-pró de peptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento bovina

<400> 23

Asp	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Glu
1					5					10					15
Leu	Gln	Arg	Lys	Glu	Ala	Lys	Lys	Pro	Ser	Gly	Arg	Leu	Lys	Pro	Arg
					20				25					30	
Thr	Leu	Glu	Gly	Gln	Phe	Asp	Phe	Glu	Val	Gly	Ser	Gln	Ala	Glu	Gly
					35				40					45	
Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Phe	Phe	Asn	Ile	Gly
					50				55					60	
Ile	Lys	Leu	Ala	Gly	Ala	Gln	Ser	Leu	Gln	His	Gly	Gln	Thr	Leu	Gly
					65			70			75				80
Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu							
					85										

<210> 24

<211> 267

<212> ADN

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(267)

<213> *Bos taurus*

<223> Sequência de bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos (27 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento bovina

<400> 24

gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttt ctg agc ccc gaa cat cag gaa 48
Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu
1 5 10 15

ctg cag aga aag gaa gct aag aag cca tca ggc aga ctg aag ccc cgg 96
Leu Gln Arg Lys Glu Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
20 25 30

acc ctg gaa ggc cag ttt gac ccg gag gtg gga agt cag gcg gaa ggt 144
Thr Leu Glu Gly Gln Phe Asp Phe Glu Val Gly Ser Gln Ala Glu Gly
35 40 45

gca gag gac gag ctg gaa atc cgg ttc aac gcc ccc ttt aac att ggg 192
Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Phe Phe Asn Ile Gly
50 55 60

atc aag cta gca ggg gct cag tcc ctc cag cat ggc cag acg ttg ggg 240
Ile Lys Leu Ala Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr Leu Gly
65 70 75 80

aag ttt ctt cag gac atc ctc tgg gaa 267
Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu
85

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> *Gallus domesticus*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de galinha

<400> 25

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Thr	Tyr	Lys	Asn	Ile	Gln	Gln	Lys
1	5													15
Gly	Thr	Arg	Lys	Pro	Thr	Ala	Arg							
														20

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> *Anguilla japonica*

<220>

<221> AMIDAÇÃO

<222> 21

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de enguia

<400> 26

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys
1 5 10 15
Lys Pro Pro Arg Val
20

<210> 27

<211> 28

<212> PRT

<213> *Rana cafesbeiana*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de rã

<400> 27

Gly Leu Ser Phe Leu Ser Pro Ala Glu Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg
1 5 10 15
Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met Arg
20 25

<210> 28

<211> 27

<212> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de rã (*Xenopus laevis*)

<400> 28

Gly	Leu	Thr	Phe	Leu	Ser	Pro	Ala	Asp	Met	Gln	Lys	Ile	Ala	Glu	Arg
1															15
Gln	Ser	Gln	Asn	Lys	Leu	Arg	His	Gly	Asn	Met					
											20				25

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<220>

<221>AMIDAÇÃO

<222> 23

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos (23 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento da truta arco-íris

<400> 29

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Lys	Pro	Gln	Val	Arg	Gln	Gly
1															15
Lys	Gly	Lys	Pro	Pro	Arg	Val									
							20								

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<220>

<221> AMIDAÇÃO

<222> 20

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos (20 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento de truta arco-íris

<400> 30

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly Lys			
1	5	10	15
Pro Pro Arg Val			
20			

<210> 31

<211> 28

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de cão

<400> 31

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys			
1	5	10	15
Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg			
20	25		

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> *Anguilla japonica*

<223> Sequência de aminoácidos para a forma pré-pró de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de enguia

<400> 32

Met Lys Arg Thr Ala Tyr Ile Ile Leu Leu Val Cys Val Leu Ala Leu			
1	5	10	15
Trp Met Asp Ser Val Gln Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln			
20	25	30	
Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp			
35	40	45	
Ser Asp Gly Ile Leu Asp Leu Phe Met Arg Pro Pro Leu Gln Asp Glu			
50	55	60	
Asp Ile Arg His Ile Thr Phe Asn Thr Pro Phe Glu Ile Gly Ile Thr			
65	70	75	80
Met Thr Glu Glu Leu Phe Gln Gln Tyr Gly Glu Val Met Gln Lys Ile			
85	90	95	
Met Gln Asp Leu Leu Met Asp Thr Pro Ala Lys Glu			
100	105		

<210> 33

<211> 114

<212> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<223> Sequência de aminoácidos para péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de rã (*Xenopus laevis*)

<400> 33

Met Asn Phe Gly Lys Ala Ala Ile Phe Gly Val Val Leu Phe Cys Leu			
1	5	10	15
Leu Trp Thr Glu Gly Ala Gln Ala Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala			
20	25	30	
Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His			
35	40	45	
Gly Asn Met Asn Arg Arg Gly Val Glu Asp Asp Leu Ala Gly Glu Glu			
50	55	60	
Ile Gly Val Thr Phe Pro Leu Asp Met Lys Met Thr Gln Glu Gln Phe			
65	70	75	80
Gln Lys Gln Arg Ala Ala Val Gln Asp Phe Leu Tyr Ser Ser Leu Leu			
85	90	95	
Ser Leu Gly Ser Val Gln Asp Thr Glu Asp Lys Asn Glu Asn Pro Gln			
100	105	110	
Ser Gln			

<210> 34

<211> 82

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<223> Sequência de aminoácidos para a forma pré-pró de péptidos endógenos (23 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento de truta arco-íris

<400> 34

Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser
1 5 10 15
Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Val Arg Gln
20 25 30
Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser Phe
35 40 45
Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn Thr
50 55 60
Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe
65 70 75 80
Gln Glu

<210> 35

<211> 99

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<223> Sequência de aminoácidos para a forma pré-pró de péptidos endógenos (20 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento de truta arco-íris

<400> 35

Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser
1 5 10 15
Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly
20 25 30
Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser Phe Ala Glu Leu
35 40 45
Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn Thr Ile Lys Ala
50 55 60
Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe Gln Glu Tyr
65 70 75 80
Gly Ala Val Leu Gln Lys Ile Leu Gln Asp Val Leu Gly Asp Thr Ala
85 90 95
Thr Ala Glu

