



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 235**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01) **C07K 14/47** (2006.01)
C07K 14/46 (2006.01) **C07K 14/465** (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01) **C07K 16/18** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) **C12P 21/02** (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) **A61P 5/06** (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01) **A61K 45/00** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07006224 .5**

96 Fecha de presentación : **24.07.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1795598**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2007**

54 Título: **Nuevos péptidos.**

30 Prioridad: **23.07.1999 JP 11-210002**
29.11.1999 JP 11-338841
26.04.2000 JP 2000-126623

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2010

73 Titular/es: **Kenji Kangawa**
4-2, Onoharahigashi 6-chome
Minoo-shi, Osaka 562-0031, JP

72 Inventor/es: **Kangawa, Kenji;**
Kojima, Masayasu;
Hosoda, Hiroshi;
Matsuo, Hisayuki y
Minamitake, Yoshiharu

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 335 235 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos péptidos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de un nuevo péptido que tiene la acción de aumentar la concentración de calcio intracelular como se define en las reivindicaciones.

10 **Técnica antecedente**

La hormona del crecimiento (abreviada en lo sucesivo como GH) es una hormona proteica sintetizada en la adenohipofisis y promueve indirectamente el crecimiento del hueso y la diferenciación de adipocitos y condrocitos, y su secreción se promueve por la hormona de liberación de la hormona del crecimiento (GHRH) y se inhibe por la somatostatina [E. J. Kendrew, *et al.*, Eds., *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 462]. La GH no solo tiene una acción promotora del crecimiento, sino que también tiene acciones tales como la promoción de la síntesis de proteínas en diversos tejidos, la estimulación de la transferencia de grasas depositadas y la elevación del contenido de glucógeno en músculos, y una reducción en la secreción de GH induce el enanismo, mientras que un exceso de la secreción de dicha hormona induce el gigantismo o la acromegalia [Iwanami's Dictionary of Biology, cuarta edición, editado por Ryuichi Yasugi, *et al.* (Iwanami Syoten, Tokyo, 1997), p. 757].

Desde que se ha producido la GH humana por ingeniería genética, la GH se usa no sólo para el tratamiento del enanismo [J. O. Jorgensen, *Endocr. Rev.* 12, 189 (1991)], sino también para el tratamiento de otras enfermedades, y se han descubierto diversos efectos [J. O. Jorgensen, *et al.*, *Horm. Res.* 42, 235 (1994)]. Por ejemplo, estos efectos incluyen la activación de la reconstitución de osteoblastos y de hueso en individuos normales [K. Brixen, *et al.*, *Miner. Res.* 5, 609 (1990)], el aumento de la fuerza muscular y la cantidad muscular en adultos con deficiencia en GH [R. C. Cuneo, *et al.*, *J. Appl. Physiol.* 70, 688 (1991)], la mejora de la motilidad en adultos con deficiencia en GH [R. C. Cuneo, *et al.*, *J. Appl. Physiol.* 70, 695 (1991)], la curación de quemaduras graves en niños [D. N. HERNON, *et al.*, *Ann. Surg.* 212, 424 (1990)], su uso combinado con gonadotropinas en la inducción de la ovulación [R. Homburg, *et al.*, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 32, 781 (1990)], la prevención del trastorno metabólico por administración de prednisona [F. F. Horber y M. W. Haymond, *J. Clin. Invest.* 86, 265 (1990)], la promoción de la "educación" de las células T en trastornos inmunes graves [W. J. Murphy, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4481 (1992)] y el efecto de la inhibición de la reducción del peso corporal de individuos de edad avanzada y el efecto de aumento de tejidos adiposos y de prevención de la atrofia dérmica [D. Rudman, *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 323, 1 (1990)].

La administración de GH recombinante es eficaz para promover el crecimiento en niños y para la normalización de defectos en el metabolismo y funciones que acompañan a la deficiencia de GH en adultos, pero existen problemas asociados con que la GH tiene efectos secundarios que restringen la dosis, no puede administrarse por vía oral y es cara [B. A. Lefker, *et al.*, en *Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice*, B. B. Bercu y R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), páginas 107-108]. Muchos pacientes adultos sufren efectos secundarios tales como artralgia y síndrome del túnel del carpo, que se considera atribuible a una acumulación de exceso de sodio y humor, de forma que la administración de GH no puede continuarse [E. Corpas, *et al.*, *Endocr. Rev.* 14, 20 (1993)]. Estos efectos secundarios se correlacionan con un modelo no fisiológico de secreción de hormona por la administración de GH, y en la administración de GH, no puede imitarse la pulsatilidad de la secreción normal de GH [B. A. Lefker, *et al.*, en *Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice*, B. B. Bercu y R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), páginas 107-108].

La pulsatilidad de la secreción de GH *in vivo* se establece básicamente por interacción entre dos factores reguladores derivados del hipotálamo; es decir, la GHRH y la somatostatina actúan sobre la glándula pituitaria regulando la secreción de GH [G. S. Tannenbaum y N. Ling, *Endocrinology* 115, 1952 (1984), R. G. Clark e I. C. Robinson, *Endocrinology* 122, 2675 (1988)]. El patrón normal de secreción de GH difiere durante el día y la noche, y durante la noche, se libera una mayor cantidad de GH con más frecuencia. La amplitud del pulso de liberación de GH se regula adicionalmente por retroalimentación por diversas hormonas esteroideas, neurotransmisores, GH y factores de crecimiento semejantes a insulina, por el estado nutricional, por el sueño y la motilidad [G. S. Strobl y M. J. Thomas, *Pharmacol. Rev.* 46, 1 (1994)].

Para solucionar los efectos secundarios producidos por la administración de GH, se sintetizó un gran número de compuestos que tenían una acción inductora de la secreción de GH, y como secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS), se estudiaron extensivamente su correlación estructura-actividad, su farmacología y sus aplicaciones clínicas. En primer lugar, se sintetizaron péptidos tales como GHRP-6 (hexapéptido de liberación de la hormona del crecimiento) y se desarrollaron como agentes terapéuticos para tratar trastornos atribuibles a una deficiencia o reducción en GH [C. Y. Bowers, *et al.*, *Endocrinology* 114, 1537-1545 (1984)]. Sin embargo, como estos compuestos peptídicos sólo pueden demostrar su efecto por medio de inyección intravenosa, se crearon compuestos no peptídicos que tenían bajo peso molecular que podían administrarse por vía oral [R. G. Smith, *et al.*, *Science* 260, 1640-1643 (1993)], y algunos de ellos han avanzado a un ensayo clínico de fase II [A. A. Patchett, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7001-7005 (1995)].

ES 2 335 235 T3

La serie de transferencia de información desde la recepción de señal de un receptor a la expresión funcional se denomina transducción de señales, y el sistema de transducción de señales acoplado con la proteína G continúa en el siguiente mecanismo [Iwanami's Dictionary of Biology, cuarta edición, por Ryuichi Yasugi, *et al.*, páginas 555-556 (Iwanami Syoten, Tokyo, 1997)]. Este sistema acoplado a la proteína G tiene un receptor con siete dominios transmembrana que se divide en un sistema de AMPc para producir AMPc como segundo mensajero y ácido inositol-1,4,5-trifosfórico (IP3) y fosfolípido de diacil glicerol (DG) inositol como sistema de transducción de información. El AMPc activa una quinasa dependiente de AMPc (quinasa A), para producir la fosforilación de restos de serina y treonina en la proteína funcional para modificar su actividad. Por otra parte, el IP3 se une al receptor de IP3 en el retículo endoplásmico para promover la liberación de iones de calcio, mientras que el DG activa la quinasa C para promover la acción de hormonas, etc.

El mecanismo de aumentar la concentración de ion calcio intracelular en el sistema de transducción de señales con IP3 o DG como segundo mensajero [J. Kendrew, *et al.*, Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p.136-137] es el siguiente: cuando un ligando se une al receptor, la fosfolipasa C se activa a través de la proteína G para convertir PIP2 en IP3. Por medio de IP3, los iones de calcio reunidos en el retículo endoplásmico (ER) como gránulos intracelulares se liberan en el citoplasma, aumentando de esta manera los niveles de iones de calcio en el citoplasma. Si en el citoplasma están presentes IP3 o iones de calcio, el calcio se incorpora de nuevo en el retículo endoplásmico reduciendo de esta manera los niveles de ion de calcio en el citoplasma. Es decir, la unión del ligando al receptor produce un aumento transitorio en los niveles de iones de calcio en el citoplasma.

Como GHS actúa sinérgicamente sobre la secreción de GH y el aumento de los niveles de AMPc intracelular por GHRH [K. Cheng, *et al.*, Endocrinology 124, 2791-2798 (1989)] y la unión de GHRH al receptor induce la producción de AMPc como segundo mensajero mientras que GHS induce un aumento en la concentración de iones de calcio intracelular, se sugirió que el mecanismo de actuación de GHS es diferente del de GHRH [J. Herrington y B. Hille, Endocrinology 135, 1100-1108 (1994).], y se supuso que la GHS se unía a un receptor diferente del receptor de GHRH. Realmente se clonó un gen para un receptor al que se une GHS, y por los resultados del análisis de Northern, se descubrió que el receptor de GHS (GHS-R) se expresa en el hipotálamo y en la glándula pituitaria cerebral, y que hay una homología de 90% o mayor entre las secuencias aminoacídicas de los receptores de GHS de origen porcino y humano [A. D. Howard, *et al.*, Science 273, 974-977 (1996)]. Sin embargo, no se ha aislado un ligando endógeno que se una a GHS-R, y este GHS-R era un receptor huérfano cuyo ligando no era evidente.

En algunos casos, ciertos ácidos grasos tales como el ácido mirístico, el ácido geránico, el ácido palmitoílico o el ácido farnesílico se unen al extremo amino de ciertas proteínas o a cadenas laterales de sus restos aminoacídicos, y el papel de estos ácidos grasos es anclar dicha proteína modificada con ácidos grasos a la membrana celular [J. Kendrew, *et al.*, Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p.616]. En dicha proteína modificada con ácidos grasos, el ácido graso se une a un resto de cisteína a través de un enlace S-acilo, y no se conoce ni un aminoácido que tenga un ácido graso unido a un resto de serina a través de un enlace O-acilo, tal como la GHS endógena descrita en la presente invención, ni ninguna proteína o péptido que contenga dicho aminoácido modificado con ácidos grasos. Tampoco se sabe que el péptido que contiene dicho aminoácido modificado con ácido graso funcione como ligando para ningún receptor.

Descripción de la invención

Antes de describir la presente invención con detalle, los términos son como se definen a continuación:

El término "péptido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. En este documento, el aminoácido (también denominado resto aminoacídico) incluye aminoácidos naturales representados por la fórmula: $\text{NH}_2\text{-CH(R')-COOH}$, donde R' es un grupo sustituyente natural, así como sus isómeros óptimos D, L, etc.

También hay un péptido en el que un cierto aminoácido natural se reemplaza por un aminoácido modificado (también denominado resto aminoacídico modificado). El aminoácido modificado incluye los aminoácidos de la fórmula anterior en la que el grupo sustituyente R' se modifica adicionalmente, sus isómeros ópticos D, L y aminoácidos no naturales donde, por ejemplo, varios grupos sustituyentes están unidos al grupo sustituyente R' de la fórmula anterior a través o no de un enlace éster, éter, tioéster, tioéter, amida, carbamida o tiocarbamida. El aminoácido modificado también incluye aminoácidos no naturales cuyos grupos amino se han reemplazado por grupos alquilo inferior.

La expresión "análogo peptídico" se refiere a un compuesto en el que al menos un aminoácido en un péptido se ha reemplazado por un compuesto no aminoacídico y, de esta manera, al menos un enlace de dicho compuesto sustituyente con el análogo peptídico no es un enlace peptídico.

Además, los compuestos derivados de estos péptidos y análogos peptídicos modificando el extremo amino y/o carboxilo de los mismos se denominan derivados. Y los péptidos, análogos peptídicos y derivados de los mismos se denominan colectivamente "compuestos de tipo péptido".

ES 2 335 235 T3

En la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 2, una secuencia aminoacídica del 1^{er} al 4^o aminoácido se denomina Gly Ser Ser Phe,

una secuencia aminoacídica del 1^{er} al 5^o aminoácido se denomina Gly Ser Ser Phe Leu,

una secuencia aminoacídica del 1^{er} al 6^o aminoácido se denomina Gly Ser Ser Phe Leu Ser,

una secuencia aminoacídica del 1^{er} al 7^o aminoácido se denomina Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro,

una secuencia aminoacídica del 1^{er} al 8^o aminoácido se denomina Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu,

una secuencia aminoacídica del 1^{er} al 9^o aminoácido se denomina Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His y

una secuencia aminoacídica del 1^{er} al 10^o aminoácido se denomina Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln.

Desde hace tiempo se desea el descubrimiento de un ligando endógeno (GHS endógeno) que se una al receptor de GHS presentando una actividad de aumento de la concentración de ion calcio intracelular o para inducir la secreción de GH junto con un método para utilizarlo. Además, desde hace tiempo también se desea un compuesto que sea un análogo estructural de dicha GHS endógena y que tenga una actividad de aumento de la concentración de ion calcio intracelular o de inducción de la secreción de GH. Además, se desea una composición farmacéutica o una composición para promover el crecimiento de animales, que comprenda dicho GHS endógeno o su análogo estructural que induce la secreción pulsátil de GH, eliminando de esta manera los efectos secundarios de la administración de GH, así como una aplicación terapéutica usando dicha composición.

Los presentes inventores centraron su atención en el hecho de que la unión del ligando al receptor de GHS (GHS-R) produce un aumento transitorio de la concentración de ion calcio intracelular con fosfolípido de inositol como segundo mensajero, e investigaron extractos de diversos órganos y tejidos usando la actividad de aumento de la concentración de ion calcio intracelular (actividad de liberación de Ca) como indicador en células CHO (CHO-GHSR62) que expresan GHS-R. Como resultado, los inventores descubrieron que los extractos de estómago de rata tienen una fuerte actividad de liberación de Ca y purificaron satisfactoriamente una sustancia con una fuerte actividad de liberación de Ca a partir de los extractos anteriores por diversos tipos de cromatografía, y descubrieron que dicha sustancia es un nuevo péptido modificado con ácido graso, que tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000. Además, confirmaron que dicho nuevo péptido promueve la secreción específica de GH desde células de la pituitaria anterior, y descubrieron que dicho nuevo péptido es un ligando endógeno para GHS-R, es decir, un secretagogo endógeno de GH (GHS endógeno). Es decir, el primer aspecto de la presente invención se refiere a un péptido inductor de la secreción de GH endógena que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular o la actividad de inducir la secreción de GH, donde cierto resto aminoacídico constituyente se ha modificado con un ácido graso, así como un método para preparar dicho péptido.

Los presentes inventores analizaron de forma precisa la estructura del péptido inductor de la secreción de GH endógena y descubrieron que dicho péptido es un péptido que consiste en la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 2, donde el grupo hidroxilo de cadena lateral de la tercera serina desde el extremo amino se ha acilado con un ácido graso. Además, también se purificó un péptido inductor de la secreción de GH de origen humano a partir de extracto de estómago humano que tenía una fuerte actividad de liberación de Ca similar a la del extracto de estómago de rata, y se analizó su estructura de la misma manera que para el péptido inductor de la secreción de GH procedente de rata, y como resultado los inventores descubrieron que el péptido inductor de la secreción de GH endógena de origen humano consiste en la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 3, donde el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la tercera serina del extremo amino se ha acilado con un ácido graso. La comparación entre las secuencias aminoacídicas de los péptidos inductores de la secreción de GH endógena procedentes de rata y humano reveló una homología de hasta 89% en conjunto.

Específicamente, los péptidos procedentes de rata y humano son idénticos en una secuencia aminoacídica del primer al décimo aminoácido desde el extremo amino y en una secuencia aminoacídica del 13^o al 28^o aminoácido desde el extremo amino, pero son diferentes en el 11^o al 12^o aminoácido que son lisina y alanina en el péptido de rata, y se reemplazan por arginina y valina en el péptido humano, respectivamente. El péptido inductor de la secreción de GH endógena procedente de rata se escindió con diversas proteasas, sus fragmentos peptídicos purificados se midieron con respecto a la actividad de liberación de Ca, y como resultado, un péptido que consistía en el primer al séptimo aminoácido desde el extremo amino era el péptido mínimo que tenía actividad de liberación de Ca.

Midiendo la actividad de liberación de Ca de péptidos sintetizados químicamente, los inventores descubrieron que la secuencia central esencial para inducir la actividad de liberación de Ca es una secuencia consistente en 4 aminoácidos indicada en la SEQ ID N°: 8. Además, la secuencia consistente en 10 aminoácidos indicada en la SEQ ID N°: 9 estaba conservada en los péptidos inductores de la secreción de GH endógena no procedentes de rata (consistiendo cada uno de 28 aminoácidos) separados de humano, porcino y bovino, así como en los péptidos inductores de la secreción de GH endógena (consistentes cada uno en 27 aminoácidos) donde una glutamina se había delecionado de los péptidos anteriores.

ES 2 335 235 T3

Es decir, se describe aquí un péptido modificado con ácido graso que comprende la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 8, preferiblemente la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 1 y más preferiblemente la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 9 como secuencia central esencial para inducir la actividad de liberación de Ca.

5

También se aislaron péptidos inductores de la secreción de GH endógena a partir de pollo, anguila y rana, y se descubrió que estos péptidos tenían una secuencia central consistente en cuatro aminoácidos indicada en la SEQ ID N°: 8.

10 Además, también se aisló a partir de rana un péptido inductor de la secreción de GH endógena muy similar al péptido inductor de la secreción de GH endógena de rata.

15 Además, también se aislaron péptidos inductores de la secreción de GH endógena a partir de *Xenopus laevis*, trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y perro. A partir de la trucha arco iris, se aislaron respectivamente grelina-23 consistente en 23 aminoácidos y grelina-20 consistente en 20 aminoácidos.

El aminoácido carboxilo-terminal de la grelina de anguila, la grelina-23 de trucha arco iris y la grelina 20 estaba amidado.

20 Como un resto aminoacídico en la tercera posición desde el extremo amino en el péptido inductor de la secreción de GH endógena de *Xenopus laevis* es treonina, también se describe aquí a un péptido modificado con ácido graso, que contiene, como secuencia central esencial para presentar la actividad de liberación de Ca, un péptido en el que el tercer resto aminoacídico serina se reemplazó por treonina en la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 8, preferiblemente la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 1 y más preferiblemente la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 9.

25 El péptido modificado con ácido graso endógeno que tiene actividad inductora de la secreción de GH, o el péptido modificado con ácido graso consistente en dicha secuencia central, descrito aquí, también proporciona una pauta para diseñar un compuesto con actividad de liberación de Ca.

30

Es decir, se obtiene un nuevo compuesto que tiene actividad de liberación de Ca sintetizando un análogo estructural de dicho péptido modificado con ácido graso confirmando la actividad de liberación de Ca del análogo estructural resultante. Por consiguiente, también se describe aquí un péptido o análogo peptídico como se define en las reivindicaciones, que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular, donde un cierto aminoácido constituyente se ha reemplazado por un compuesto aminoacídico modificado o no aminoacídico.

35

Se obtuvo un ADNc que codificaba el péptido inductor de la secreción de GH endógena de la manera habitual. Cada uno de los ADNc de rata y humano consiste en 117 aminoácidos como se muestra en las secuencias aminoacídicas de las SEQ ID N°: 4 y 5, y las secuencias aminoacídicas de los péptidos inductores de la secreción de GH endógena de rata y humano eran idénticas en una secuencia de 28 aminoácidos desde la 24ª a la 51ª posiciones desde el extremo amino, respectivamente. Es decir, se reveló que el péptido inductor de la secreción de GH endógena se sintetiza como un péptido precursor consistente en 117 aminoácidos, después se escinde un péptido señal consistente en los 23 aminoácidos amino-terminales y se escinden adicionalmente 56 aminoácidos carboxilo-terminales, con lo que se forma el péptido modificado con ácido graso que tiene actividad inductora de la secreción de GH. Además, también se encontró en cerdo un ADNc que codificaba un precursor del péptido inductor de la secreción de GH endógena consistente en 28 aminoácidos.

45

Además, se encontró en cerdo un ADNc que codificaba un precursor para el péptido inductor de la secreción de GH endógena consistente en 27 aminoácidos.

50

Además, se encontró en cerdo un ADNc parcial codificante de un precursor para el péptido inductor de la secreción de GH endógena consistente en 27 aminoácidos.

55

Además, también se encontró en anguila, *Xenopus laevis* y trucha arco iris un ADNc codificante de un precursor del péptido inductor de la secreción de GH endógena. A partir de trucha arco iris, se aislaron respectivamente un ADNc codificante de un precursor de grelina-23 consistente en 23 aminoácidos y un ADNc codificante de un precursor de grelina-20 de 20 aminoácidos.

60 Por consiguiente, se describe aquí además un ADNc que codifica un precursor del péptido inductor de la secreción de GH endógena así como un método para producir un péptido como material de partida del péptido modificado con ácido graso o análogo peptídico que tiene actividad de liberación de Ca, que comprende el uso de dicho ADNc.

65 En la purificación del péptido inductor de la secreción de GH endógena (grelina) compuesto de 28 aminoácidos de extracto de estómago de rata, se analizó un péptido recuperado como una fracción minoritaria y, como resultado, se encontró un péptido consistente en 27 aminoácidos (grelina-27), que es un péptido de grelina a partir del cual se han delecionado la 13ª o 14ª glutamina. La grelina 27 tiene completamente la misma actividad de liberación de Ca y actividad inductora de la secreción de GH que la grelina consistente en 28 aminoácidos, y la grelina-27 es un péptido

ES 2 335 235 T3

inductor de la secreción de GH endógena y, por lo tanto, la grelina-27 también se incluye dentro del alcance de la presente invención.

5 La secuencia de nucleótidos que codifica la 13ª y 14ª glutaminas de la grelina es gca gca, que es una secuencia de exón terminal que se someterá a corte y empalme de ARNm, lo que sugiere la posibilidad de formación de un ADNc a partir del cual se delecionó uno de los dos codones codificantes de restos de glutamina por diferentes cortes y empalmes. Realmente, se encontró un ADNc que codificaba un péptido precursor de grelina-27 consistente en 27 aminoácidos en la selección de bibliotecas de ADNc de rata y humano.

10 Es decir, se reveló que el péptido de la grelina-27 humana se sintetiza como un péptido precursor consistente en 116 aminoácidos indicados en la SEQ ID N°: 12 ó 13, posteriormente se escinde un péptido señal consistente en 23 aminoácidos amino-terminales y también se escinden adicionalmente 56 aminoácidos carboxilo-terminales, con lo que se forma un péptido modificado con ácido graso consistente en 27 aminoácidos que tiene una actividad inductora de la secreción de GH (grelina-27).

15 Además, se encontró un ADNc codificante de un precursor del péptido de la grelina-27 en cerdo y oveja, y se confirmó la presencia de grelina-27 y su precursor en estos animales.

20 Es decir, también se describe aquí el péptido de la grelina-27 consistente en una secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 10, 11, 17 y 22, un péptido precursor de grelina-27 que tiene una secuencia aminoacídica indicada en las SEQ ID N°: 12, 13, 19 y 23 y un ADNc que codifica dicho péptido precursor que comprende una secuencia de nucleótidos indicada en las SEQ ID N°: 14, 15, 21 y 24.

25 El péptido modificado con ácido graso que tiene actividad de liberación de Ca y el compuesto de tipo péptido, tal como el análogo peptídico que tiene actividad de liberación de Ca como se describen aquí, también proporcionan una composición farmacéutica para tratar enfermedades atribuibles a un defecto o reducción en el nivel de GH. Dicha composición farmacéutica puede usarse para tratar cualquier enfermedad contra la cual es eficaz la administración de GH, y pueden evitarse diversos efectos secundarios producidos por la administración de GH. Además, dicha composición farmacéutica también puede usarse como fármaco animal, tal como agente promotor del crecimiento para animales.

30 Como el compuesto de tipo péptido descrito aquí tiene una acción promotora del apetito por medio de la administración al ventrículo y por medio de la administración intravenosa, puede usarse como agente promotor del apetito para tratar la pérdida de apetito o sitofobia. Además, el presente compuesto de tipo péptido tiene acción promotora de la motilidad del estómago y acción promotora de la secreción de ácido gástrico y, de esta manera, también puede usarse como agente para tratar enfermedades funcionales del estómago tales como indigestión no asociada con úlceras, atonía del estómago ligera súbita, indigestión funcional y esofagitis de reflujo. Además, el presente compuesto de tipo péptido presenta una acción promotora del crecimiento celular en médula ósea, duodeno y yeyuno por medio de la administración intravenosa, y por lo tanto puede usarse como agente para proteger la membrana mucosa del tracto intestinal, como un agente para prevenir daños en la membrana mucosa del intestino delgado durante la nutrición intravenosa y como un agente para tratar la osteoporosis.

35 Además, se describe aquí un anticuerpo preparado usando el péptido modificado con ácido graso que tiene actividad de liberación de Ca descrito aquí como antígeno, un método para medir el péptido inductor de la secreción de GH endógena por medio del uso de dicho anticuerpo, y un kit de medición que comprende dicho anticuerpo.

45 Además, se describe aquí un método de ensayo para separar y cuantificar grelina modificada con un ácido graso y grelina a partir de la cual se eliminó el ácido graso, que comprende usar dos anticuerpos contruidos contra péptidos N- y carboxilo-terminales de grelina, siendo el primer anticuerpo capaz de reconocer la tercera serina modificada con ácido graso, así como un kit de ensayo que comprende una combinación de los anticuerpos contra los péptidos N- y carboxilo-terminales de grelina.

50 Es decir, se describe aquí una nueva hormona peptídica que tiene un nuevo aminoácido modificado, es decir, serina acilada, y también proporciona una pauta para el nuevo diseño de un compuesto con actividad de liberación de Ca con la estructura de dicho péptido como esqueleto fundamental.

55 Además, se sugiere que el esclarecimiento del mecanismo de inducción de la secreción de GH por el péptido modificado con ácido graso descrito en la presente invención o por la hormona de liberación de GH y somatostatina se puede extender no sólo al mecanismo de inducción de la secreción de GH, sino también al mecanismo de regulación de la secreción de otras hormonas. La presente invención describe diversas funciones del péptido modificado con ácido graso como factor regulador en el sistema circulatorio y el sistema metabólico, y el efecto de la presente invención se extiende al esclarecimiento de un nuevo mecanismo regulador biológico.

60 Específicamente, se describe aquí:

65 (1) Un compuesto de tipo péptido, donde en un péptido que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular, al menos un aminoácido está reemplazado por un aminoácido modificado y/o un compuesto no aminoacídico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

ES 2 335 235 T3

(2) El compuesto de tipo péptido según el punto (1), que comprende (a) una secuencia aminoacídica representada en SEQ ID NO: 2 o (b) una secuencia aminoacídica que tiene una cualquiera de las secuencias aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en

- 5 (1) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 4,
 (2) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 5,
 (3) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 6,
10 (4) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 7,
 (5) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 8,
15 (6) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 9, y
 (7) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 10,

20 a partir del extremo amino en la secuencia (a) y al menos un aminoácido delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte fuera de dichas secuencias aminoacídicas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(3) El compuesto de tipo péptido según el punto (2) anterior, que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias aminoacídicas representadas por SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 25 13, 16, 17, 18, 19, 22 y 23, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(4) El compuesto de tipo péptido según el punto (2) anterior, que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias aminoacídicas representadas por SEQ ID NOS: 25, 26, 29, 30, 31, 32, 30 34 y 35, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(5) Un compuesto de tipo péptido, en el que en un péptido que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular y la actividad de inducir secreción de la hormona de crecimiento, (a) los aminoácidos constituyentes están modificados o no modificados y (b) al menos un aminoácido está reemplazado o no reemplazado por un compuesto no aminoacídico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

35 (6) El compuesto de tipo péptido según el punto (1) o (5), que comprende secuencias aminoacídicas representadas en SEQ ID NOS: 27, 28 y 33, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40 (7) El compuesto de tipo péptido según el punto (5), que comprende (a) una secuencia aminoacídica representada en SEQ ID NO: 2 o (b) una secuencia aminoacídica que tiene una cualquiera de las secuencias aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en

- 45 (1) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 4,
 (2) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 5,
 (3) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 6,
50 (4) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 7,
 (5) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 8,
 (6) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 9, y
55 (7) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 10,

60 a partir del extremo amino en la secuencia (a) y al menos un aminoácido delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte fuera de dichas secuencias aminoacídicas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(8) El compuesto de tipo péptido según el punto (7) anterior, que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias aminoacídicas representadas por SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 y 23, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

65 (9) El compuesto de tipo péptido según el punto (7) anterior, que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias aminoacídicas representadas por SEQ ID NOS: 25, 26, 29, 30, 31, 32, 34 y 35, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

ES 2 335 235 T3

(10) El compuesto de tipo péptido según el punto (1) o (5) anterior, cuyos aminoácidos 1 a 4 en el extremo amino se representan por la fórmula:



5

donde el símbolo A es o bien un aminoácido o bien un compuesto no aminoacídico, o no existe, y el símbolo B es o bien un aminoácido o bien un compuesto no aminoacídico, o no existe, siempre que la longitud de la cadena molecular de A + B sea una longitud dipeptídica y el símbolo C o el símbolo D pueden ser iguales o diferentes y cada uno representa (a) un aminoácido modificado, (b), un aminoácido que tiene un resto hidrófobo, o (c) un aminoácido que tiene una cadena lateral básica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

10

(11) El compuesto de tipo péptido según el punto (10), donde el símbolo C es un aminoácido modificado en el que (a) se ha introducido una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α respecto del aminoácido vía o no vía un grupo alquileo que contiene uno o más átomos de carbono y vía un enlace éster, éter, tioéter, amida o disulfuro, o (b) se ha introducido una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α respecto del aminoácido, y el símbolo D es un aminoácido que tiene un resto hidrófobo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

15

20

(12) Un compuesto de tipo péptido, donde en una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias aminoacídicas representadas en SEQ ID NOS: 2, 3, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31, una secuencia aminoacídica de 1 a 4 aminoácidos en el extremo amino está sustituida por la estructura del compuesto de tipo péptido descrita en el punto (10) u (11), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

25

(13) El compuesto de tipo péptido según el punto (1), (2), (3), (5), (7) u (8) anterior, donde el aminoácido modificado es un aminoácido en la 3ª posición a partir del extremo amino o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

30

(14) El compuesto de tipo péptido según el punto (13), donde el aminoácido en el aminoácido modificado es serina o cisteína, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

35

(15) El compuesto de tipo péptido según el punto (1), (2), (3), (5), (7) u (8) anterior, que comprende un aminoácido modificado en el que (a) se ha introducido una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α respecto del aminoácido vía o no vía un grupo alquileo que contiene uno o más átomos de carbono y vía un enlace éster, éter, tioéter, amida o disulfuro, o (b) se ha introducido H o una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α respecto del aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40

(16) El compuesto de tipo péptido según el punto (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10) o (12) anterior, en el que el aminoácido modificado es un aminoácido en el que (a) se ha introducido una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α vía o no vía un grupo alquileo que contiene uno o más átomos de carbono y vía un enlace éster, éter, tioéter, amida o disulfuro, o (b) se ha introducido una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

45

(17) El compuesto de tipo péptido según el punto (1), (2), (3), (5), (7) u (8) anterior, que comprende un aminoácido modificado que está modificado con un enlace éster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

50

(18) El compuesto de tipo péptido según el punto (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10) o (12) anterior, que comprende un aminoácido modificado que se ha modificado por conversión de un grupo funcional en una cadena lateral de dicho aminoácido en un enlace éster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

55

(19) El compuesto de tipo péptido según el punto (17) anterior, que comprende un aminoácido que tiene un ácido graso unido vía un enlace éster a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de dicho aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

60

(20) El compuesto de tipo péptido según el punto (18) anterior, que comprende un aminoácido que tiene un ácido graso unido vía un enlace éster a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de dicho aminoácido o vía un enlace tioéster a un grupo mercapto de la cadena lateral de dicho aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

65

(21) El compuesto de tipo péptido según el punto (19) anterior, que comprende un aminoácido al que está unido un ácido graso que contiene 2 a 35 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(22) El compuesto de tipo péptido según el punto (20) anterior, donde el ácido graso contiene 2 a 35 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

ES 2 335 235 T3

(23) El compuesto de tipo péptido según el punto (21) anterior, que comprende un aminoácido al que está unido un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácidos grasos que contienen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5 (24) El compuesto de tipo péptido según el punto (22) anterior, donde el ácido graso es un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácidos grasos que contienen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

10 (25) El compuesto de tipo péptido según el punto (23) anterior, donde el ácido graso unido es ácido octanoico, un ácido graso monoénico del mismo o un ácido graso poliénico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

15 (26) El compuesto de tipo péptido según el punto (24) anterior, donde el ácido graso unido es ácido octanoico, un ácido graso monoénico del mismo o un ácido graso poliénico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20 (27) El compuesto de tipo péptido según el punto (23) anterior, donde el ácido graso unido es ácido decanoico, un ácido graso monoénico del mismo o un ácido graso poliénico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(28) El compuesto de tipo péptido según el punto (24) anterior, donde el ácido graso unido es ácido decanoico, un ácido graso monoénico del mismo o un ácido graso poliénico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

25 (29) Un compuesto de tipo péptido, que comprende un aminoácido básico unido al extremo carboxi de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (28) anteriores;

30 (30) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1), (2), (3), (5), (7), (8), (13), (14), (15), (17), (19), (21), (23), (25) y (27) anteriores, donde el extremo amino está modificado con un grupo alquilo o acilo saturado o insaturado que contiene uno o más átomos de carbono, y/o un grupo hidroxilo del grupo carboxilo del extremo carboxi terminal es OZ o NR₂R₃ donde Z es un catión farmacéuticamente aceptable o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado, y R₂ y R₃ son iguales o diferentes y representan H o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado;