<210> 36

<211> 503

<212> ADN

<220>

<221> CDS

<222> (66) ... (389)

<213> *Anguilla japonica*

<223> Sequência de bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de enguia

<400> 36

tccaaaggc actgggttc ctcttaagt gcaaaactcc actgtgagct tcagacatga 60

ggcag atg aaa cgc acc gca tac atc atc ctg ctg gtc tgc gtc ctg 107
Met Lys Arg Thr Ala Tyr Ile Ile Leu Leu Val Cys Val Leu
1 5 10

gcg ctg tgg atg gac tct gtc cag gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc 155
Ala Leu Trp Met Asp Ser Val Gln Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro
15 20 25 30

tca cag aga ccg cag ggg aag gat aag aag cct ccc agg gtt ggc aga 203
Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg
35 40 45

cga gac tca gat ggg atc ctg gac ctg ttt atg agg ccc cca ttg cag 251
Arg Asp Ser Asp Gly Ile Leu Asp Leu Phe Met Arg Pro Pro Leu Gln
50 55 60

gat gaa gac atc aga cac att acg ttt aac act cct ttt gag atc ggg 299
Asp Glu Asp Ile Arg His Ile Thr Phe Asn Thr Pro Phe Glu Ile Gly
65 70 75

atc acc atg act gag gag ctg ttc cag caa tat gga gaa gtg atg cag 347
Ile Thr Met Thr Glu Glu Leu Phe Gln Gln Tyr Gly Glu Val Met Gln
80 85 .. 90

aag atc atg cag gat ttg ctg atg gac aca cct gcc aaa gag 389
Lys Ile Met Gln Asp Leu Leu Met Asp Thr Pro Ala Lys Glu
95 100 105

tgacaagagt ggatatgatc tggacttcat aaaacctgc gtccccataa ttccctgcatt 449
attgcatgca taattcaacc aattgttaaa catttaataa aattttgcaa acgc 503

<210> 37

<211> 484

<212> ADN

<220>

<221> CDS

<222> (47) ... (388)

<213> *Xenopus laevis*

<223> Sequência de bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos do secretagogo da hormona do crescimento de rã (*Xenopus laevis*)

<400> 37

tttcactttt atctcgcagg cggcacccgtt gaccaggacc ttcagg	46		
atg aat ttt ggt aaa gcc gcc atc ttt ggg gtt gtc ttg ttc tgc ctg 94			
Met Asn Phe Gly Lys Ala Ala Ile Phe Gly Val Val Leu Phe Cys Leu			
1	5	10	15
ctg tgg acg gag ggg gcc cag gct ggc ttg acc ttc ctg agt cca gcc 142			
Leu Trp Thr Glu Gly Ala Gln Ala Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala			
20	25	30	
gac atg cag aag att gcg gag agg caa tca cag aat aag ctg aga cac 190			
Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His			
35	40	45	
ggc aat atg aat cgc agg ggt gtg gag gat gac ctg gcc ggg gag gag 238			
Gly Asn Met Asn Arg Arg Gly Val Glu Asp Asp Leu Ala Gly Glu Glu			
50	55	60	
atc ggg gtg acc ttc cct ctg gat atg aag atg acg cag gag cag ttc 286			
Ile Gly Val Thr Phe Pro Leu Asp Met Lys Met Thr Gln Glu Gln Phe			
65	70	75	80
cag aag cag agg gct gcg gtg cag gac ttc ctg tac tcc tcc ctc ctc 334			
Gln Lys Gln Arg Ala Ala Val Gln Asp Phe Leu Tyr Ser Ser Leu Leu			
85	90	95	
tct ctc ggg tca gtg cag gat aca gaa gac aag aat gaa aat cct cag 382			
Ser Leu Gly Ser Val Gln Asp Thr Glu Asp Lys Asn Glu Asn Pro Gln			
100	105	110	
agc caa tgagaatgtt gaaaatccgc tcgtctctga tgccccctccc cgatctgtgt 438			
Ser Gln			
gtctttatta tctctgtgtt acccagaaat aaatcttatt tatggc 484			

<210> 38

<211> 462

<212> ADN

<220>

<221> CDS

<222> (12) ... (257)

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<223> Sequência de bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos (23 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento de truta arco-íris

<400> 38

tcacagggtct	c atg ata ctg atg ctg tgt act ctg gct ctg tgg gcc	47
	Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala	
1	5	10
aag tca gtc agt gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc tcc cag aaa cca	95	
Lys Ser Val Ser Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro		
15	20	25
cag gta aga cag ggt aaa ggg aag ccc cct cga gtt ggt cgg cga gac	143	
Gln Val Arg Gln Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp		
30	35	40
att gag agc ttt gct gag ctg ttt gag ggt ccc ctt cac cag gaa gac	191	
Ile Glu Ser Phe Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp		
45	50	55
aaa cac aat acg atc aag gct cct ttt gag atg ggc atc acc atg agt	239	
Lys His Asn Thr Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser		
65	70	75
gag gag gag ttc cag gag tatggtgccg tgctgcagaa gatcctgcag	287	
Glu Glu Glu Phe Gln Glu		
80		
gacgtcctgg gagacactgc cactgcagaa tgatcacaac ttggcataga cacgaaatac	347	
aaagaacctc cattccctgt tctccaactt tccttctca acttgtctta tacccaatgt	407	
actgtgtcaa catcggttga attgtaaaag atgaataaaa taaccgcggc cgcta	462	

<210> 39

<211> 453

<212> ADN

<220>

<221> CDS

<222> (12) ... (308)

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<223> Sequência de bases de ADNC codificando a forma pré-pró de péptidos endógenos (20 aminoácidos) do secretagogo da hormona do crescimento de truta arco-íris