35 (31) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10), (11), (12), (16), (18), (20), (22), (24), (26), (28) y (29) anteriores, donde el grupo amino del extremo amino se ha modificado por introducción de un grupo alquilo o acilo saturado o insaturado que contiene uno o más átomos de carbono, y/o un grupo hidroxilo del grupo carboxilo del extremo carboxi terminal es OZ o NR₂R₃ donde Z es un catión farmacéuticamente aceptable o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado, y R₂ y R₃ son iguales o diferentes y representan H o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado;

40 (32) Un compuesto de tipo péptido que comprende un grupo básico introducido en un derivado amida en el extremo carboxi terminal de un compuesto de tipo péptido descrito en el punto (30) o (31) anterior;

45 (33) Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

(34) Una composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída de la hormona de crecimiento, que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

50 (35) Una composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende un agente para tratar enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento y un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

55 (36) Una composición farmacéutica según los puntos (33) a (35) anteriores, que se aplica a animales distintos de seres humanos;

60 (37) Un método para el tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

65 (38) Un método para el tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende administrar un agente para tratar enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento y un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(39) El método de tratamiento según los puntos (37) o (38), que se aplica a animales distintos de seres humanos;

ES 2 335 235 T3

- (40) Un ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores, que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en la secuencia de aminoácidos codificados por dicho ADN;
- 5 (41) El ADN según el punto (40) anterior, donde la secuencia nucleotídica es una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias nucleotídicas representadas en SEQ ID NOS: 6, 7, 14, 15, 20, 21, 24, 36, 38 y 39;
- 10 (42) El ADN según el punto (40) anterior, donde la secuencia nucleotídica es una secuencia nucleotídica que codifica aminoácidos en una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo de secuencias nucleotídicas representadas en SEQ ID NOS: 6, 7, 14, 15, 20, 21, 24, 36, 38 y 39;
- (43) Un vector que comprende un ADN descrito en los puntos (40) a (42) anteriores;
- 15 (44) Células que comprenden el vector descrito en el punto (43) anterior;
- (45) Células que comprenden un ADN descrito en los puntos (40) a (42) anteriores, donde se puede producir un compuesto de tipo péptido que tiene una secuencia aminoacídica codificada por dicho ADN, como compuesto de tipo péptido que tiene al menos un aminoácido modificado en dicha secuencia aminoacídica;
- 20 (46) Un anticuerpo contra un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores;
- (47) Un método para determinar mediante ensayo un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores, que comprende usar el anticuerpo descrito en el punto (46) anterior para detectar el compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores;
- 25 (48) Un kit para detectar un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores, que comprende usar el anticuerpo descrito en el punto (46) anterior para detectar el compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores;
- 30 (49) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores por la tecnología de recombinación de genes, que comprende transformar un vector que contiene un ADN descrito en los puntos (40) a (42) anteriores en células hospedadoras capaces de modificar una cadena lateral de al menos un aminoácido en dicho péptido, después cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto de tipo péptido deseado del cultivo;
- 35 (50) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores por la tecnología de recombinación de genes, que comprende transformar un vector que contiene un ADN descrito en los puntos (40) a (42) anteriores en células, después cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto de tipo péptido deseado del cultivo, y a continuación modificar químicamente un aminoácido arbitrario del mismo;
- 40 (51) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (19) a (28) anteriores por la tecnología de recombinación de genes, que comprende usar células que tienen la actividad de unirse a un ácido graso vía un enlace éster a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de un aminoácido o vía un enlace tioéster a un grupo mercapto de la cadena lateral de un aminoácido en el compuesto de tipo péptido;
- 45 (52) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (19) a (28) anteriores, que comprende usar células que tienen la actividad de acilación de serina mediante unión a un ácido graso vía un enlace éster con un grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina en la secuencia aminoacídica expresada en SEQ ID NO: 8;
- 50 (53) Un procedimiento para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (19) a (28) anteriores, que comprende usar células que tienen la actividad de acilación mediante unión a un ácido graso vía un enlace éster con un grupo hidroxilo de la cadena lateral de treonina en la secuencia aminoacídica expresada en SEQ ID NO: 28.
- 55 (54) Una composición farmacéutica para terapia génica destinada al tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia aminoacídica de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores en células en un organismo vivo y expresar un péptido con al menos un aminoácido modificado, teniendo el péptido la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular;
- 60 (55) Un método para tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores en células que tienen un organismo vivo que permite que un péptido que tiene una secuencia aminoacídica codificada por dicho ADN sea producido como un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia aminoacídica, con lo que se expresa un péptido que tiene la actividad de inducir la hormona de crecimiento;
- 65

ES 2 335 235 T3

(56) Una composición farmacéutica para terapia génica destinada al tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia aminoacídica de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores en células en un organismo vivo y expresar un péptido con al menos un aminoácido modificado, teniendo el péptido la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular;

(57) Un método para tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (32) anteriores en células que tienen un organismo vivo que permite que un péptido que tiene una secuencia aminoacídica codificada por dicho ADN sea producido como un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia aminoacídica, con lo que se expresa un péptido que tiene la actividad de inducir la hormona de crecimiento.

Específicamente, aquí se describe:

(1) Un compuesto de tipo péptido, donde en un péptido que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular, al menos un aminoácido está reemplazado por un aminoácido modificado y/o un compuesto no aminoacídico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(2) El compuesto de tipo péptido según el punto (1), que comprende (a) una secuencia aminoacídica representada en SEQ ID NO: 2 o (b) una secuencia aminoacídica que tiene una cualquiera de las secuencias aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en

- (1) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 4,
- (2) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 5,
- (3) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 6,
- (4) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 7,
- (5) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 8,
- (6) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 9, y
- (7) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 10,

a partir del extremo amino en la secuencia (a) y al menos un aminoácido delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte fuera de dichas secuencias aminoacídicas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(3) El compuesto de tipo péptido según el punto (2) anterior, que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias aminoacídicas representadas por SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 y 23, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(4) Un compuesto de tipo péptido, en el que en un péptido que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular y la actividad de inducir secreción de la hormona de crecimiento, (a) los aminoácidos constituyentes están modificados o no modificados y (b) al menos un aminoácido está reemplazado o no reemplazado por un compuesto no aminoacídico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(5) El compuesto de tipo péptido según el punto (1) o (4), que comprende una secuencia aminoacídica representada en SEQ ID NO: 27, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(6) El compuesto de tipo péptido según el punto (4), que comprende (a) una secuencia aminoacídica representada en SEQ ID NO: 2 o (b) una secuencia aminoacídica que tiene una cualquiera de las secuencias aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en

- (1) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 4,
- (2) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 5,
- (3) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 6,
- (4) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 7,
- (5) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 8,
- (6) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 9, y

ES 2 335 235 T3

(7) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 10,

a partir del extremo amino en la secuencia (a) y al menos un aminoácido delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte fuera de dichas secuencias aminoacídicas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5

(7) El compuesto de tipo péptido según el punto (6) anterior, que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias aminoacídicas representadas por SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 25 y 26, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

10 (8) El compuesto de tipo péptido según el punto (1) o (4) anterior, cuyos aminoácidos 1 a 4 en el extremo amino se representan por la fórmula:



15

donde el símbolo A es o bien un aminoácido o bien un compuesto no aminoacídico, o no existe, y el símbolo B es o bien un aminoácido o bien un compuesto no aminoacídico, o no existe, siempre que la longitud de la cadena molecular de A + B sea una longitud dipeptídica y el símbolo C o el símbolo D pueden ser iguales o diferentes y cada uno representa (a) un aminoácido modificado, (b), un aminoácido que tiene un resto hidrófobo, o (c) un aminoácido que tiene una cadena lateral básica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20

(9) Un compuesto de tipo péptido, donde en una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias aminoacídicas representadas en SEQ ID NOS: 2, 3, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25 y 26, una secuencia aminoacídica de 1 a 4 aminoácidos en el extremo amino está sustituida por la estructura del compuesto de tipo péptido descrita en el punto (8) anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

25

(10) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1) a (9) anteriores, en el que el aminoácido modificado es un aminoácido en el que (a) se ha introducido una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α vía o no vía un grupo alquileo que contiene uno o más átomos de carbono y vía un enlace éster, éter, tioéter, amida o disulfuro, o (b) se ha introducido una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

30

(11) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1) a (9) anteriores, que comprende un aminoácido modificado que se ha modificado por conversión de un grupo funcional en una cadena lateral de dicho aminoácido en un enlace éster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

35

(12) El compuesto de tipo péptido según el punto (11) anterior, que comprende un aminoácido que tiene un ácido graso unido vía un grupo éster a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de dicho aminoácido o grupo mercapto de la cadena lateral de dicho aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40

(13) El compuesto de tipo péptido según el punto (12) anterior, donde el ácido graso contiene 2 a 35 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

45

(14) El compuesto de tipo péptido según el punto (12) anterior, donde el ácido graso es un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácidos grasos que contienen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

50

(15) El compuesto de tipo péptido según el punto (12) anterior, donde el ácido graso es ácido octanoico, un ácido graso monoéxico del mismo o un ácido graso poliéxico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(16) El compuesto de tipo péptido según el punto (12) anterior, donde el ácido graso es ácido octanoico, un ácido graso monoéxico del mismo o un ácido graso poliéxico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

55

(17) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1) a (16) anteriores, donde el grupo amino del extremo amino se ha modificado por introducción de un grupo alquilo o acilo saturado o insaturado que contiene uno o más átomos de carbono, y/o un grupo hidroxilo del grupo carboxilo del extremo carboxi terminal es OZ o NR2R3 donde Z es un catión farmacéuticamente aceptable o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado, y R2 y R3 son iguales o diferentes y representan H o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado;

60

(18) Un compuesto de tipo péptido que comprende un aminoácido básico unido al extremo carboxi terminal de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores;

65

(19) Un compuesto de tipo péptido que comprende un grupo básico introducido en un derivado amida en el extremo carboxi terminal de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) o (18) anteriores;

(20) Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

ES 2 335 235 T3

(21) Una composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída de la hormona de crecimiento, que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

5 (22) Una composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende un agente para tratar enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento y un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

10 (23) Una composición farmacéutica según los puntos (20) a (22) anteriores, que se aplica a animales distintos de seres humanos;

(24) Un método para el tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

15 (25) Un método para el tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende administrar un agente para tratar enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento y un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(26) El método de tratamiento según los puntos (24) o (25), que se aplica a animales distintos de seres humanos;

25 (27) Un ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores, que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en la secuencia de aminoácidos codificados por dicho ADN;

30 (28) El ADN según el punto (27) anterior, donde la secuencia nucleotídica es una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias nucleotídicas representadas en SEQ ID NOS: 6, 7, 14, 15, 20, 21 y 24;

35 (29) El ADN según el punto (27) anterior, donde la secuencia nucleotídica es una secuencia nucleotídica que codifica aminoácidos en una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo de secuencias nucleotídicas representadas en SEQ ID NOS: 6, 7, 14, 15, 20, 21 y 24;

(30) Un vector que comprende un ADN descrito en los puntos (27) a (29) anteriores;

40 (31) Células que comprenden el vector descrito en el punto (30) anterior;

(32) Células que comprenden un ADN descrito en los puntos (27) a (29) anteriores, donde se puede producir un compuesto de tipo péptido que tiene una secuencia aminoacídica codificada por dicho ADN, como compuesto de tipo péptido que tiene al menos un aminoácido modificado en dicha secuencia aminoacídica;

45 (33) Un anticuerpo contra un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores;

(34) Un método para determinar mediante ensayo un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores, que comprende usar el anticuerpo descrito en el punto (33) anterior para detectar el compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores;

50 (35) Un kit para detectar un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores, que comprende usar el anticuerpo descrito en el punto (33) anterior para detectar el compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores;

55 (36) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores por la tecnología de recombinación de genes, que comprende transformar un vector que contiene un ADN descrito en los puntos (27) a (29) anteriores en células hospedadoras capaces de modificar una cadena lateral de al menos un aminoácido en dicho péptido, después cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto de tipo péptido deseado del cultivo;

60 (37) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores por la tecnología de recombinación de genes, que comprende transformar un vector que contiene un ADN descrito en los puntos (27) a (29) anteriores en células, después cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto de tipo péptido deseado del cultivo, y a continuación modificar químicamente un aminoácido arbitrario del mismo;

(38) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (12) a (16) anteriores por la tecnología de recombinación de genes, que comprende usar células que tienen la actividad de unirse a un ácido graso

ES 2 335 235 T3

vía un enlace éster a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de un aminoácido o vía un enlace tioéster a un grupo mercapto de la cadena lateral de un aminoácido en el compuesto de tipo péptido;

5 (39) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (12) a (16) anteriores, que comprende usar células que tienen la actividad de acilación de serina mediante unión a un ácido graso vía un enlace éster con un grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina en la secuencia aminoacídica expresada en SEQ ID NO: 8;

10 (40) Una composición farmacéutica para terapia génica destinada al tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia aminoacídica de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores en células en un organismo vivo y expresar un péptido con al menos un aminoácido modificado, teniendo el péptido la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular;

15 (41) Un método para tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores en células que tienen un organismo vivo que permite que un péptido que tiene una secuencia aminoacídica codificada por dicho ADN sea producido como un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia aminoacídica, con lo que se expresa un péptido que tiene la actividad de inducir la hormona de crecimiento;

20 (42) Una composición farmacéutica para terapia génica destinada al tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia aminoacídica de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores en células en un organismo vivo y expresar un péptido con al menos un aminoácido modificado, teniendo el péptido la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular;

25 (43) Un método para tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (19) anteriores en células que tienen un organismo vivo que permite que un péptido que tiene una secuencia aminoacídica codificada por dicho ADN sea producido como un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia aminoacídica, con lo que se expresa un péptido que tiene la actividad de inducir la hormona de crecimiento.

35 Específicamente, aquí se describe:

(1) Un compuesto de tipo péptido que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular, donde al menos un aminoácido está reemplazado por un aminoácido modificado y/o un compuesto no aminoacídico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40 (2) El compuesto de tipo péptido según el punto (1) anterior, que comprende (a) una secuencia aminoacídica representada en SEQ ID NO: 2 o (b) una secuencia aminoacídica que tiene una cualquiera de las secuencias aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en

45 (1) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 4,

(2) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 5,

50 (3) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 6,

(4) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 7,

55 (5) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 8,

(6) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 9, y

(7) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 10,

60 a partir del extremo amino en la secuencia (a) y al menos un aminoácido delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte fuera de dichas secuencias aminoacídicas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(3) El compuesto de tipo péptido según el punto (2) anterior, que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias aminoacídicas representadas por SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 y 23, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

65 (4) Un compuesto de tipo péptido, en el que en un péptido que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular y la actividad de inducir secreción de la hormona de crecimiento, (a) los aminoácidos constitu-

ES 2 335 235 T3

yentes están modificados o no modificados y (b) al menos un aminoácido está reemplazado o no reemplazado por un compuesto no aminoacídico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5 (5) El compuesto de tipo péptido según el punto (4), que comprende (a) una secuencia aminoacídica representada en SEQ ID NO: 2 o (b) una secuencia aminoacídica que tiene una cualquiera de las secuencias aminoacídicas seleccionadas del grupo que consiste en

- (1) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 4,
- 10 (2) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 5,
- (3) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 6,
- (4) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 7,
- 15 (5) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 8,
- (6) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 9, y
- 20 (7) secuencia aminoacídica con los aminoácidos 1 a 10,

a partir del extremo amino en la secuencia (a) y al menos un aminoácido delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte fuera de dichas secuencias aminoacídicas, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

25 (6) El compuesto de tipo péptido según el punto (4) o (5) anterior, que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias aminoacídicas representadas por SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 y 23, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

30 (7) El compuesto de tipo péptido según el punto (1) a (6) anteriores, donde el aminoácido modificado es un aminoácido en la 3ª posición a partir del extremo amino o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(8) El compuesto de tipo péptido según el punto (7), donde el aminoácido en el aminoácido modificado es serina o cisteína, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

35 (9) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1) a (6) anteriores, que comprende un aminoácido modificado en el que (a) se ha introducido una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α respecto del aminoácido vía o no vía un grupo alquileo que contiene uno o más átomos de carbono y vía un enlace éster, éter, tioéter, amida o disulfuro, o (b) se ha introducido H o una cadena alquílica saturada o insaturada, que contiene uno o más átomos de carbono, en el átomo de carbono en posición α
40 respecto del aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(10) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1) a (6) anteriores, que comprende un aminoácido modificado que está modificado con un enlace éster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

45 (11) El compuesto de tipo péptido según el punto (10) anterior, que comprende un aminoácido al que está unido un ácido graso, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(12) El compuesto de tipo péptido según el punto (11) anterior, que comprende un aminoácido al que está unido un ácido graso que contiene que contiene 2 a 35 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

50 (13) El compuesto de tipo péptido según el punto (12) anterior, que comprende un aminoácido al que está unido un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácidos grasos que contienen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

55 (14) El compuesto de tipo péptido según el punto (13) anterior, donde el ácido graso unido es ácido octanoico, un ácido graso monoénico del mismo o un ácido graso poliénico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