<400> 39

tcacagggtct c atg ata ctg atg ctg tgt act ctg gct ctg tgg gcc	47	
Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala		
1	5	10
aag tca gtc agt gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc tcc cag aaa cca	95	
Lys Ser Val Ser Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro		
15	20	25
cag ggt aaa ggg aag ccc cct cga gtt ggt cgg cga gac att gag agc	143	
Gln Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser		

30	35	40
ttt gct gag ctg ttt gag ggt ccc ctt cac cag gaa gac aaa cac aat	191	
Phe Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn		
45	50	55
45 acg atc aag gct cct ttt gag atg ggc atc acc atg agt gag gag gag	239	
Thr Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu		
65	70	75
ttc cag gag tat ggt gcc gtg ctg cag aag atc ctg cag gac gtc ctg	287	
Phe Gln Glu Tyr Gly Ala Val Leu Gln Lys Ile Leu Gln Asp Val Leu		
80	85	90

gga gac act gcc act gca gaa tgatcacaac ttggcataga cacggaatac 338
Gly Asp Thr Ala Thr Ala Glu

95

aaagaacctc cattccctgt tctccaactt tccttctca acttgtctta tacccaatgt 398
actgtgtgaa catcggttga attgtaaaag atgaataaaa taacactgct tcctt 453

Lisboa, 28 de Dezembro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um composto do tipo peptídico,
 - (a) em que o segundo ou terceiro resíduo de aminoácido do terminal amina é um aminoácido modificado seleccionado de serina, treonina, tirosina e oxiprolina, em que um ácido gordo contendo 2 a 35 átomos de carbono é ligado ao grupo hidroxilo de cadeia lateral através de uma ligação éster,
 - (b), o qual comprehende uma sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID Nº: 31, em que o segundo ou terceiro aminoácido do terminal amina é substituído com o referido aminoácido modificado e
 - (c), o qual tem uma actividade de aumentar a concentração intracelular de ião de cálcio em consequência de ligação ao receptor secretagogo da hormona do crescimento ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, para a preparação de um agente farmacêutico promotor do apetite.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o ácido gordo é seleccionado de ácidos gordos contendo 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ou 18 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o ácido gordo é seleccionado do ácido octanóico, um seu ácido gordo monoeno e um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o ácido gordo é seleccionado do ácido decanóico, um seu ácido gordo monoeno e um seu ácido gordo polieno ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.
5. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido composto do tipo peptídico comprehende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID Nº: 31, em que o grupo hidroxilo da cadeia lateral da serina ou da treonina na terceira posição do terminal amina na referida sequência de aminoácidos está acilada com um grupo acilo contendo 2 a 35 átomos de carbono ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.
6. Utilização como reivindicado na reivindicação 1, em que o composto tem adicionalmente uma actividade de indução da secreção da hormona do crescimento.
7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o composto comprehende um aminoácido básico ligado a ao terminal carboxilo ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.
8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o terminal amina é modificado com um alquilo saturado ou não saturado ou um grupo acilo contendo um ou mais átomos de carbono e/ou o grupo hidroxilo no grupo carboxilo no terminal carboxilo é OZ ou é substituído por NR2R3, em que Z é um catião farmaceuticamente aceitável ou um grupo alquilo inferior ramificado ou linear e R2 e R3 são iguais ou diferentes e representam H ou um grupo

alquilo inferior ramificado ou linear ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

9. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o referido agente promotor do apetite é um medicamento para o tratamento da anorexia ou da sitofobia.