60 (15) El compuesto de tipo péptido según el punto (13) anterior, donde el ácido graso unido es ácido octanoico, un ácido graso monoénico del mismo o un ácido graso poliénico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(16) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1) a (15) anteriores, donde el extremo amino está modificado con un grupo alquilo o acilo saturado o insaturado que contiene uno o más átomos de carbono, y/o un grupo hidroxilo del grupo carboxilo del extremo carboxi terminal es OZ o NR2R3 donde Z es un catión farmacéuticamente aceptable o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado, y R2 y R3 son iguales o diferentes y representan H o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado;

ES 2 335 235 T3

(17) Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

5 (18) Una composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída de la hormona de crecimiento, que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

10 (19) Una composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende un agente para tratar enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento y un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

15 (20) Una composición farmacéutica según los puntos (17) a (19) anteriores, que se aplica a animales distintos de seres humanos;

(21) Un método para el tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

20 (22) Un método para el tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende administrar un agente para tratar enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento y un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

25 (23) El método de tratamiento según los puntos (21) a (22), que se aplica a animales distintos de seres humanos;

30 (24) Un ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores, que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en la secuencia de aminoácidos codificados por dicho ADN;

35 (25) El ADN según el punto (24) anterior, donde la secuencia nucleotídica es una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias nucleotídicas representadas en SEQ ID NOS: 6, 7, 14, 15, 20, 21 y 24;

(26) El ADN según el punto (24) anterior, donde la secuencia nucleotídica es una secuencia nucleotídica que codifica aminoácidos en una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo de secuencias nucleotídicas representadas en SEQ ID NOS: 6, 7, 14, 15, 20, 21 y 24;

40 (27) Un vector que comprende un ADN descrito en los puntos (40) a (42) anteriores;

(28) Células que comprenden el vector descrito en el punto (27) anterior;

45 (29) Células que comprenden un ADN descrito en los puntos (24) a (26) anteriores, donde se puede producir un compuesto de tipo péptido que tiene una secuencia aminoacídica codificada por dicho ADN, como compuesto de tipo péptido que tiene al menos un aminoácido modificado en dicha secuencia aminoacídica;

(30) Un anticuerpo contra un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores;

50 (31) Un método para determinar mediante ensayo un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores, que comprende usar el anticuerpo descrito en el punto (30) anterior para detectar el compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores;

55 (32) Un kit para detectar un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores, que comprende usar el anticuerpo descrito en el punto (30) anterior para detectar dicho compuesto de tipo péptido;

60 (33) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores por la tecnología de recombinación de genes, que comprende transformar un vector que contiene un ADN descrito en los puntos (24) a (26) anteriores en células hospedadoras capaces de modificar una cadena lateral de al menos un aminoácido en dicho péptido, después cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto de tipo péptido deseado del cultivo;

65 (34) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores por la tecnología de recombinación de genes, que comprende transformar un vector que contiene un ADN descrito en los puntos (24) a (26) anteriores en células, después cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto de tipo péptido deseado del cultivo, y a continuación modificar químicamente un aminoácido arbitrario del mismo;

ES 2 335 235 T3

(35) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (11) a (15) anteriores por la tecnología de recombinación de genes, donde el compuesto de tipo péptido se puede producir como un péptido que tiene un ácido graso unido a un resto de serina en la secuencia aminoacídica representada en SEQ ID NO: 8;

5 (36) Un método para producir un compuesto de tipo péptido que tiene la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular y la actividad de inducir secreción de la hormona de crecimiento, que comprende transformar un vector que contiene un ADN que codifica un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores en células, y cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto de tipo péptido deseado del cultivo;

10 (37) Una composición farmacéutica para terapia génica destinada al tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores en células en un organismo vivo y expresar un péptido con al menos un aminoácido modificado, teniendo el péptido la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular;

15 (38) Un método para tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores en células que tienen un organismo vivo que permite que un péptido que tiene una secuencia aminoacídica codificada por dicho ADN sea producido como un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia aminoacídica, con lo que se expresa un péptido que tiene la actividad de inducir la hormona de crecimiento;

20 (39) Una composición farmacéutica para terapia génica destinada al tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores en células en un organismo vivo lo que permite y expresar un péptido con al menos un aminoácido modificado, teniendo el péptido la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular;

25 (40) Un método para tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (16) anteriores en células en un organismo vivo que permite que un péptido que tiene una secuencia aminoacídica codificada por dicho ADN sea producido como un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia aminoacídica, con lo que se expresa un péptido que tiene la actividad de inducir la hormona de crecimiento.

35

Específicamente, se describe aquí:

40 (1) Un compuesto de tipo péptido que tiene la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular, donde al menos un aminoácido está reemplazado por un aminoácido modificado y/o un compuesto no aminoacídico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(2) El compuesto de tipo péptido según el punto (1) anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

45

(3) El compuesto de tipo péptido según el punto (1) anterior, que comprende una secuencia aminoacídica representada en SEQ ID NO: 2 o una secuencia aminoacídica en donde en SEQ ID NO: 2, al menos un aminoácido está delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte exterior de una secuencia de aminoácidos 1 a 7 desde el extremo amino del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

50

(4) Un análogo o derivado del péptido descrito en el punto (1) anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 3 o una secuencia aminoacídica en donde en SEQ ID NO: 3, al menos un aminoácido está delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte exterior de una secuencia de aminoácidos 1 a 7 desde el extremo amino del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

55

(5) Un compuesto de tipo péptido precursor del compuesto peptídico descrito en (3) más arriba, que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 o una secuencia aminoacídica donde en SEQ ID NO: 4, al menos un aminoácido está delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte exterior de una secuencia de aminoácidos 1 a 28 desde el extremo amino del mismo;

60

(6) Un compuesto de tipo péptido precursor del compuesto peptídico descrito en (4) más arriba, que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 o una secuencia aminoacídica donde en SEQ ID NO: 5, al menos un aminoácido está delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte exterior de una secuencia de aminoácidos 1 a 28 desde el extremo amino del mismo;

65

(7) Un compuesto de tipo péptido que tiene la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular y la actividad de inducir secreción de hormona de crecimiento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

ES 2 335 235 T3

- (8) El compuesto de tipo péptido según el punto (7) anterior, que tiene la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular y la actividad de inducir secreción de hormona de crecimiento y que tiene al menos un aminoácido reemplazado por un compuesto no aminoacídico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 5 (9) El compuesto de tipo péptido según los puntos (7) a (8) anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos expresada en SEQ ID NO: 1, o un derivado del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 10 (10) El compuesto de tipo péptido según los puntos (7) a (8) anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos expresada en SEQ ID NO: 2, al menos un aminoácido está delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte exterior de una secuencia de los aminoácidos 1 a 7 a partir del extremo amino del mismo, o un derivado del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 15 (11) El compuesto de tipo péptido según los puntos (7) a (8) anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos expresada en SEQ ID NO: 3, al menos un aminoácido está delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte exterior de una secuencia de los aminoácidos 1 a 7 a partir del extremo amino del mismo, o un derivado del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 20 (12) Un compuesto de tipo péptido precursor del compuesto de tipo péptido descrito en (10) más arriba, que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 o una secuencia aminoacídica donde en SEQ ID NO: 4, al menos un aminoácido está delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte exterior de una secuencia de aminoácidos 1 a 28 desde el extremo amino del mismo;
- 25 (13) Un compuesto de tipo péptido precursor del compuesto de tipo péptido descrito en (10) más arriba, que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5 o una secuencia aminoacídica donde en SEQ ID NO: 5, al menos un aminoácido está delecionado, reemplazado y/o añadido en una parte exterior de una secuencia de aminoácidos 1 a 28 desde el extremo amino del mismo;
- 30 (14) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1) a (6) anteriores, en donde el aminoácido modificado es un aminoácido en la 3ª posición del extremo amino del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable;
- (15) El compuesto de tipo péptido según el punto (14), donde el aminoácido en el aminoácido modificado es serina o cisteína, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 35 (16) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1) a (6) anteriores, en donde la modificación en el aminoácido modificado indica la modificación en el carbono α de dicho aminoácido por (a) una cadena alquílica saturada o insaturada que contiene uno o más átomos de carbono que se une en un modo de enlace seleccionado del grupo que consiste en éster, éter, tioéster, tioéter, amida o carbamida vía o no vía una cadena alquílica que contiene uno o más átomos de carbono, o (b) H o una cadena alquílica saturada o insaturada que contiene uno o más átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 40 (17) El compuesto de tipo péptido según el punto (1) anterior, que comprende un aminoácido modificado, que está modificado con un enlace éster, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 45 (18) El compuesto de tipo péptido según el punto (17) anterior, que comprende un aminoácido al que está unido un ácido graso, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (19) El compuesto de tipo péptido según el punto (18) anterior, que comprende un aminoácido al que está unido un ácido graso que contiene 2 a 35 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 50 (20) El compuesto de tipo péptido según el punto (18) anterior, en donde el ácido graso unido es ácido caprílico, un ácido graso monoénico del mismo o un ácido graso poliénico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 55 (21) El compuesto de tipo péptido según el punto (18) anterior, donde el ácido graso unido es ácido cáprico, un ácido graso monoénico del mismo o un ácido graso poliénico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (22) El compuesto de tipo péptido según el punto (18) anterior, donde el ácido graso unido es ácido láurico, un ácido graso monoénico del mismo o un ácido graso poliénico del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 60 (23) El compuesto de tipo péptido según los puntos (1) a (22) anteriores, donde el extremo amino está modificado con un grupo alquilo o acilo saturado o insaturado que contiene uno o más átomos de carbono, y/o el extremo carboxi terminal es OZ o NR2R3 donde Z es un catión farmacéuticamente aceptable o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado, y R2 y R3 son iguales o diferentes y representan H o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado;
- 65

ES 2 335 235 T3

(24) Una composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo;

5 (25) Una composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende un agente para tratar enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento y un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

10 (26) Una composición farmacéutica según los puntos (24) a (25), que se aplica a animales distintos de seres humanos;

(27) Un método para tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un ingrediente activo;

15 (28) Un método para tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende administrar un un agente para tratar enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento y un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6) anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(29) El método de tratamiento según los puntos (27) a (28), que se aplica a animales distintos de seres humanos;

25 (30) UN ADN para un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6), que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia aminoacídica;

(31) El ADNc según el punto (30) anterior, que comprende una secuencia de ADN representada en SEQ ID NO: 6 (incluyendo NCR);

30 (32) El ADNc según el punto (30) anterior, que comprende una secuencia de ADN de bases 31 a 381 en una secuencia de ADN representada en SEQ ID NO:6 (sin incluir NCR);

35 (33) El ADNc según el punto (30) anterior, que comprende una secuencia de ADN representada en SEQ ID NO: 7 (incluyendo NCR);

(34) El ADNc según el punto (30) anterior, que comprende una secuencia de ADN de bases 34 a 385 en una secuencia de ADN representada en SEQ ID NO:7 (sin incluir NCR);

40 (35) Un vector que comprende un ADN descrito en los puntos (30) a (34) anteriores;

(36) Células que comprenden el vector descrito en el punto (35) anterior;

45 (37) Células que comprenden un vector que contiene un ADN descrito en los puntos (30) a (34) anteriores, donde un compuesto de tipo péptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por dicho ADN se puede producir como un compuesto de tipo péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia de aminoácidos;

(38) Un anticuerpo contra un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (23) anteriores;

50 (39) Un método para detectar mediante ensayo un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (23) anteriores, que comprende usar el anticuerpo descrito en el punto (38) anterior para detectar el compuesto de tipo péptido;

55 (40) Un estuche para detectar un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (23) anteriores, que comprende usar el anticuerpo descrito en el punto (38) anterior para detectar el compuesto de tipo péptido;

60 (41) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6) anteriores por tecnología de recombinación de genes, que comprende transformar un vector que contiene un ADN descrito en el punto (30) anterior en células hospedadoras capaces de modificar una cadena lateral de al menos un aminoácido en dicho péptido, después cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto de tipo péptido deseado del cultivo;

65 (42) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6) anteriores por tecnología de recombinación de genes, que comprende transformar un vector que contiene un ADN descrito en el punto (30) anterior en células hospedadoras, después cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto de tipo péptido deseado del cultivo, y a continuación modificar químicamente un aminoácido arbitrario del mismo;

ES 2 335 235 T3

(43) Un método para producir un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (18) a (22) anteriores por tecnología de recombinación de genes, que comprende usar células que permiten que el compuesto de tipo péptido sea producido como un péptido que tiene un ácido graso unido a un resto de serina en la secuencia de aminoácidos expresada en SEQ ID NO: 1;

(44) Un método para producir un compuesto de tipo péptido que tiene la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular y la actividad de secretar hormona de crecimiento, que comprende transformar un vector que contiene un ADN que codifica un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (7) a (13) anteriores en células hospedadoras, cultivar las células transformadas resultantes y recuperar el compuesto deseado del cultivo;

(45) Una composición farmacéutica para terapia génica destinado a tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN codificante de una secuencia aminoacídica de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6) anteriores en células en un organismo vivo y expresar un péptido con al menos un aminoácido modificado, teniendo el péptido la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular;

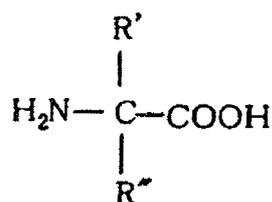
(46) Un método para tratamiento de enfermedades atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN codificante de una secuencia aminoacídica de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6) anteriores en células en un organismo vivo que permiten que un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por dicho ADN sea producido como un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia de aminoácidos, con lo que se expresa un péptido que tiene la actividad de inducir hormona de crecimiento;

(47) Una composición farmacéutica para terapia génica destinada a tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (a) a (6) anteriores en células en un organismo vivo y expresar un péptido con al menos un aminoácido modificado que tiene la actividad de incrementar la concentración de ion calcio intracelular;

(48) Un método para tratamiento de enfermedades no atribuibles a un defecto o una caída en la hormona de crecimiento, que comprende integrar un vector que contiene un ADN codificante de una secuencia aminoacídica de un compuesto de tipo péptido descrito en los puntos (1) a (6) anteriores en células en un organismo vivo que permiten que un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por dicho ADN sea producido como un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que reconoce al menos un aminoácido modificable en dicha secuencia de aminoácidos, con lo que se expresa un péptido que tiene la actividad de inducir hormona de crecimiento.

Tal como se usa aquí, el aminoácido incluye todos los aminoácidos tales como L-aminoácidos, D-aminoácidos, α -aminoácidos, β -aminoácidos, γ -aminoácidos, aminoácidos naturales y aminoácidos sintéticos o similares.

En la presente invención, el aminoácido modificado se refiere a un aminoácido como se define en las reivindicaciones. Cuando el aminoácido se representa por la fórmula (1):



R' y R'' en el aminoácido modificado químicamente pueden ser H o un grupo de acuerdo con las reivindicaciones.

Un aminoácido en el que como grupo sustituyente representado por R' y R'', un grupo sustituyente presente en el aminoácido natural se reemplaza por un grupo sustituyente no presente en el aminoácido natural o en su D-aminoácido correspondiente, se denomina aminoácido modificado.

Cuando el aminoácido natural contiene, por ejemplo, -OH, como grupo sustituyente en una cadena lateral del mismo, se dice que un ejemplo preferido del grupo sustituyente mencionado anteriormente es un grupo formado por acilación de dicho grupo sustituyente.

El grupo acilo incluye, por ejemplo, grupos formados retirando un grupo hidroxilo de un ácido carboxílico orgánico.

El ácido carboxílico orgánico incluye, por ejemplo, ácidos grasos, y el número de átomos de carbono del mismo es preferiblemente de 2 a 35, más preferiblemente de 6 a 18 y aún más preferiblemente de 8 a 16. Estos ácidos

ES 2 335 235 T3

grasos incluyen, por ejemplo, ácido octanoico (preferiblemente ácido caprílico), ácido decanoico (preferiblemente ácido cáprico) y ácido dodecanoico (preferiblemente ácido láurico), así como ácidos grasos monoénicos y poliénicos de los mismos.

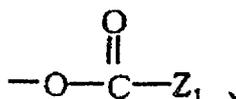
5 El modo de enlace se describe con más detalle.

Por ejemplo, si el aminoácido es serina, treonina, tirosina u oxiprolina, el aminoácido tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral.

10 El grupo hidroxilo puede haberse modificado químicamente. Es decir, el grupo hidroxilo puede estar esterificado

El grupo hidroxilo modificado químicamente de esta manera puede representarse, por ejemplo, por:

15



20

En la fórmula anterior, Z_1 puede ser cualquier grupo sustituyente para la modificación química siempre que no vayan en contra de la definición en las reivindicaciones, pero como los grupos sustituyentes usados convencionalmente en un campo farmacéutico o para la modificación química de péptidos son bien conocidos en la bibliografía de patente o en la bibliografía científica, pueden usarse estos grupos sustituyentes conocidos para la modificación y, de acuerdo con tales métodos conocidos, puede realizarse la modificación química en la presente invención.