Lisboa, 28 de Dezembro de 2009

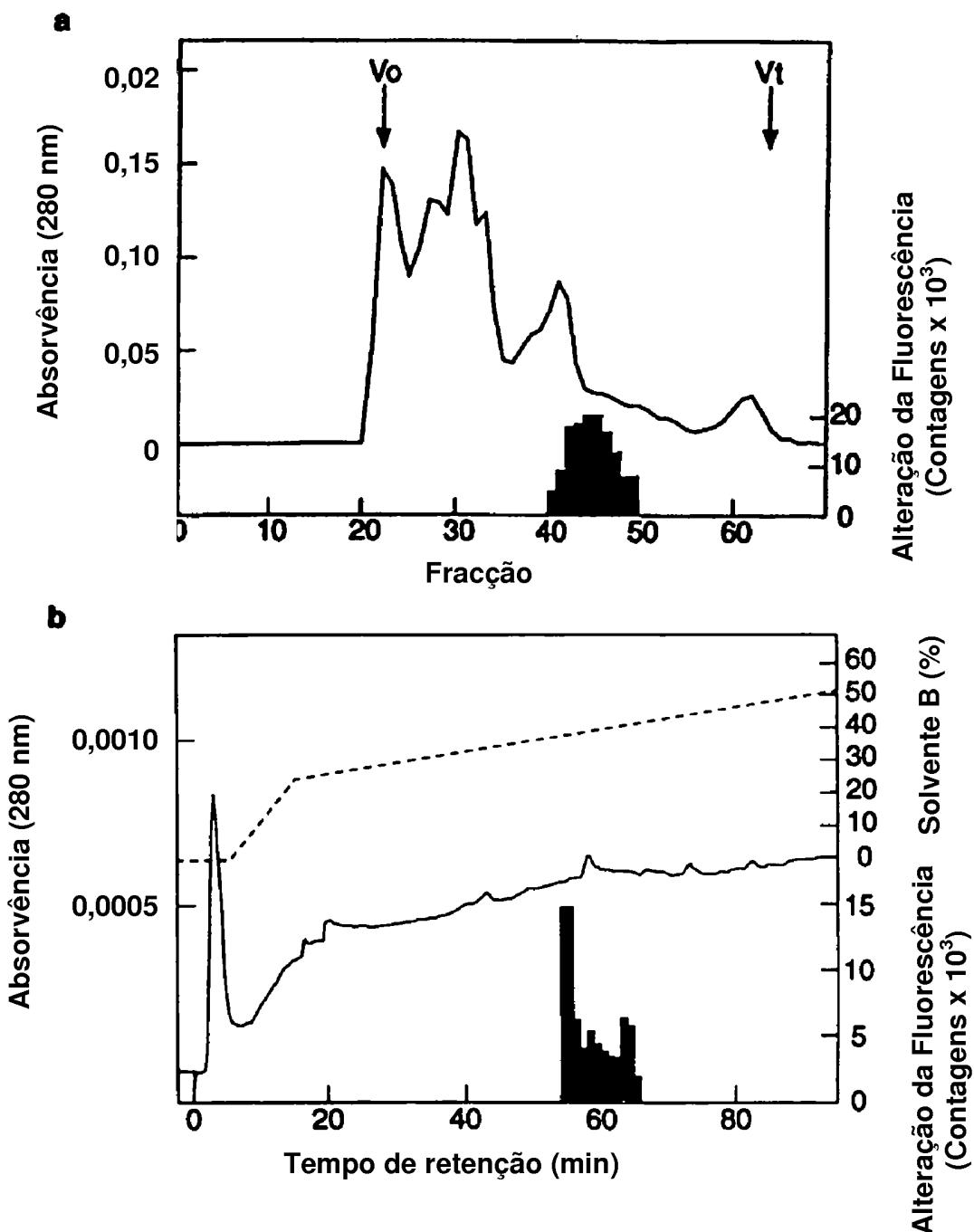
Fig. 1

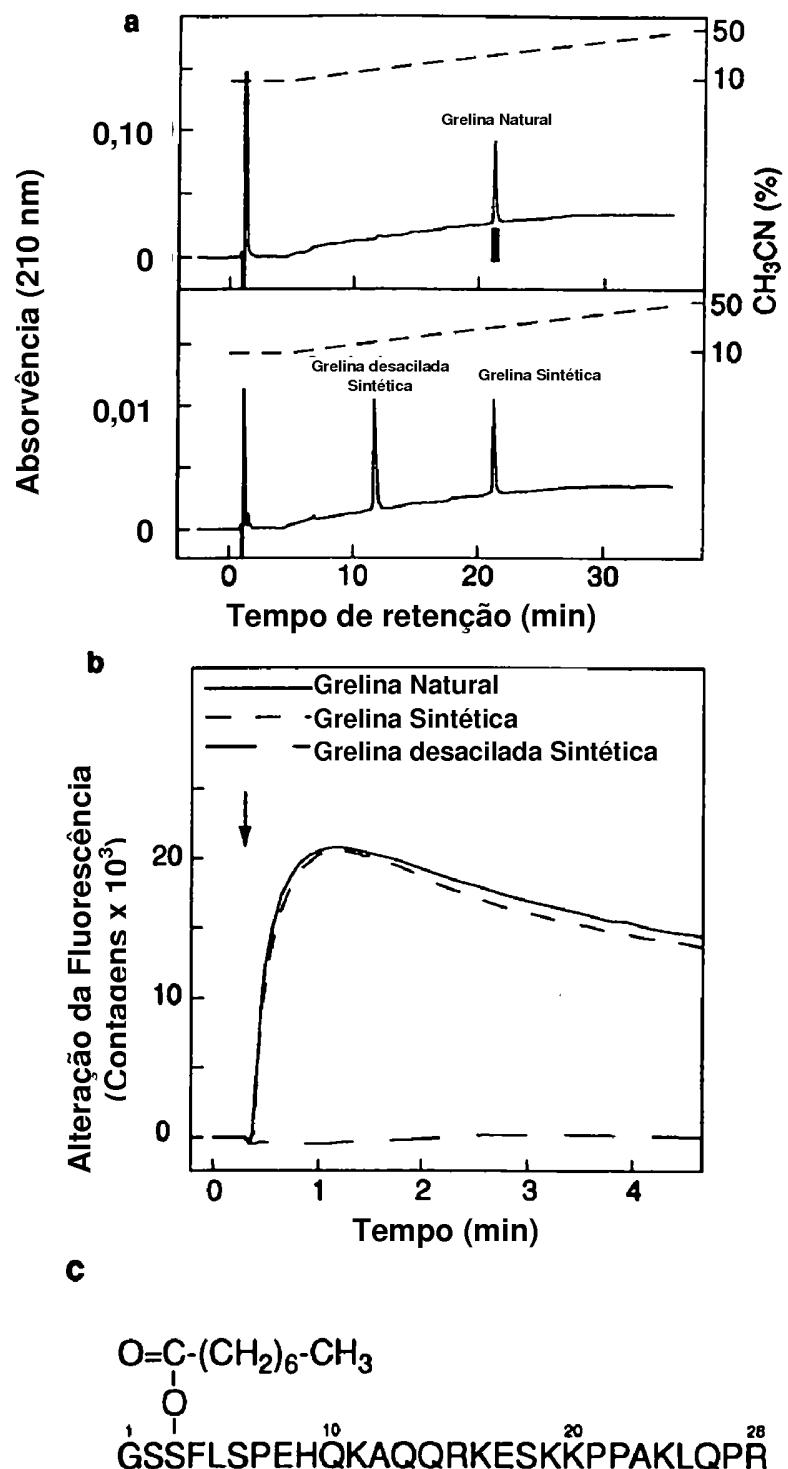
Fig. 2

Fig. 3

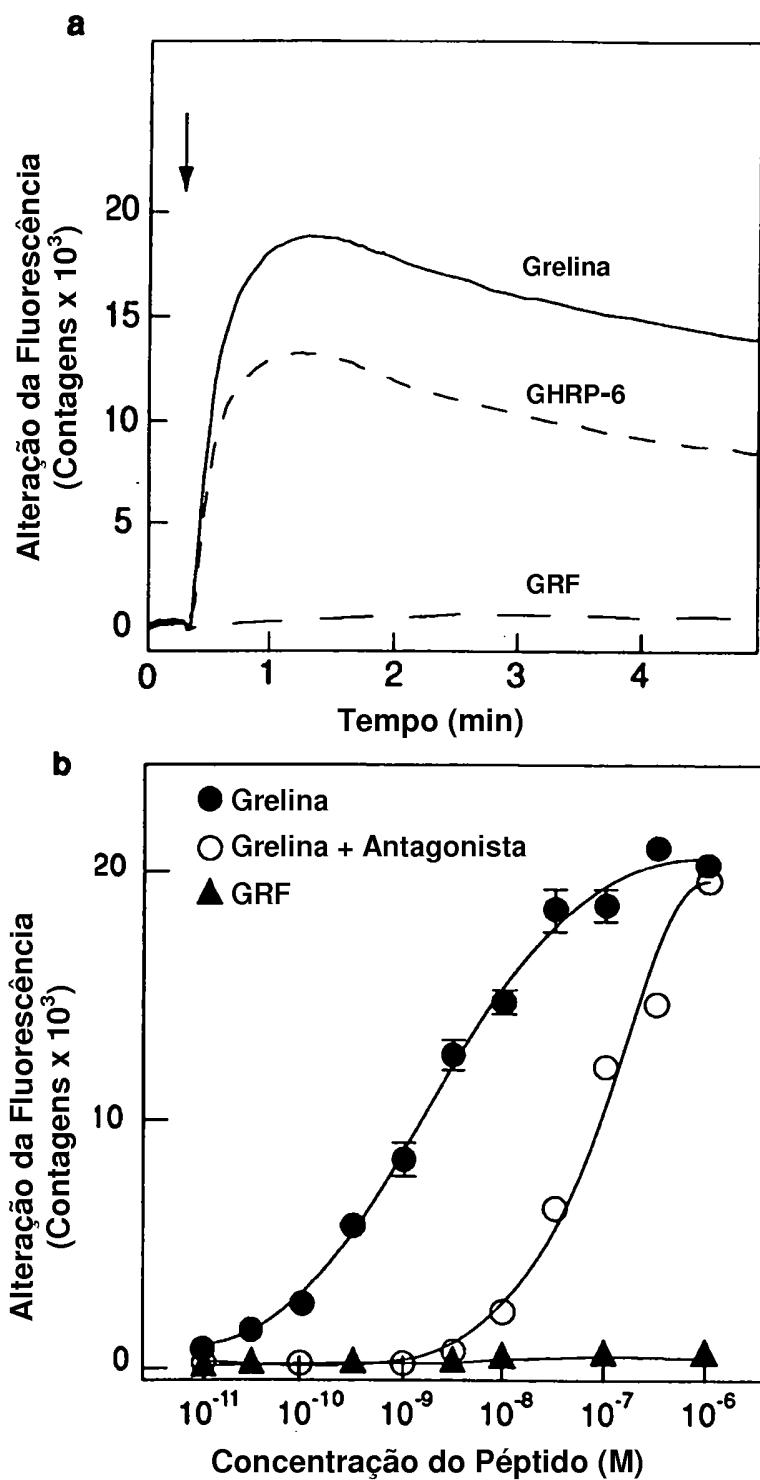


Fig. 4**a**

Humana	1	MPSPGTVC SLLL L GMLWLDLAMAGSSFLSP	30
Rato	1	MVSSATICSLLLLSMLWMDMAMAGSSFLSP	30
Humana	31	EHQRVQQRKESKKPPAKLQPRALAGWL RPE	60
Rato	31	EHQKAQQRKESKKPPAKLQPRALEGWL HPE	60
Humana	61	DGGQAEGAEDELEVRFNAPFDVGIKLSGVQ	90
Rato	61	DRGQAEEAEEELEIRFNAPFDVGIKLSGAQ	90
Humana	91	YQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK	117
Rato	91	YQQHGRALGKFLQDILWEEEVKEAPANK	117