En las fórmulas anteriores, Z_1 puede ser un grupo alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, y dicho grupo alquilo puede estar saturado o insaturado. El número de átomos de carbono del mismo es normalmente C_{1-50} , preferiblemente C_{6-20} .

Los grupos alquilo representados por $Z_1, Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7$ o Z_8 pueden estar sustituidos con grupos sustituyentes tales como un grupo hidroxilo, grupo amino, halógeno, grupo nitro y grupo alcoxi C_{1-3} , que se usan convencionalmente para la modificación química de péptidos.

35

En lo anterior, si $Z_1\text{-CO-}$ es un resto del ácido graso $Z_1\text{-COOH}$, esto es un ejemplo del aminoácido al que se ha unido un ácido graso. El ácido graso en este caso incluye, por ejemplo, un ácido graso saturado tal como ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido butírico, ácido caproico, ácido undecílico, ácido palmítico, ácido decanoico, ácido nonadecanoico, ácido behénico, ácido montánico, ácido lacérico y un ácido graso insaturado tal como ácido acrílico, ácido oleico, ácido linólico, ácido linolénico y ácido aatearólico. El ácido graso insaturado puede ser un monoeno o un polieno.

Además, el aminoácido modificado también puede ser un α -aminoácido formado reemplazando un grupo (excluyendo un grupo carboxilo y un grupo amino que constituye un enlace peptídico) de unión al átomo de carbono α del α -aminoácido por un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo saturado o insaturado.

45

En la presente invención, el aminoácido modificado también puede ser un aminoácido formado introduciendo un grupo alquilo C_{1-6} saturado o insaturado en el grupo amino del aminoácido.

El aminoácido no natural descrito aquí es el que tiene un grupo amino y un grupo carboxilo en los dos extremos de la molécula, e incluye por ejemplo $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{CH(CH}_2\text{OH)-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-C(CH}_3\text{)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-COOH}$ y $\text{NH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-COOH}$. La longitud de su cadena molecular corresponde a la longitud de un dipéptido, pero el aminoácido no natural de la presente invención también incluye los que tienen la longitud de un péptido.

55

Además, el compuesto no aminoacídico descrito aquí incluye, por ejemplo, $\text{NH}_2\text{-CH(CH}_2\text{OH)-CH}_3$, $\text{CH}_3\text{-CH(R)-COOH}$, $\text{CH}_3\text{-CH(R)-CH}_3$ donde la longitud de la molécula corresponde a la longitud de un péptido, o $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{CH(CH}_2\text{OH)-CH}_3$ y $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{CH(R)-CH}_3$ donde la longitud de la molécula corresponde a la longitud de un dipéptido.

Aquí, R representa un grupo sustituyente en una cadena lateral del aminoácido natural o en el carbono α del aminoácido modificado mencionado anteriormente.

60

Breve descripción de los dibujos

65

La Fig. 1 muestra la purificación de grelina a partir de extracto de estómago de rata, y el cambio de intensidad de fluorescencia por un aumento de la concentración de ion calcio intracelular en células CHO-GHSR62 se muestra por la barra negra. La Fig. 1a muestra un perfil de exclusión molecular de Sephadex G-50 (fina) de una fracción de SP-

III preparada a partir de 40 g de estómago de rata, para indicar que el peso molecular de las fracciones activas es de aproximadamente 3.000 Dalton. La Fig. 1b es un gráfico que muestra un perfil en la HPLC de intercambio iónico de CM secundaria y las fracciones activas eluidas a tiempos de retención de 55 a 56 minutos se purificaron adicionalmente por HPLC de fase inversa.

La Fig. 2 demuestra que se identificó la modificación de grelina con N-octanoílo. La Fig. 2a muestra el resultado del análisis de 2 μ g de grelina natural (superior) y grelina sintética y grelina desacilada sintética (inferior) por HPLC de fase inversa. La Fig. 2b es un gráfico que muestra cambios en la concentración de ion calcio intracelular en células CHO-CHSR62 por grelina natural (línea continua), grelina sintética (línea de trazos cortos) y grelina desacilada sintética (línea de trazos largos).

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la interacción específica de la grelina con células CHO-GHSR62, y la grelina se añadió en el momento indicado por la punta de flecha. La Fig. 3a es un gráfico que muestra cambios en la concentración de ion calcio intracelular en células CHO-GHSR62 por grelina, GHRP-6 y GRF (GHRH), respectivamente. La Fig. b es un gráfico que muestra cambios en la concentración de ion calcio intracelular en células CHO-GHSR62 por grelina en presencia (○) o en ausencia (●) de [D-Lys-3]-GRP-6, y también se muestra un cambio en la concentración de ion calcio intracelular por GRF (GHRH) (triángulo negro).

La Fig. 4 muestra las secuencias aminoacídicas de precursores de grelina procedentes de rata y de ser humano, así como el resultado del análisis de expresión de estos precursores en diversos tejidos. La Fig. 4a muestra la comparación entre las secuencias aminoacídicas de precursores de grelina procedentes de rata y de ser humano, donde el mismo aminoácido está sombreado, el péptido señal está indicado por la línea de trazos, el sitio de escisión del péptido señal está indicado por el triángulo sombreado, el sitio de escisión en el lado del extremo carboxilo está indicado por el triángulo, el resto de grelina maduro está en un recuadro y la modificación con ácido n-octanoico está indicada por *. La Fig. 4b muestra el resultado de análisis de la expresión de grelina en una amplia diversidad de tejidos de rata por transferencia de Northern.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el efecto de la grelina *in vitro* e *in vivo* sobre la secreción de hormonas de la pituitaria. La Fig. 5a es un gráfico que muestra el cambio en intensidad de fluorescencia por un cambio en la concentración de ion calcio intracelular en células cultivadas de pituitaria de rata en una fase inicial, donde el cambio tras la adición de grelina se indica por la línea continua y el cambio tras la adición de grelina desacilada por la línea de trazos. La Fig. 5b es un gráfico que muestra la secreción de hormonas de la pituitaria, donde la barra negra y la barra blanca muestran las concentraciones de niveles de hormona de la pituitaria en presencia y ausencia de grelina, respectivamente. La Fig. 5c es un gráfico que muestra la evolución a lo largo del tiempo de la concentración de hormona de la pituitaria en plasma después de inyectar grelina por vía intravenosa a ratas macho. En las Fig. 5b y 5c, GH es hormona del crecimiento, ACTH es adrenocorticotropina, FSH es hormona estimuladora del folículo, LH es hormona luteinizante, PRL es prolactina y TSH es hormona estimuladora del tiroides.

La Fig. 6 muestra la promoción del apetito tras la administración de grelina en el ventrículo, mostrándose la cantidad de alimento consumido (media \pm error típico) durante 2 horas después de la administración de grelina. La Fig. 6a demuestra que el intervalo de error para el efecto de la grelina es menor de 0,0001.

La Fig. 7 muestra el efecto de un fármaco administrado a ratas anestesiadas con uretano sobre la secreción de ácido gástrico, mostrando A y B los resultados de la administración de grelina de rata (rGrelina) e histamina, respectivamente. Cada símbolo indica un valor medio de 4 ratas, y el error típico se muestra por una barra de error. Como control, se administró solución fisiológica salina. El fármaco se administró en el momento indicado por la punta de flecha.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra la acción de la grelina de rata sobre la motilidad del estómago en ratas anestesiadas con uretano. La Fig. 8A muestra ondas típicas de motilidad del estómago tras la administración de solución fisiológica salina y grelina de rata (rGrelina), y la Fig. B es un gráfico que muestra un valor medio de 4 ratas junto con el error típico. El fármaco se administró en el momento indicado por la punta de flecha.

La Fig. 9 es un gráfico que muestra una curva patrón en radioinmunoensayos y la reactividad cruzada con anticuerpo. La Fig. 9a es un gráfico que muestra la inhibición de la unión, por diversas grelinas, de grelina de rata marcada con 125 I a un anticuerpo contra un fragmento de grelina amino-terminal, y la Fig. 9b es un gráfico que muestra la inhibición de la unión, por diversas grelinas, de grelina de rata marcada con 125 I a un anticuerpo contra un fragmento de grelina carboxilo-terminal. En las abscisas se muestra la cantidad de diversas grelinas/tubo de reacción, mientras que en las ordenadas se muestra la relación (%) entre la cantidad (B) de grelina de rata unida en presencia de diversas grelinas y la cantidad de la misma (B₀) en ausencia de las diversas grelinas. Los símbolos de los gráficos son los siguientes: grelina de rata (○); grelina humana (●); grelina de rata-27 (□); [Ser3(decanoil)]-grelina de rata (◇); [Ser3(hexanoil)]-grelina de rata (Δ); y grelina de rata sin ácidos grasos (▼).

Mejor modo para realizar la invención

Para que un péptido sirva como ligando endógeno para el receptor de GHS (GHS-R), la distribución del ligando endógeno en órganos o tejidos puede conocerse añadiendo un extracto de diversos órganos o tejidos a células que expresan GHS-R y midiendo la concentración de ion calcio intracelular.

ES 2 335 235 T3

Las células que expresan GHS-R incluyen cepas derivadas del hipotálamo y de la glándula pituitaria que se sabe que expresan GHS-R de manera constante y sus tejidos, pero preferiblemente son células adecuadas, tales como células CHO, transformadas en las que se ha introducido el gen GHS-R, y que expresan el gen.

5 La fuerte actividad de liberación de Ca del péptido GHS endógeno de la presente invención no se encontró en el hipotálamo ni en la glándula pituitaria que expresan el péptido, sino en un extracto de estómago como órgano del sistema digestivo. Por lo tanto, es necesario examinar no sólo los tejidos y órganos que expresan dicho receptor, sino también una amplia diversidad de tejidos y órganos distintos para encontrar el ligando endógeno deseado para el receptor huérfano.

10 La concentración de ion calcio intracelular puede medirse por cualquier método conocido en la técnica, preferiblemente por medio de FLIPR (Lector de Placas de Imágenes Fluorescentes, Molecular Devices Co., Ltd.) utilizando el cambio en la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 AM (Molecular Probe Co., Ltd.) producido por un cambio en la concentración de iones de calcio.

15 Para obtener el péptido GHS endógeno deseado a partir de tejidos y órganos que se ha confirmado que presentan la actividad de liberación de Ca, puede usarse cualquier método de purificación conocido en la técnica.

20 Como método de purificación del péptido, es eficaz usar individualmente o en combinación técnicas cromatográficas de exclusión molecular, de intercambio iónico y de fase inversa después de una amplia diversidad de métodos de fraccionamiento, o usar dichas técnicas por separado, pero es posible usar no sólo estas técnicas cromatográficas, sino también cualquier medio eficaz para la purificación del péptido.

25 Para el aislamiento y purificación del péptido a partir de los tejidos y órganos, se desea la inactivación de las proteasas en los tejidos y órganos por tratamiento térmico en agua hirviendo para prevenir la degradación del péptido deseado por la acción de las proteasas. También son eficaces el tratamiento térmico y la eliminación de los tejidos y órganos con refrigeración en hielo para la extracción y purificación del péptido deseado.

30 Para confirmar que el péptido purificado que tiene la actividad de liberación de Ca tiene actividad inductora de la secreción de GH *in vitro* e *in vivo*, puede utilizarse un método conocido.

35 Por ejemplo, la GH secretada en un medio de cultivo de células de glándula pituitaria que se ha confirmado que secretan GH y expresan GHS-R puede medirse *in vitro* en radioinmunoensayos añadiendo anticuerpo anti-GH a las células. Usando un anticuerpo contra otra hormona en lugar del anticuerpo anti-GH en radioinmunoensayos, también puede medirse la cantidad de dicha hormona secretada.

40 Además, la actividad inductora de la secreción de GH *in vivo* puede confirmarse inyectando el péptido que tiene actividad de liberación de Ca en una vena periférica de un animal y después midiendo la concentración de GH en suero.

Para analizar la estructura del péptido purificado, puede usarse un método conocido.

45 Para determinar la secuencia aminoacídica del péptido, existe un método en el que se liberan secuencialmente restos aminoacídicos del extremo carboxilo por degradación de Edman, seguido de la identificación de los aminoácidos liberados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como una versión automática de este método por un secuenciador de aminoácidos.

50 También existe un método para determinar la secuencia aminoacídica midiendo los pesos moleculares de fragmentos ionizados por GC-MASS.

En el caso del péptido que contiene aminoácidos modificados en un aspecto de la presente invención, el aminoácido modificado se identifica como "aminoácido desconocido" tras la determinación de la secuencia aminoacídica.

55 En este caso, el péptido modificado se descompone en unidades de aminoácidos de las cuales se separa y purifica el aminoácido modificado, y la estructura del aminoácido modificado se determina de una manera habitual para determinar la estructura del compuesto, con lo que puede conocerse la estructura entera del péptido. Como alternativa, existe un método en el que el péptido se obtiene a partir de un ADNc que codifica el péptido modificado, después se sintetiza químicamente un péptido que tiene la secuencia aminoacídica del péptido resultante y las propiedades físicas y el peso molecular del péptido no modificado sintético se comparan con las del péptido modificado para estimar la estructura del grupo modificado.

60 Una secuencia aminoacídica parcial (secuencia central) que, en el péptido determinado estructuralmente de esta manera, es esencial para la actividad de liberación de Ca se revela midiendo la actividad de liberación de Ca de cada fragmento peptídico formado por escisión de dicho péptido con una proteasa.

65 La proteasa usada será una proteasa muy específica para la secuencia aminoacídica del péptido a escindir, pero también puede usarse una proteasa poco específica en condiciones de digestión parcial para preparar diversos fragmentos peptídicos a partir de dicho péptido.

ES 2 335 235 T3

Midiendo la actividad de liberación de Ca de cada fragmento peptídico preparado de esta manera, puede conocerse una secuencia central esencial para la actividad de liberación de Ca.

5 En el péptido inductor de la secreción de GH endógena, la tercera serina del extremo amino se ha acilado con un ácido graso, y también es posible sintetizar químicamente un fragmento peptídico que tenga una parte de la secuencia aminoacídica del péptido inductor de la secreción de GH endógena, así como un péptido modificado con ácido graso que comprende un ácido graso unido a través de un enlace éster a la cadena lateral de serina en dicho fragmento peptídico.

10 Usando dicho fragmento peptídico, puede analizarse con detalle el péptido inductor de la secreción de GH endógena. Simultáneamente, el tipo de ácido graso necesario para la actividad de liberación de Ca puede determinarse comparando los fragmentos peptídicos modificados con diversos ácidos grasos.

15 Por ejemplo, en el péptido inductor de la secreción de GH endógena procedente de algunas especies de *Xenopus laevis*, un resto aminoacídico en la tercera posición desde el extremo amino no es serina sino treonina, y dicha treonina se ha acilado con un ácido graso, pudiendo también sintetizarse este compuesto de tipo péptido y pudiendo analizarse dicho compuesto con detalle.

20 Comparando las secuencias aminoacídicas de los péptidos que tienen una actividad de inducción de la secreción de GH en vertebrados, puede encontrarse una región ampliamente conservada en vertebrados, y partir de la secuencia aminoacídica de dicha región, puede encontrarse una secuencia central esencial para la actividad inductora de la secreción de GH.

25 Se sintetiza químicamente un ADN con una secuencia de nucleótidos deducida a partir de la secuencia aminoacídica del péptido inductor de la secreción de GH endógena y este ADN se usa como sonda para investigar una biblioteca de ADNc preparada a partir de ARNm en células que expresan dicho péptido, con lo que puede obtenerse un ADNc que codifica dicho péptido.

30 Sin embargo, un codón correspondiente a un aminoácido está degenerado aumentando de esta manera el número de secuencias de nucleótidos deducidas a partir de la secuencia aminoacídica del péptido, de forma que la selección por medio del uso de un cierto ADN sintético consistente en diversos tipos de estas secuencias de nucleótidos como sonda puede ser difícil.

35 En este caso, si una secuencia de acuerdo con la secuencia aminoacídica de dicho péptido está presente en secuencias aminoacídicas deducidas a partir de la secuencia de nucleótidos de una secuencia marcadora expresada (EST) descrita en una base de datos de secuencias, puede sintetizarse un ADN consistente en una parte de la secuencia de nucleótidos de EST y usarse para investigar la biblioteca de ADNc anterior.

Además, puede obtenerse un ADN genómico de la manera habitual a partir del ADNc.

40 A partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc obtenido de esta manera, se revela la secuencia aminoacídica de un polipéptido precursor del péptido inductor de la secreción de GH endógena.

45 Analizando dicha secuencia aminoacídica, se revelan el péptido señal, el péptido inductor de la secreción de GH endógena, otros restos peptídicos y sitios de escisión de estos péptidos, revelándose de esta manera el mecanismo de formación del péptido de inducción de la secreción de GH endógena.

50 En la descripción de la Solicitud de Patente Internacional WO 98/42840 se describen otros aspectos de la presente invención, es decir, una secuencia aminoacídica parcial del péptido inductor de la secreción de GH endógena, la secuencia aminoacídica de un polipéptido precursor de dicho péptido y la secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica dicho polipéptido, pero el péptido descrito en este documento es un péptido consistente en 14 aminoácidos que tiene una actividad de tipo motilina, y no hay ninguna descripción en el documento mencionado de la actividad de aumento de la concentración de Ca y la actividad de inducción de la secreción de GH descrita en la presente invención.

55 El compuesto de tipo péptido descrito aquí se refiere a un péptido que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular, que se representa por la fórmula (2) presentada más adelante donde al menos un aminoácido se reemplaza por un aminoácido modificado; un análogo peptídico del mismo donde al menos un aminoácido se reemplaza por un no aminoácido; y un derivado peptídico del mismo donde se ha modificado el extremo amino y/o el extremo carboxilo.

60 Como se usa aquí, el péptido, análogo peptídico y derivado peptídico descrito anteriormente se denominan colectivamente compuesto de tipo péptido.

65 En el compuesto de tipo péptido, una pluralidad de aminoácidos pueden reemplazarse por aminoácidos modificados y/o no aminoácidos. En la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 2, en la presente invención es preferible que normalmente uno o más aminoácidos del 1^{er} al 10^o aminoácido desde el extremo amino, preferiblemente del 1^{er} al 4^o aminoácido o del 1^{er} al 5^o aminoácido desde el extremo amino se reemplacen por aminoácidos modificados y/o no aminoácidos. Es particularmente preferible que los aminoácidos 1^o a 5^o estén reemplazados por aminoácidos modificados y/o no aminoácidos.

ES 2 335 235 T3

En la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 2, pueden añadirse o deleccionarse uno o más aminoácidos fuera del 1^{er} al 4^o aminoácido, preferiblemente del 1^{er} al 6^o aminoácido y más preferiblemente del 1^{er} al 10^o aminoácido desde el extremo amino.

5 El compuesto de tipo péptido descrito aquí preferiblemente es un compuesto peptídico que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular e induce la secreción de hormona del crecimiento *in vivo*, donde al menos un aminoácido se ha reemplazado por un aminoácido modificado y/o un compuesto no aminoacídico.

10 Es decir, el compuesto de tipo péptido de la presente invención es un compuesto de tipo péptido que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular y/o la acción de inducir la secreción de hormona del crecimiento *in vivo*, donde un aminoácido de la cadena peptídica se ha reemplazado por un aminoácido modificado y/o un compuesto no aminoacídico.

15 Los ejemplos del compuesto incluyen los compuestos en los que en el péptido mostrado en la SEQ ID N°: 1, 2 ó 3, un grupo hidroxilo del aminoácido Ser 3 está acilado, los compuestos en los que en el péptido mostrado en la SEQ ID N°: 4 ó 5, un grupo hidroxilo del 25^o aminoácido Ser está acilado, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

20 Otros ejemplos incluyen los compuestos en los que en el péptido mostrado en la SEQ ID N°: 10, 11, 16 ó 17, un grupo hidroxilo del aminoácido Ser 3 está acilado, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otros ejemplos incluyen los compuestos en los que, en el péptido mostrado en la SEQ ID N°: 22, 25, 26 ó 27, un grupo hidroxilo del aminoácido Ser 3 está acilado, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

25 Otros ejemplos incluyen los compuestos en los que, en el péptido mostrado en la SEQ ID N°: 29, 30 o 31, un grupo hidroxilo del aminoácido Ser 3 está acilado, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otros ejemplos incluyen los compuestos en los que, en el péptido mostrado en la SEQ ID N°: 28, un grupo hidroxilo del aminoácido Thr 3 está acilado, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

30 El grupo acilo introducido en un grupo hidroxilo por acilación en la presente invención es un grupo formado retirando un grupo hidroxilo, por ejemplo, de un ácido carboxílico orgánico, un ácido sulfónico orgánico o un ácido fosfórico orgánico.

35 El ácido carboxílico orgánico incluye, por ejemplo, ácidos grasos, y el número de átomos de carbono del mismo, preferiblemente, es de aproximadamente 2 a 35, más preferiblemente de aproximadamente 6 a 18, y aún más preferiblemente de aproximadamente 8 a 16. Estos ácidos grasos incluyen, por ejemplo, ácido octanoico (preferiblemente ácido caprílico), ácido decanoico (preferiblemente ácido cáprico), y ácido dodecanoico (preferiblemente ácido laurílico [sic: ácido láurico]), así como sus ácidos grasos monoénicos o poliénicos.

40 En el ácido sulfónico orgánico o el ácido fosfórico orgánico, el número de átomos de carbono es preferiblemente de aproximadamente 2 a 35.

45 También se describe aquí cualquier compuesto de tipo péptido o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que incluyen la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 1, donde un grupo hidroxilo de la 3^a Ser está acilado.

50 Es decir, también se describe aquí cualquier compuesto de tipo péptido o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, incluyendo péptidos modificados con ácidos grasos, en el que un grupo hidroxilo de la 3^a Ser está acilado en la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 8, preferiblemente la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 1 y más preferiblemente la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 9.

55 Además, también se describe aquí cualquier compuesto peptídico o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo péptidos modificados con ácidos grasos, en el que un grupo hidroxilo de la Thr 3 está acilado en la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 8, preferiblemente la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 1 y más preferiblemente una secuencia aminoacídica en la que, en la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 9, el resto aminoacídico serina en la 3^a posición desde el extremo amino se convierte en treonina.

60 Además, aquí se describe un compuesto o sales farmacéuticamente aceptables representadas por la fórmula (2):

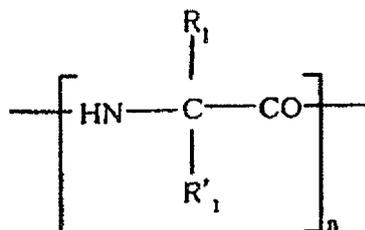


65 en la que X es un resto que corresponde a un átomo de hidrógeno en un grupo amino del aminoácido amino-terminal y representa H o un grupo alquilo o acilo saturado o insaturado que contiene uno o más átomos de carbono; Y es un resto que corresponde a un grupo hidroxilo en un grupo α -carboxilo del aminoácido carboxilo-terminal y representa OH, OZ o NR6R7, con lo cual Z es un catión farmacéuticamente aceptable o un grupo alquilo inferior

ES 2 335 235 T3

lineal o ramificado; y R6 y R7 pueden ser iguales o diferentes y representan H o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado.

Aquí, AA1 representa:

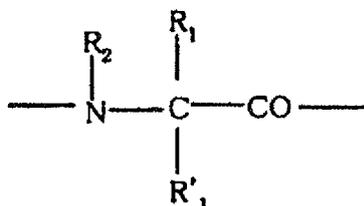


donde n es 1 ó 2, R₁ y R'₁ pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno o un grupo sustituyente, con la condición de que cuando n es 2, los dos grupos sustituyentes R₁ pueden ser iguales o diferentes; esto también se aplica a R'₁.

Los ejemplos del grupo sustituyente incluyen (1) una cadena alquilo saturada o insaturada que contiene uno o más átomos de carbono que se une, en un modo de enlace seleccionado entre el grupo que consiste en éster, éter, tioéster, tioéter, amida y carbamida a través o no de una cadena alquilo que contiene uno o más átomos de carbono, (2) H o una cadena alquilo saturada o insaturada que contiene uno o más átomos de carbono, y (3) una cadena lateral de un aminoácido natural.

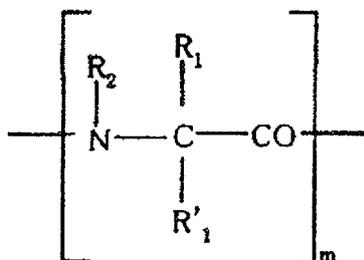
Además, el grupo sustituyente puede ser una cadena alquilo saturada o insaturada que contiene uno o más átomos de carbono, que se une a través de un enlace disulfuro o tiocarbamida a través o no de una cadena alquilo que contiene uno o más átomos de carbono.

AA2 representa:



donde R₁ y R'₁ tienen los mismos significados que se han definido anteriormente, y R₂ representa H o un grupo alquilo saturado o insaturado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, o AA2 representa -CH₂-CH(R₁)-CH₂- o -CH₂-CH(R₁)-CO- con lo que R₁ tiene el mismo significado que se ha definido anteriormente.

AA3 representa:



donde m es un número entero de 1 o más, y R₁, R'₁ y R₂ tienen los mismos significados que se han definido anteriormente, con la condición de que cuando m es un número entero de 2 o más, los dos grupos sustituyentes R₁ puedan ser iguales o diferentes; esto también se aplica a R'₁ y R₂.

El alquilo saturado o insaturado que contiene uno o más átomos de carbono, que se representa por X, es preferiblemente alquilo C₁₋₂₀ tal como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, n-heptilo, n-hexilo, n-decilo, vinilo, propanilo o hexenilo.

ES 2 335 235 T3

El acilo representado por X incluye acilo de ácido carboxílico C₁₋₁₀ tal como formilo, acetilo, propionilo o benzofilo, o acilo de ácido sulfónico C₇₋₁₃ tal como bencenosulfonil naftaleno sulfonilo o similares.

El grupo representado por R₁ o R₁' es preferiblemente un grupo representado, por ejemplo, por la fórmula (2):



(en la que n es un número entero de 0 a 10, P es -CO-O-, -O-CO-, -O-, -CO-S-, -CS-S-, -S-CO-, -S-, -CO-NH-, -NH-CO- o -CO-NH-CO-, Q es H o alquilo C₁₋₂₀ representado por X descrito anteriormente). Además, P también puede ser -CO-.

Además, P puede ser -S-S- o -NH-CS-. En cada -NH- descrito anteriormente, H puede reemplazarse por un grupo alquilo C₁₋₃₅ saturado o insaturado, un grupo arilo C₆₋₂₀ o un grupo aralquilo C₇₋₁₃.

Más preferiblemente, P es: -CO-O-, -CO-, -O-, -S-, -S-S-, -CO-S-, -CO-NH-, -NH-CO- o -NH-CS-.

El grupo representado por R₁ o R₁' puede ser un grupo que tiene Q unido directamente a -(CH₂)_n, no a través de P.

Se prefiere que el grupo alquilo inferior representado por Z, R₆ o R₇ sea alquilo C₁₋₆ tal como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, i-butilo, n-pentilo o n-hexilo.

En lo sucesivo, se describen compuestos.

(1) Ejemplos preferidos de AA1: (A) aminoácidos o péptidos tales como Ser, Gly-Ser o -NH-(CH₂)₃CH(CH₂OH)CO- donde un resto de enlace peptídico entre dos restos aminoácidos es -(CH₂)₂- y (B) aminas primarias, por ejemplo -NH-(CH₂)₃CH(CH₂OH)CH₂- donde un resto de enlace peptídico entre dos aminoácidos es -(CH₂)₂-; -NH-(CH₂)₃CH(R₁)CH₂- donde un resto de enlace peptídico entre dos aminoácidos es -(CH₂)₂-, donde R₁ tiene los mismos significados que se han definido anteriormente; y -NH-CH(CH₂OH)CH₂-.

Como aminoácidos o péptidos (A), también pueden darse como ejemplos NH₂-(CH₂)₄-COOH, NH₂-C(CH₃)₂-(CH₂)₃-COOH y NH₂-CH(CH₃)-(CH₂)₂-CH(CH₃)-COOH.

(2) Ejemplos preferidos de AA2: (A) aminoácidos tales como Ser, homoSer, Cys, homoCys, Asp, Glu, Lys, Ala, Val, Leu, homoLeu, Ile, homoIle, ornitina, ácido aminoadípico, metionina, etionina, butionina y S-metilcisteína, entre los que se prefiere particularmente Ser, y (B) estructuras distintas de restos aminoácidos; por ejemplo, pueden mencionarse -CH₂-CH(R₁)-CO-, -CH₂-CH(R₁)-CH₂-, etc. donde R₁ tiene los mismos significados que se han definido anteriormente.

En particular, se prefieren aminoácidos (a) con una cadena lateral hidrófoba, tales como leucina, valina, norleucina, homoleucina, homoisoleucina, naftil alanina o sus análogos, triptófano, fenilalanina, ciclohexilalanina etc. o N-metilaminoácidos de los mismos. Además, se prefieren aminoácidos (b) con una cadena lateral que tiene un grupo funcional que puede modificarse con un grupo acilo, grupo alquilo, grupo alquenilo o grupo aralquilo, tales como serina, homoserina, treonina, cisteína, homocisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido adípico, lisina, ornitina etc. y N-metilaminoácidos de los mismos.

Un grupo acilo, grupo alquilo, grupo alquenilo o grupo aralquilo etc. se unen a las cadenas laterales de los aminoácidos (b) a través de un enlace éster, amida, disulfuro, éter, tioéter, tioéster, carbamida o tiocarbamida. Además, un grupo alquilo o aralquilo puede unirse al carbono α del aminoácido.

(3) Ejemplos preferidos de AA3: Aminoácidos o péptidos tales como Phe o un péptido que tiene una secuencia aminoacídica desde la 4^a Phe a la 28^o Arg del extremo amino de la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N^o: 2 ó 3, o péptidos que tienen una secuencia aminoacídica en la que en la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N^o: 2 ó 3, un aminoácido se deleciona secuencialmente partiendo del aminoácido del extremo carboxilo hasta la 5^a Leu del extremo amino. Por ejemplo, AA3 incluye:

Phe Leu,

Phe Leu Ser,

Phe Leu Ser Pro,

Phe Leu Ser Pro Glu,

Phe Leu Ser Pro Glu His,

ES 2 335 235 T3

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg,

5 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,

10 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,

15 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,

20 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,

25 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,

30 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,

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

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.

40 Por supuesto, los aminoácidos ejemplificados como AA3 pueden ser L-aminoácidos o D-aminoácidos. Además, en las secuencias aminoacídicas ejemplificadas como AA3, pueden reemplazarse de uno a varios aminoácidos (preferiblemente hasta aproximadamente 1/3 de la secuencia aminoacídica) por unidades de aminoácidos no naturales o unidades que no son aminoácidos, por ejemplo:

45 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-$

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CO}-$

$-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2-$

50 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{R}_1)\text{CH}_2-$

$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}_1)-\text{CO}-$, o

55 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}_1)-\text{CH}_2-$

donde R_1 tiene los mismos significados que se han definido anteriormente. Cuando AA3 contiene una pluralidad de grupos representados por las fórmulas anteriores y una pluralidad de grupos representados por R_1 , estos grupos son iguales o diferentes.

60 Además, cualquier aminoácido ejemplificado como AA3 puede tener grupos sustituyentes representados por R_1 como se ha descrito anteriormente. Cuando está presente una pluralidad de grupos R_1 en un grupo representado por AA3, estos grupos R_1 pueden ser iguales o diferentes.

65 Cuando los aminoácidos que constituyen el péptido tienen un grupo hidroxilo, grupo mercapto, grupo imino o grupo amino en sus cadenas laterales, los ejemplos preferidos de tales cadenas laterales son los mostrados a conti-

ES 2 335 235 T3

nuación. En los siguientes ejemplos, R_8 es un grupo alquilo saturado o insaturado que contiene uno o más átomos de carbono. Tal cadena alquilo puede tener los mismos significados que se han definido para la cadena alquilo descrita anteriormente mostrada por X .

- 5 A) Cadena lateral de Ser; $-\text{CH}_2\text{-O-CO-R}_8$ o $-\text{CH}_2\text{-O-R}_8$,
- B) Cadena lateral de homoSer; $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-R}_8$ o $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-R}_8$,
- 10 C) Cadena lateral de Cys; $-\text{CH}_2\text{-S-CO-R}_8$ o $-\text{CH}_2\text{-S-R}_8$,
- D) Cadena lateral de homoCys; $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CO-R}_8$ o $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-R}_8$,
- E) Cadena lateral de Asp; $-\text{CH}_2\text{-COO-R}_8$ o $-\text{CH}_2\text{-CO-NH-R}_8$,
- 15 F) Cadena lateral de Glu; $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-R}_8$ o $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH-R}_8$
- G) Cadena lateral de Lys; $-(\text{CH}_2)_4\text{-NH-CO-R}_8$,
- H) Cadena lateral de ácido aminoadípico; $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-R}_8$ o $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH-R}_8$,
- 20 I) Cadena lateral de ornitina; $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-CO-R}_8$,
- J) Una cadena lateral alquilo en un aminoácido tal como Ala, Val, Leu, homoleucina, Ile, homoisoleucina, S-metil cisteína, metionina, etionina o butionina puede ser un grupo alquilo modificado mostrado en la fórmula (2) como se ha descrito anteriormente.
- 25

Además, aquí se describe un agente para aumentar la concentración de ion calcio intracelular o un agente para inducir la secreción de GH, que comprende un péptido parcial que consiste en los aminoácidos desde el extremo amino al 13º, 14º o 15º aminoácido de la secuencia aminoacídica de la SEQ ID N°: 2 ó 3. En este caso, no siempre es necesario que las unidades de aminoácidos respectivas que constituyen el péptido parcial estén modificadas químicamente, con la excepción del segundo o tercer aminoácido desde el extremo amino.

30

Además, se describe aquí el siguiente compuesto de tipo péptido.