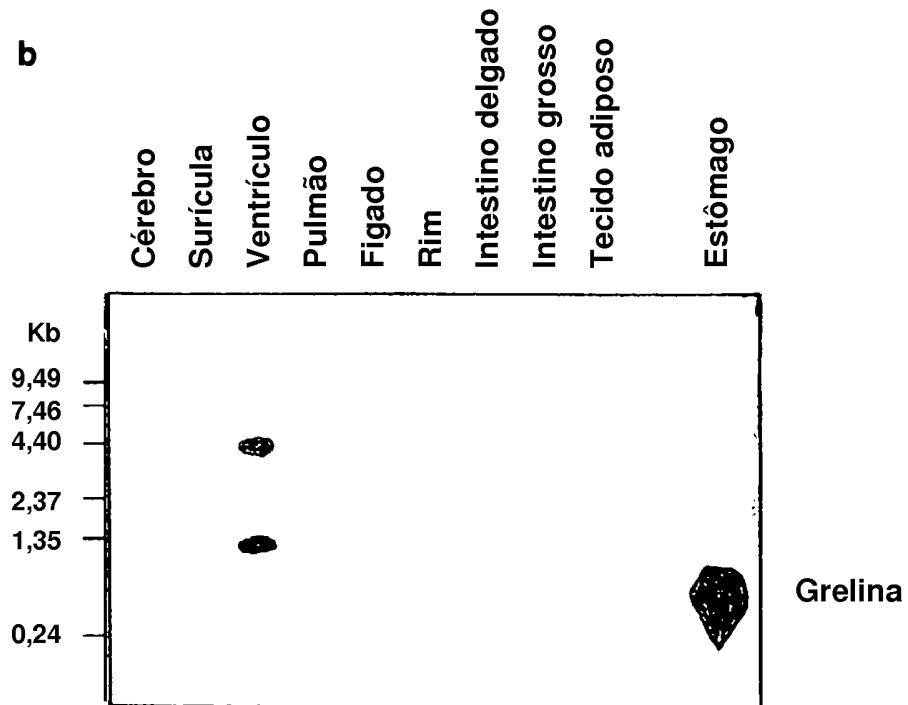
b

FIG. 5

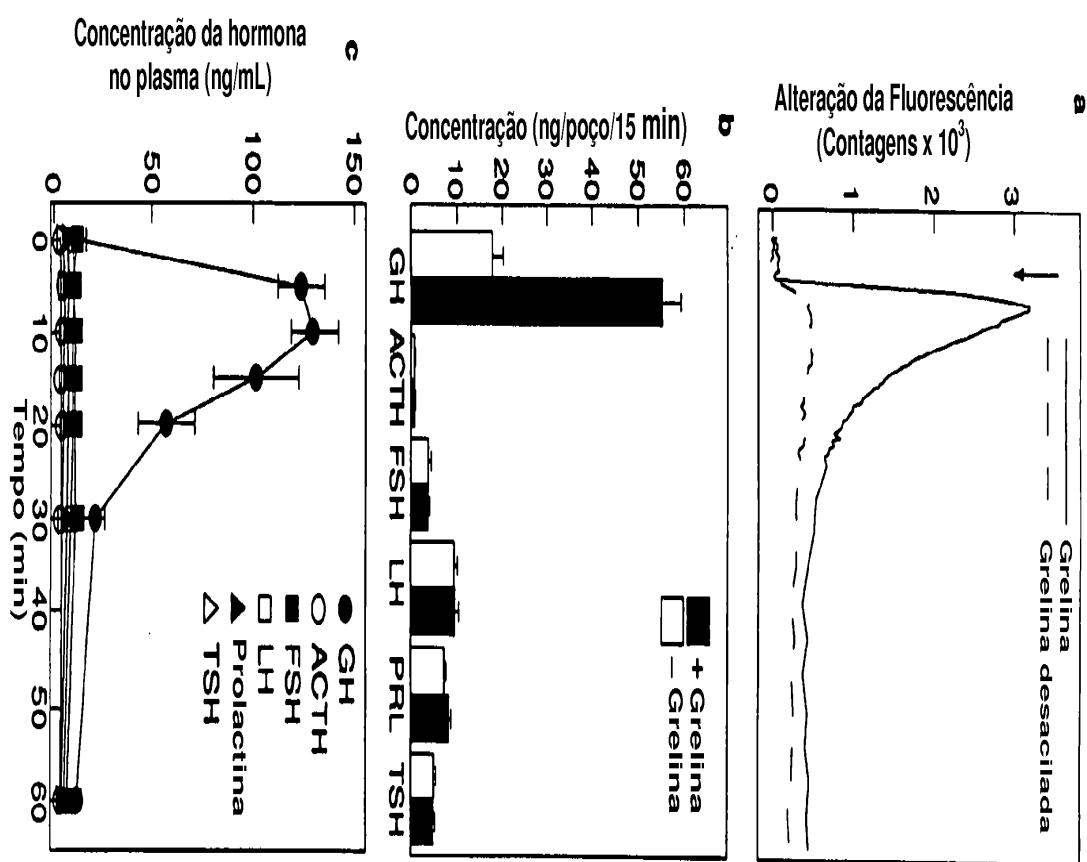


Fig. 6

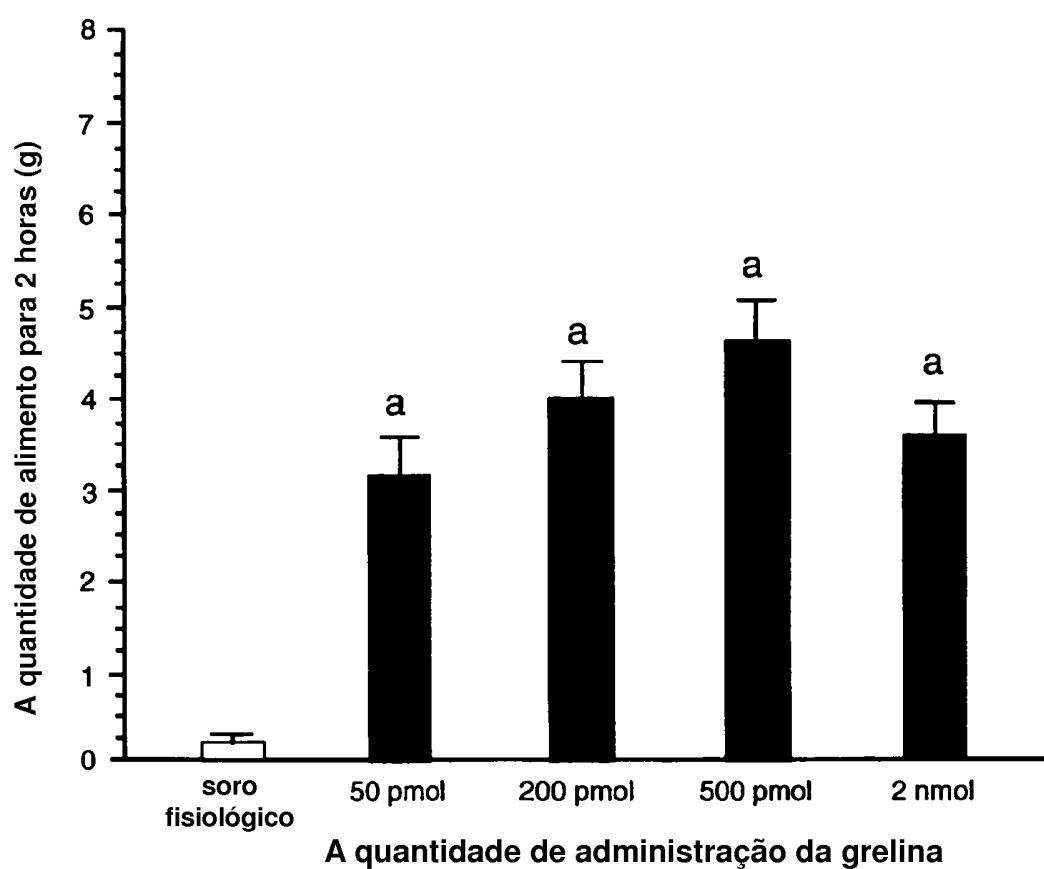


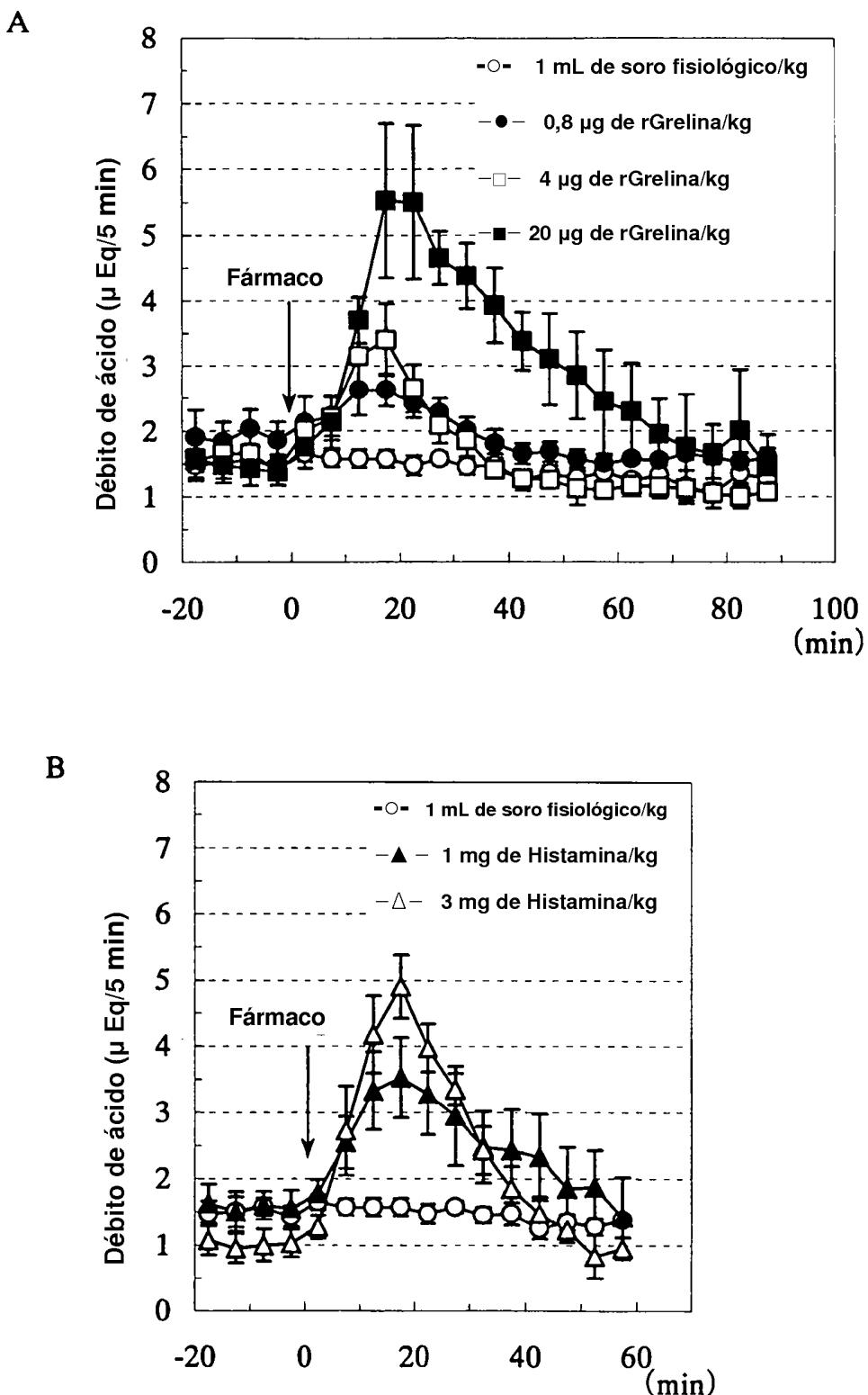
Fig. 7

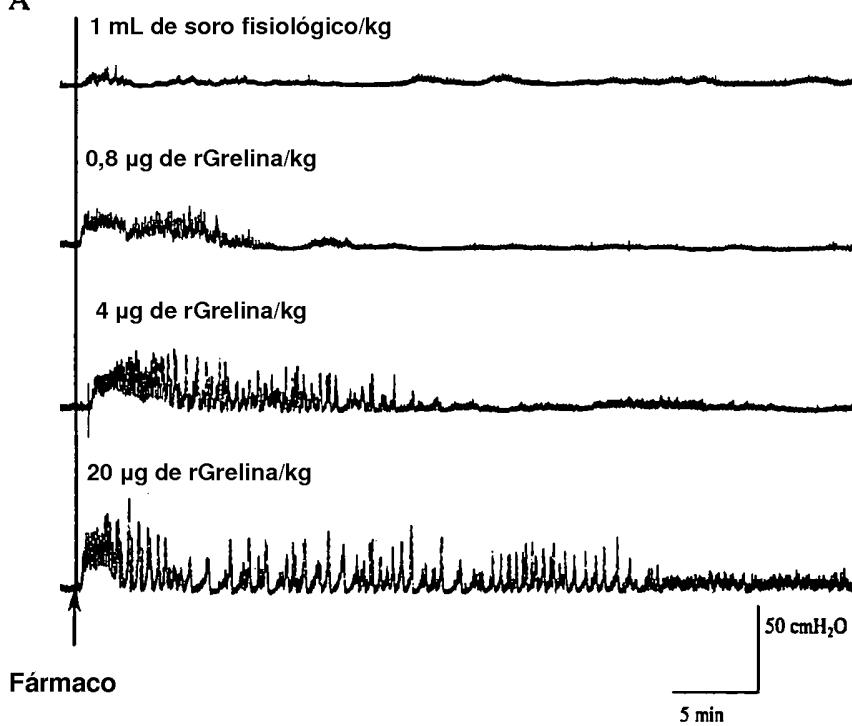
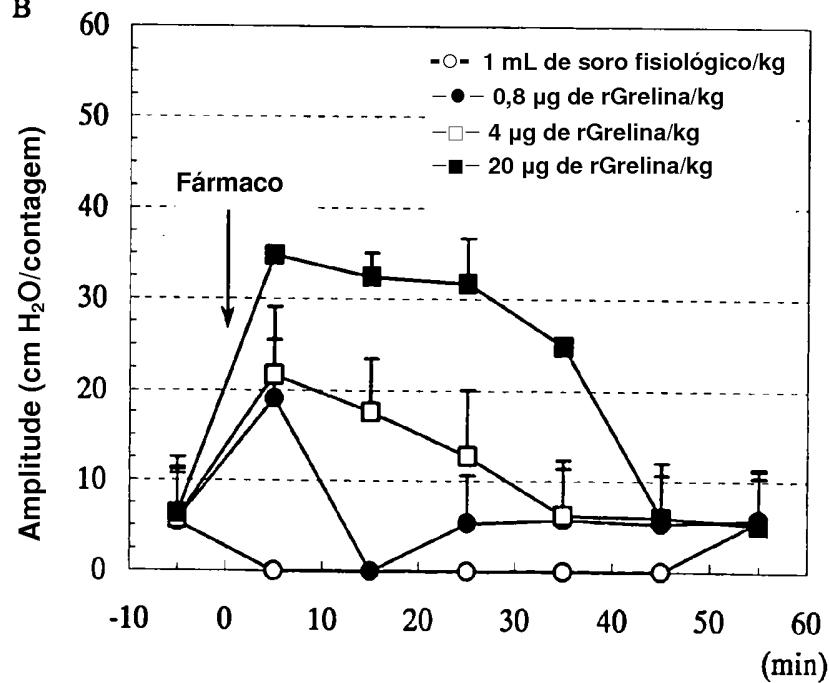
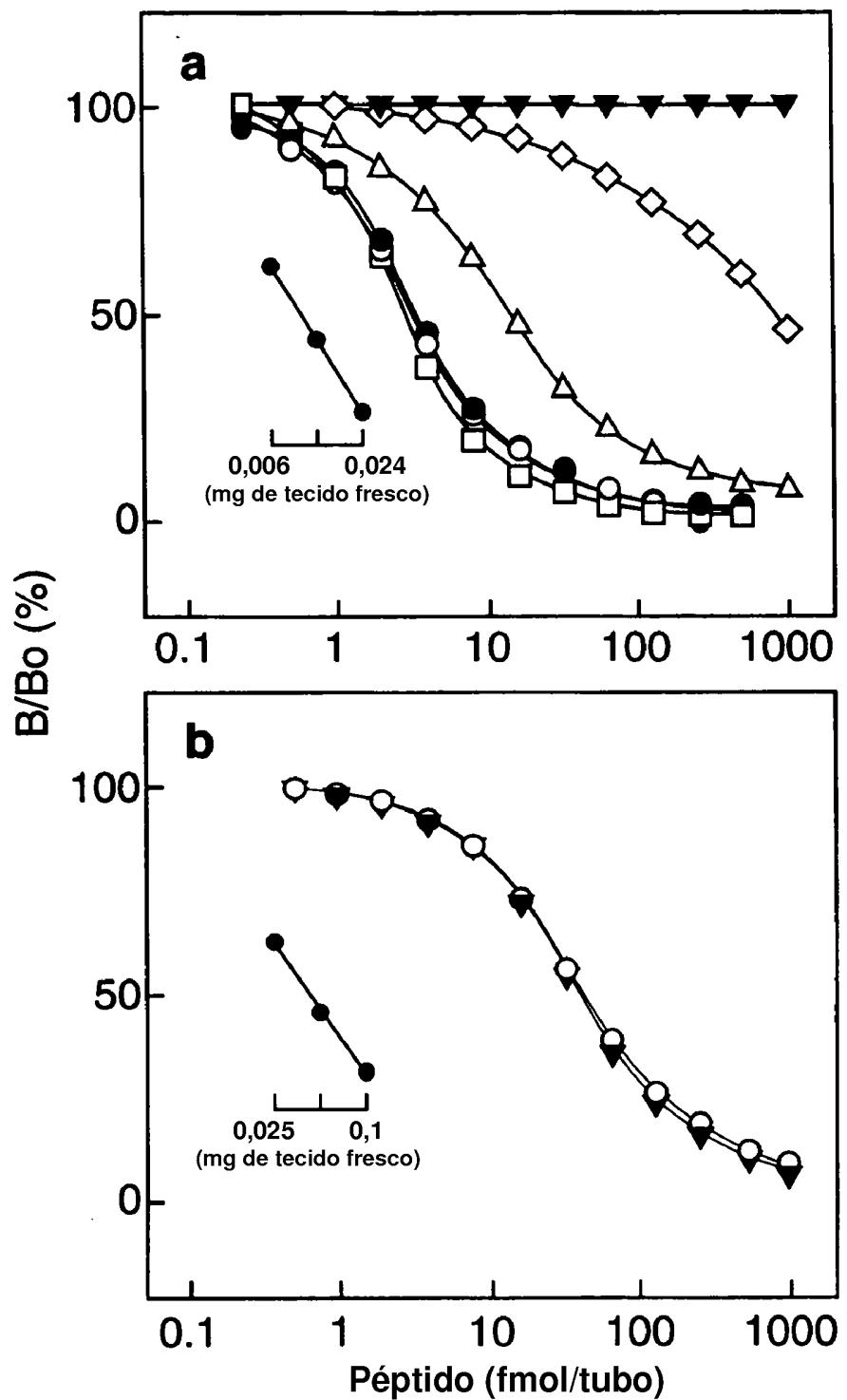
Fig. 8**A****B**

Fig. 9



RESUMO

“NOVOS PÉPTIDOS”

A presente invenção proporciona um composto novo do tipo peptídico, o qual induz a secreção da hormona do crescimento e tem a actividade de aumento da concentração intracelular de iões de cálcio, em que, pelo menos, um aminoácido é substituído por um aminoácido modificado e/ou um composto não-aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.