35

Un derivado de grelina se refiere a un compuesto de tipo péptido en el que la estructura química de la grelina natural está parcialmente modificada, y grelina de cadena corta se refiere a un péptido que consiste en menos de 27 ó 28 aminoácidos, que procede de la grelina natural de 27 a 28 aminoácidos por delección de algunos de los aminoácidos. Además, un resto aminoacídico en la posición n se refiere a un resto aminoacídico en la posición n desde el extremo amino.

40

El aminoácido del extremo amino de la grelina o su derivado de grelina de cadena corta puede ser cualquier aminoácido (el aminoácido del extremo amino de la grelina natural es glicina), siempre que el grupo α -amino de dicho aminoácido no esté protegido, o puede ser un D- o L-aminoácido, pero preferiblemente es alanina, valina, ácido aminoisobutanoico o ácido butanoico.

45

El 2º resto puede ser cualquier aminoácido (por ejemplo, serina en la grelina natural), preferiblemente un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña, tal como alanina, serina, histidina, norvalina o un compuesto no aminoacídico.

El 1º y 2º restos pueden ser un δ -aminoácido correspondiente a dos aminoácidos, por ejemplo, ácido 5-aminopentanoico, ácido 5-amino-5-dimetilpentanoico, ácido 2,5-diaminopentanoico, etc., ejemplificados en los Ejemplos.

50

Los restos aminoacídicos seleccionados en la 3ª y 4ª posiciones pueden ser D- o L-aminoácidos, D- o L-N-metilaminoácidos, o una combinación de estos aminoácidos. En particular, es preferible que el aminoácido de la 3ª posición sea un L-aminoácido o los dos aminoácidos de la 3ª y 4ª posiciones sean L-aminoácidos.

55

La configuración estérica de los restos aminoacídicos seleccionados en la 3ª y 4ª posiciones puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo de la secuencia aminoacídica en la 1ª y 2ª posiciones. Es decir, los restos de la 3ª y 4ª posiciones son preferiblemente L-aminoácidos en el caso de la secuencia aminoacídica Gly-Ser en la 1ª y 2ª posiciones de la grelina natural, mientras que los restos de la 3ª y 4ª posiciones pueden ser D-aminoácidos en el caso de otra secuencia aminoacídica tal como Aib-His. Además, si los restos de la 1ª y 2ª posiciones son un δ -aminoácido (por ejemplo, ácido aminopentanoico) que tiene una longitud de 2 aminoácidos, los restos de la 3ª y 4ª posiciones pueden ser L- o D-aminoácidos.

60

Los restos aminoacídicos seleccionados en la 3ª y 4ª posiciones son preferiblemente D- o L-aminoácidos tales como leucina, valina, norleucina, homoleucina, homoisoleucina, naftil alanina y sus homólogos, triptófano, fenilalanina y ciclohexil alanina o D- o L-N-metilaminoácidos de los mismos.

65

ES 2 335 235 T3

Más preferiblemente, los restos aminoacídicos seleccionados entre los aminoácidos hidrófobos descritos anteriormente en la 3ª y 4ª posiciones son aminoácidos hidrófobos aromáticos tales como naftil alanina y sus homólogos, triptófano, fenilalanina y ciclohexil alanina.

5 Además, los restos aminoacídicos seleccionados en la 3ª y 4ª posiciones son preferiblemente aminoácidos básicos tales como lisina, arginina e histidina. Especialmente, se prefiere lisina.

La molécula de grelina es básica por estos aminoácidos básicos, mejorando adicionalmente de esta manera la actividad de liberación de Ca.

10 Los restos aminoacídicos seleccionados en la 3ª y 4ª posiciones son preferiblemente los que tienen grupos funcionales en sus cadenas laterales, que pueden modificarse con un grupo acilo (grupo alcanilo, grupo alquenilo o grupo aril alcanilo), un grupo alquilo o un grupo aralquilo, y los ejemplos preferidos de tales restos aminoacídicos incluyen serina, homoserina, treonina, cisteína, homocisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido adípico, lisina, ornitina, etc.

Los aminoácidos que tienen estas cadenas laterales reactivas pueden ser D- o L-aminoácidos o sus D- o L-N-metil aminoácidos correspondientes, pero se prefiere particularmente que el resto de la 3ª posición sea un L-aminoácido o los restos de la 3ª y 4ª posiciones sean L-aminoácidos.

20 Además, a las cadenas laterales de estos aminoácidos puede unirse un grupo acilo tal como un grupo alcanilo (el número de átomos de carbono del mismo es de 2 a 35, preferiblemente de 6 a 18, y más preferiblemente de 8 a 12), un grupo alquenilo (el número de átomos de carbono del mismo es de 2 a 35, preferiblemente de 6 a 18, y más preferiblemente de 8 a 12), un grupo aril alcanilo (grupo benzilo, fenacetilo, fenil butirilo, naftilo, naftil acetilo o naftil propionilo, etc.), un grupo alquilo (el número de átomos de carbono del mismo es de 2 a 35, preferiblemente de 6 a 18, más preferiblemente de 8 a 12), o un grupo aralquilo (grupo bencilo, fenetilo, fenil propilo, fenil butilo, fenil pentilo, naftil metilo, etc.) a través de un enlace carbamato, tiocarbamato, éster, amida, disulfuro, éter, tioéter o tioéster. Además, los grupos alquilo y aralquilo mencionados anteriormente pueden unirse de una manera distinta que a través de un enlace a los átomos de carbono α de los aminoácidos de la 3ª y 4ª posiciones.

30 La combinación de restos aminoacídicos seleccionados en la 3ª y 4ª posiciones es preferiblemente una combinación de un aminoácido que tiene una cadena lateral hidrófoba como resto aminoacídico de la 3ª posición y un aminoácido hidrófobo como resto aminoacídico de la 4ª posición.

35 El resto aminoacídico de la 3ª posición que tiene una cadena lateral hidrófoba preferiblemente es un aminoácido modificado en cuyo carbono α (a) se introdujo una cadena alquilo saturada o insaturada que contenía uno o más átomos de carbono a través o no de un grupo alquilo que contenía uno o más átomos de carbono y a través de un enlace éster, éter, tioéter, amida o disulfuro, o (b) se introdujo una cadena alquilo saturada o insaturada que contenía uno o más átomos de carbono. En particular, es más preferido un aminoácido modificado en cuyo carbono α se introdujo una cadena alquilo saturada que contenía uno o más átomos de carbono.

El grupo carboxilo del aminoácido de la 4ª posición puede ser una amida, una alquil amida (por ejemplo, metil amida o etil amida), o una aralquil amida (por ejemplo, bencil amida, adamantano amida o adamantano alquil amida).

45 Además, un grupo básico tal como un grupo amino o un grupo guanidino puede unirse al alquilo o aralquilamida. El grupo básico incluye, por ejemplo, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ y $-\text{CONHCH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$.

50 Puede añadirse un aminoácido básico tal como arginina, lisina e histidina al grupo carboxilo del aminoácido de la 4ª posición, y este aminoácido básico puede ser un D- o L-aminoácido, un racemato o un D- o L-N-metilaminoácido.

El grupo carboxilo del aminoácido puede ser un alquilo o aralquil amida como se ha descrito anteriormente. Además, puede añadirse un grupo básico tal como un grupo amino o un grupo guanidino al alquilo o aralquil amida. El grupo básico incluye los que se han ejemplificado anteriormente.

55 Como secuencia aminoacídica del aminoácido de la 5ª posición y los aminoácidos siguientes, puede añadirse al aminoácido en la 4ª posición una secuencia de cualquier longitud consistente en leucina en la 5ª posición y los aminoácidos posteriores hasta el aminoácido de la 28ª posición en grelina humana o de rata.

60 Tales secuencias aminoacídicas son preferiblemente grelina (1-5), grelina (1-6), grelina (1-7), grelina (1-8), grelina (1-9), grelina (1-10) y grelina (1-11), donde grelina (m-n) se refiere a un péptido que tiene una secuencia aminoacídica en las posiciones m a n desde el extremo amino de la grelina. En particular, se prefiere la grelina (1-5).

El extremo carboxilo del mismo es preferiblemente un alquilo o aralquil amida como se ha descrito anteriormente.

65 Además, un grupo básico tal como un grupo amino o un grupo guanidino puede unirse al alquilo o aralquil amida. El grupo básico incluye los ejemplificados anteriormente.

ES 2 335 235 T3

Además, un aminoácido básico tal como arginina, lisina e histidina puede añadirse al aminoácido del extremo carboxilo de un derivado de grelina delecionado en el extremo carboxilo en el que se añadió una secuencia aminoacídica de cualquier longitud consistente en los aminoácidos desde el aminoácido de la 5ª posición hasta el aminoácido de la 28ª posición al extremo carboxilo de la grelina (1-4).

5

Este aminoácido básico puede ser un D- o L- aminoácido, un racemato o D- o L-N-metil aminoácido.

El grupo carboxilo del aminoácido básico puede ser un alquilo o aralquil amida como se ha descrito anteriormente. Además, un grupo básico tal como un grupo amino o guanidino puede unirse al alquilo o aralquil amida. El grupo

10

básico incluye los ejemplificados anteriormente.

El aminoácido del extremo carboxilo de la grelina (1-5), grelina (1-6) y grelina (1-7) puede ser un D- o L-aminoácido o su D- o L-N-metil aminoácido correspondiente.

15

Además, pueden añadirse aminoácidos básicos tales como arginina, lisina e histidina a los restos de la 5ª, 6ª y 7ª posiciones, y estos aminoácidos básicos pueden ser D- o L-aminoácidos, racematos o D- o L-N-metil aminoácidos.

El grupo carboxilo de dicho aminoácido básico puede ser un alquilo o aralquil amida como se ha descrito anteriormente. Además, un grupo básico tal como un grupo amino o un grupo guanidino puede unirse al alquilo o aralquil amida. El grupo básico incluye los ejemplificados anteriormente.

20

En una realización preferida descrita aquí, el compuesto peptídico de la presente invención en el caso en el que el extremo carboxilo es un alquilo o aralquil amida como se ha descrito anteriormente puede ser un derivado de amida en el que un grupo amino se une adicionalmente al grupo alquilo o aralquilo. Específicamente, puede mencionarse un compuesto peptídico en el que el extremo carboxilo es, por ejemplo, aminoetil amida.

25

El compuesto de tipo péptido descrito aquí en el que el extremo carboxilo es una amida o un derivado de amida como se ha descrito anteriormente, es un compuesto útil debido a su resistencia a la descomposición por enzimas tales como carboxipeptidasas *in vivo*.

30

De forma similar, el compuesto de tipo péptido descrito aquí que incluye N-metil aminoácidos también es un compuesto útil debido a su resistencia a enzimas.

El compuesto de tipo péptido de la presente invención puede obtenerse de una manera habitual. Por ejemplo, puede aislarse a partir de una fuente natural como se ha mencionado anteriormente o puede producirse por tecnología de ADN recombinante y/o síntesis química. Además, cuando se necesita una modificación (por ejemplo, acilación) en los restos aminoacídicos, el compuesto peptídico puede someterse a una reacción de modificación por métodos bien conocidos en la técnica.

35

Específicamente, el compuesto de tipo péptido descrito aquí puede obtenerse cultivando células hospedadoras transformadas con un vector de expresión que lleva un ADN que codifica el péptido descrito aquí y después recuperando el péptido deseado a partir del cultivo.

40

Seleccionando las células hospedadoras, puede obtenerse un compuesto que tenga el péptido deseado modificado, por ejemplo, por acilación en las células. Cuando dicho péptido no está modificado, puede realizarse una reacción de modificación tal como acilación cuando sea necesario por métodos bien conocidos en la técnica. Para la reacción de acilación, también pueden usarse enzimas tales como lipasas.

45

El vector en el que se va a integrar el gen incluye, por ejemplo, vectores de *E. coli* (pBR322, pUC18, pUC19 etc.), vectores de *Bacillus subtilis* (pUB110, pTP5, pC194 etc.), vectores de levaduras (tipo YEp, tipo YRp, tipo YIp), o vectores de células animales (retrovirus, virus vaccinia etc.), pero también puede usarse cualquier otro vector capaz de mantener la estabilidad génica deseada en células hospedadoras. El vector se introduce en células hospedadoras adecuadas. Para integrar el gen deseado en un plásmido e introducir el plásmido en células hospedadoras, pueden usarse métodos descritos en Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989).

50

Para expresar el gen del péptido deseado en el plásmido anterior, un promotor se une operativamente cadena arriba de dicho gen.

55

El promotor usado aquí puede ser cualquier promotor adecuado compatible con las células hospedadoras usadas para la expresión del gen deseado. Por ejemplo, puede usarse el promotor lac, el promotor trp, el promotor lpp, el promotor λ PL, el promotor recA etc. en el género *Escherichia* como célula hospedadora a transformar; puede usarse el promotor SP01, el promotor SP02 etc. en el género *Bacillus*; puede usarse el promotor GAP, el promotor PH05, el promotor ADH etc. en levaduras; y puede usarse el promotor derivado de SV40, el promotor derivado de retrovirus etc. en células animales.

60

El vector que contiene el gen deseado obtenido de esta manera se usa para transformar células hospedadoras. Las células hospedadoras incluyen microorganismos (por ejemplo, el género *Escherichia*, el género *Bacillus* etc.), levaduras (el género *Saccharomyces*, el género *Pichia*, el género *Candida* etc.), células animales (células CHO, células COS,

65

ES 2 335 235 T3

etc.) etc. El medio para el cultivo preferiblemente es un medio líquido y, de una manera particularmente preferida, el medio contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, etc. necesaria para el crecimiento de las células transformadas a cultivar. Si se desea, pueden añadirse vitaminas, promotores del crecimiento, suero, etc.

5 Para producir directamente el péptido modificado con ácido graso, las células preferiblemente son las que tienen la actividad de una proteasa de procesamiento capaz de cortar un sitio adecuado en un polipéptido precursor de dicho péptido y la actividad de acilar el resto de serina en dicho péptido. Pueden obtenerse células hospedadoras que tengan esta actividad proteasa de procesamiento y actividad de acilación de serina transformando células hospedadoras con un vector de expresión que contiene un ADNc que codifica dicho polipéptido precursor y después seleccionando las
10 células transformadas confirmando si producen o no el péptido modificado con ácido graso que tiene una actividad de liberación de Ca o una actividad de inducción de la secreción de GH.

Después del cultivo, el péptido descrito aquí se separa y se purifica del cultivo de la manera habitual. Para extraer el producto deseado de los microorganismos o las células cultivadas, por ejemplo, se recogen los microorganismos
15 o las células después del cultivo y se suspenden en un tampón que contiene un desnaturalizante de proteínas (por ejemplo, hidrocloreuro de guanidina) y los microorganismos o las células se rompen por sonicación etc. y después se centrifugan. Para purificar el producto deseado del sobrenadante, pueden combinarse convenientemente métodos de separación y purificación tales como exclusión molecular, ultrafiltración, diálisis, SDS-PAGE y diversas técnicas cromatográficas teniendo en cuenta el peso molecular, solubilidad, carga (punto isoeléctrico), afinidad, etc. del producto
20 deseado.

El compuesto peptídico descrito aquí puede sintetizarse químicamente de una manera habitual. Por ejemplo, aminoácidos que tienen grupos protectores se condensan por un método en fase líquida y/o un método en fase sólida para extender la cadena peptídica, después se retiran todos los grupos protectores de dichos aminoácidos por un ácido,
25 y el producto bruto resultante se purifica por las técnicas de purificación anteriores para dar el compuesto peptídico deseado. Un resto aminoácido en el sitio deseado puede acilarse selectivamente por una acilasa o acil transferasa.

Se han establecido bien varios métodos para la producción de péptidos, y el compuesto de tipo péptido descrito aquí también puede producirse fácilmente por estos métodos conocidos. Por ejemplo, el compuesto de tipo péptido
30 puede sintetizarse por el método clásico de síntesis de péptidos o por el método en fase sólida.

En lo sucesivo, se describe un proceso para producir el compuesto peptídico descrito aquí por una combinación de tecnología de ADN recombinante y síntesis química haciendo referencia a los ejemplos.

35 Se sintetizan químicamente ésteres activos de péptidos amino-terminales, por ejemplo, (1) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Osu, (2) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Osu, y (3) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-Osu, y después se unen a péptidos carboxilo-terminales producidos por tecnología de ADN recombinante, es decir, (4) FLSPEHQRVQQ RKESKKPPAKLQPR, (5) LSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR, y (6) SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR, respectivamente; es decir, (1) se une a (4), (2) a (5), y (3) a (6), con lo que se obtienen respectivamente compuestos peptídicos que consisten, cada uno, en 28 aminoácidos. Específicamente, XXXXZSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR se expresa en *E. coli* seguido de protección sus grupos amino con Boc₂(O) para dar Boc-XXXXZSPEHQRVQQRK(Boc) ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR. Después, el péptido resultante se convierte en NH₂-SPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR por escisión con una enzima selectiva por el extremo carboxilo del aminoácido Z. Este compuesto se mezcla con Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-Osu en una solución acuosa de neutra a débilmente alcalina, y el BocGlySer(Bu)Ser(R10)FLSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR resultante se trata
45 con ácido trifluoroacético, con lo que puede obtenerse el producto deseado.

La notación de una letra anterior de los aminoácidos está de acuerdo con la descripción en Cellular Molecular Biology, 3ª edición, publicada el 10 de diciembre de 1997 por Newton Press Co., Ltd.
50

Además, Boc representa t-butiloxicarbonilo, Osu representa un resto derivado de N-hidroxisuccinimida por la eliminación de hidrógeno del grupo hidroxilo, Bu representa un grupo butilo y R10 representa el grupo sustituyente del aminoácido modificado de acuerdo con la presente invención.

55 Las sales del compuesto de tipo péptido descrito aquí preferiblemente son sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, sales con bases inorgánicas, sales con bases orgánicas, sales con ácidos inorgánicos, sales con ácidos orgánicos y sales como aminoácidos básicos o ácidos.

Los ejemplos preferidos de las sales con bases inorgánicas incluyen sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, sales de potasio, etc.; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio, sales de magnesio, etc.; y sales de aluminio, sales de amonio, etc.
60

Los ejemplos preferidos de las sales con bases orgánicas incluyen sales con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, dicitclohexil amina, N,N'-dibenciletilendiamina, etc.
65

Los ejemplos preferidos de las sales con ácidos inorgánicos incluyen sales con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc.

ES 2 335 235 T3

Los ejemplos preferidos de las sales con ácidos orgánicos incluyen sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, etc.

- 5 Los ejemplos preferidos de las sales con aminoácidos básicos incluyen sales con arginina, lisina, ornitina, etc., y los ejemplos adecuados de las sales con aminoácidos ácidos incluyen sales con ácido aspártico, ácido glutámico, etc.

Entre estas sales, las más preferidas son las sales de sodio y las sales de potasio.

- 10 El compuesto de tipo péptido descrito aquí o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo presentan baja toxicidad y tienen una acción de inducción de la secreción de GH, y pueden administrarse como tales o después de mezclarse con soportes, excipientes o vehículos potenciadores farmacéuticamente aceptables conocidos etc., a un mamífero (por ejemplo, un ser humano, ratón, rata, conejo, perro, gato, oveja, caballo, cerdo, mono, etc.). En el caso de la inyección intravenosa en un adulto, la dosis diaria es de 0,01 a 5 mg/kg, preferiblemente de 0,04 a 1,5 mg/kg.
- 15 Esta dosis se administra deseablemente de una a tres veces al día. El compuesto de tipo péptido descrito aquí se mezcla con vehículos farmacéuticamente aceptables y puede administrarse por vía oral o parenteral en forma de preparaciones farmacéuticas sólidas tales como comprimidos, cápsulas, granulados, polvos, etc., o como preparaciones farmacéuticas líquidas tales como jarabes, inyecciones, etc.

- 20 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen una gran diversidad de vehículos orgánicos o inorgánicos que se usan habitualmente como materiales farmacéuticos, y éstos se componen como vehículos, lubricantes, aglutinantes o disgregantes en preparaciones farmacéuticas sólidas o como disolventes, adyuvantes, agentes de suspensión, agentes para conferir isotonicidad, tampones y agentes suavizantes en preparaciones farmacéuticas líquidas.

- 25 Cuando sea necesario, también pueden usarse aditivos farmacéuticos tales como conservantes, antioxidantes, agentes colorantes, edulcorantes, etc.

- Los ejemplos preferidos de los vehículos incluyen, por ejemplo, lactosa, azúcar blanca, D-manitol, almidón, celulosa cristalina, ácido silícico anhidro ligero, etc. Los ejemplos preferidos de los lubricantes incluyen estearato de magnesio, estearato cálcico, talco, sílice coloidal, etc.
- 30

Los ejemplos preferidos de los aglutinantes incluyen celulosa cristalina, azúcar blanca, D-manitol, dextrina, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, polivinil pirrolidona etc.

- 35 Los ejemplos preferidos del disgregante incluyen almidón, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa cálcica, croscalomelosa sódica, carboximetil almidón sódico etc.

Los ejemplos preferidos de los disolventes incluyen agua para inyección, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz, etc.

40

Los ejemplos preferidos de los solubilizantes incluyen polietilenglicol, propilenglicol, D-manitol, benzoato de bencilo, etanol, trisaminometano, colesterol, trietanolamina, carbonato sódico, citrato sódico etc.

- 45 Los ejemplos preferidos del agente de suspensión incluyen tensioactivos tales como estearil trietanolamina, lauril sulfato sódico, ácido lauril aminopropiónico, lecitina, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y monoestearato de glicerina, y polímeros hidrófilos tales como alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, carboximetil celulosa sódica, metil celulosa, hidroximetil celulosa, hidroxietil celulosa e hidroxipropil celulosa.

- 50 Los ejemplos preferidos de los agentes que confieren isotonicidad incluyen cloruro sódico, glicerina, D-manitol etc.

Los ejemplos preferidos de los tampones incluyen soluciones tampón tales como fosfatos, acetatos, carbonatos, citratos etc.

- 55 Los ejemplos preferidos de los agentes calmantes incluyen alcohol bencílico, etc.

Los ejemplos preferidos de los conservantes incluyen p-oxiesterbenzoatos, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenílico, ácido deshidroacético, ácido sórbico etc.

- 60 Los ejemplos preferidos de los antioxidantes incluyen sulfitos, ácido ascórbico, etc.

La composición farmacéutica anterior produce un efecto aproximadamente igual o superior al efecto de la GH tras la administración y puede reducir varios efectos secundarios producidos por la administración de GH.

- 65 Como enfermedades atribuibles a la deficiencia o reducción de los niveles de GH, las enfermedades a las que puede aplicarse la composición farmacéutica o los efectos de la composición farmacéutica incluyen, pero sin limitación, activación de osteoblastos y reconstitución del hueso en personas con enanismo y seres humanos normales, aumento de la fuerza muscular y cantidad muscular en adultos con deficiencia de GH, mejora de la motilidad en adultos con

ES 2 335 235 T3

deficiencia de GH, curación de quemaduras graves en niños, su uso combinado con gonadotropinas en la inducción de la ovulación, prevención de anomalías en el metabolismo de proteínas por medio de la administración de prednisona, promoción de la “educación” de las células T en trastornos inmunes graves, el efecto de inhibir la reducción del peso corporal en individuos de edad avanzada y el efecto de aumentar el tejido adiposo y prevenir la atrofia dérmica.

5 Además, las enfermedades o efectos no correlacionados directamente con la deficiencia o reducción de los niveles de GH incluyen, por ejemplo, el efecto de aumentar el flujo pulsátil como se muestra en el Ejemplo 7, y de esta manera es eficaz para el tratamiento de enfermedades cardíacas tales como insuficiencia cardíaca, etc.

10 El efecto de la composición farmacéutica no se restringe a seres humanos. Es decir, tiene un efecto sobre la promoción del crecimiento para animales, la reducción de grasa en carne, etc., que es igual o mayor que el de la GH administrada.

15 Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 13, la composición farmacéutica de la presente invención presenta una acción de promoción del apetito tras la administración en el ventrículo o la administración intravenosa, de manera que puede usarse como promotor del apetito para tratar la anorexia o sitofobia.

20 Además, como se muestra en el Ejemplo 14, la composición farmacéutica descrita aquí tiene una acción promotora de la motilidad del estómago y de la secreción de ácido gástrico, y de esta manera también puede usarse como agente para tratar enfermedades funcionales del estómago tales como dispepsia sin diátesis, atonía del estómago ligera súbita, dispepsia funcional y esofagitis de reflujo.

25 Además, como se muestra, por ejemplo, en el Ejemplo 15, la composición farmacéutica descrita aquí presenta una acción promotora del crecimiento celular en médula ósea, duodeno y yeyuno por medio de administración intravenosa y, de esta manera, puede usarse como agente para proteger la túnica mucosa del intestino delgado, un agente para prevenir lesiones en la túnica mucosa del intestino delgado durante la nutrición intravenosa y un agente para tratar la osteoporosis.

30 Además, la composición farmacéutica descrita anteriormente tiene un efecto para tratar las enfermedades o para mejorar las situaciones físicas descritas más adelante.

35 Por ejemplo, puede usarse para el tratamiento estimulador para liberar hormonas del crecimiento en ancianos, la prevención de efectos secundarios catabólicos sobre los niveles de azúcar de los corticoides, la prevención y tratamiento de la osteoporosis, la estimulación del sistema inmune, la promoción de curación de lesiones, la promoción de reparación de huesos rotos, el tratamiento del retraso del crecimiento, el tratamiento de la insuficiencia renal o la insuficiencia funcional atribuible a un retraso del crecimiento, el tratamiento de estados de insuficiencia correlacionados con estados de insuficiencia fisiológica incluyendo niños con deficiencia de hormonas del crecimiento y enfermedades crónicas, el tratamiento de la obesidad y el retraso del crecimiento correlacionado con la obesidad, el tratamiento del retraso del crecimiento correlacionado con el síndrome Plauda-Villi y el síndrome de Taner, la promoción de la recuperación de pacientes con quemaduras y la reducción en la hospitalización, el tratamiento del retraso del crecimiento intrauterino, malformaciones esqueléticas, enfermedad por exceso de corticoides y síndrome de Cushing, la inducción de la liberación de hormona del crecimiento pulsátil, el reemplazo de hormona del crecimiento en pacientes con estrés, malformación del cartílago, síndrome de Noonan, esquizofrenia, depresión, enfermedad de Alzheimer, curación del retraso de la reparación de lesiones y privación psicosocial, el tratamiento de la insuficiencia pulmonar y dependencia de órganos respiratorios, reducción de la reacción catabólica de proteínas después una operación mayor, reducción de pérdida de proteínas y caquexia producida por enfermedades crónicas tales como cáncer y SIDA, el tratamiento de hiperinsulinemia incluyendo nesidioblastosis de páncreas, terapia coadyuvante para la inducción de la ovulación, y tratamiento de pacientes con represión inmune, mejora de la fuerza y motilidad muscular, mantenimiento del espesor de la piel en ancianos, homeostasis metabólica y renal, estimulación de osteoblastos, formación de hueso nuevo y estimulación del crecimiento del cartílago, y para estimular el crecimiento del timo y prevenir el deterioro en funciones tímicas que acompañan al envejecimiento.

55 Además, también se pueden esperar los siguientes efectos en animales. Por ejemplo, se menciona un aumento en la velocidad de crecimiento del animal, un aumento en la producción de leche y piel en animales, estimulación del sistema inmune en animales domésticos, tratamiento de enfermedades producidas por una edad avanzada en animales domésticos, promoción del crecimiento de animales domésticos y un aumento de la lana en ovejas.

60 Un anticuerpo cuyo antígeno es un péptido modificado con ácido graso descrito aquí que tiene actividad de liberación de Ca o actividad inductora de la secreción de GH puede obtenerse por un método conocido en la técnica. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, y puede obtenerse por un método conocido en la técnica. Además, un método para medir el péptido modificado con ácido graso usando dicho anticuerpo y un kit de medición usando dicho método de medición, también pueden hacer uso de un método conocido en la técnica.

65 Como se describe en el Ejemplo 17, se preparan respectivamente anticuerpos contra péptidos amino- y carboxilo-terminales de la grelina, y como el primero reconoce la serina modificada con ácido graso en la 3ª posición, los dos anticuerpos pueden usarse para separar y cuantificar la grelina modificada con un ácido graso y la grelina de la que se eliminó el ácido graso.

ES 2 335 235 T3

Los anticuerpos contra péptidos amino- y carboxilo-terminales de la grelina pueden obtenerse de un método conocido, y pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales.

En el caso del presente compuesto de tipo péptido que tiene un aminoácido modificado en la 3ª posición desde el extremo amino o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, también puede producirse de la misma manera un anticuerpo que reconoce específicamente una cadena lateral del 3^{er} resto aminoacídico (preferiblemente un ácido graso) y se une a un péptido parcial amino-terminal del compuesto de tipo péptido. Además, en el caso del compuesto de tipo péptido descrito aquí o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, también puede producirse de la misma manera un anticuerpo que se une específicamente al péptido que tiene un aminoácido modificado.

También se describe aquí un kit de examen que comprende una combinación de un anticuerpo que reconoce específicamente una cadena lateral del aminoácido modificado y un anticuerpo que reconoce aminoácidos (o un péptido), excluyendo el aminoácido modificado y/o un compuesto no aminoacídico, preferiblemente un anticuerpo contra un péptido parcial carboxilo-terminal del compuesto de tipo péptido o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha descrito anteriormente.

Se describe aquí un método de ensayo en el que el compuesto de tipo péptido que tiene un aminoácido modificado, preferiblemente un aminoácido acilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el compuesto de tipo péptido que no contiene un aminoácido modificado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se separan y detectan mediante el uso de dicho kit de examen.

En lo sucesivo, el método de ensayo y el kit de examen descritos anteriormente se describen haciendo referencia a sus realizaciones que, sin embargo, no pretenden limitar la presente invención.

Es decir, el método de ensayo incluye, por ejemplo, (i) un método para cuantificar el compuesto de tipo péptido etc. de la presente invención en una solución de ensayo, que comprende permitir que un material de ensayo en una solución de ensayo y el compuesto de tipo péptido etc. de la presente invención marcado reaccionen competitivamente con un anticuerpo contra el compuesto de tipo péptido etc. de la presente invención, y después determinar la relación del compuesto de tipo péptido etc. de la presente invención marcado unido a dicho anticuerpo, y (ii) un método para cuantificar las proteínas etc. de la presente invención en una solución de ensayo, que comprende permitir que una solución de ensayo reaccione con el anticuerpo descrito aquí insolubilizado en un vehículo y otro anticuerpo marcado descrito aquí simultánea o sucesivamente y después medir la actividad del agente marcador en el vehículo de insolubilización y/o la actividad del agente marcador no capturado en el vehículo de insolubilización. En los métodos de cuantificación (i) y (ii), es preferible que un anticuerpo sea un anticuerpo que reconoce una región amino-terminal de la proteína etc. que se describe aquí, mientras que el otro anticuerpo es un anticuerpo que reacciona con una región carboxilo-terminal de la proteína etc. que se describe aquí.

En el método de ensayo del compuesto de tipo péptido etc. que se describe aquí, el anticuerpo monoclonal contra dicho compuesto (también denominado en lo sucesivo anticuerpo anti-proteína) puede usarse no sólo para cuantificar la proteína etc. que se describe aquí, sino también para detectarla por tinción de tejidos, etc.

Para estos fines, puede usarse la propia molécula de anticuerpo o una fracción F(ab')₂, Fab' o Fab de la molécula de anticuerpo.

El método para cuantificar el compuesto de tipo péptido etc. que se describe aquí mediante el uso de dicho anticuerpo no se limita particularmente siempre que el método comprenda detectar la cantidad del anticuerpo correspondiente a la cantidad del antígeno (por ejemplo, la cantidad de la proteína), el antígeno o un conjugado de antígeno-anticuerpo en una solución de ensayo, por medios químicos o físicos, y calcularla basándose en una curva patrón preparada usando soluciones patrón que contienen cantidades conocidas del antígeno. Por ejemplo, preferiblemente se usan nefelometría, el método competitivo, el método inmunométrico y el método de tipo sándwich, pero se prefiere particularmente el método de tipo sándwich descrito más adelante con respecto a la sensibilidad y especificidad.

En relación con el método de medición usando un marcador en el método de ensayo que se describe aquí, el marcador incluye, por ejemplo, un radioisótopo, una enzima, un material fluorescente y un material luminiscente.

El radioisótopo incluye, por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³H, ¹⁴C etc.

La enzima preferiblemente es una enzima estable con alta actividad específica, que incluye, por ejemplo, β-galactosidasa, β-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa.

El material fluorescente incluye, por ejemplo, fluorescamina e isocianato de fluoresceína.

El material luminiscente incluye, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina y lucigenina.

Además, para unir el marcador al anticuerpo o antígeno puede usarse un sistema de biotina-avidina.

ES 2 335 235 T3

En lo sucesivo, la presente invención se describe con más detalle haciendo referencia a los ejemplos. A menos que se especifique otra cosa, los medios de manipulación genética estaban de acuerdo con Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989).

5 Ejemplo 1

Creación de una cepa celular que expresa GHS-R y medición de la actividad de liberación de Ca

10 Para ensayar un aumento en la concentración de ion calcio intracelular (actividad de liberación de Ca) que se produce tras la unión de un secretagogo de GH (GHS) al receptor de GHS (GHS-R), se creó una cepa celular que expresaba GHS-R de rata de la siguiente manera. Se obtuvo un ADNc de longitud completa de GHS-R de rata por RT-FCR (transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa) donde se usó como plantilla un ADNc derivado de cerebro de rata. A partir de la secuencia de nucleótidos del GHS-R de rata conocido [K. K. Mckee, *et al.*, Molecular Endocrinology 11, 415-423 (1997)], se sintetizaron cebadores con sentido y antisentido consistentes en las siguientes secuencias de nucleótidos.

Cebador con sentido: 5'-ATGTGGAACGCGACCCCCAGCGA-3'

20 Cebador antisentido: 5'-ACCCCCAATTGTTTCCAGACCCAT-3'

El ADNc amplificado se unió al vector pcDNAIII (Invitrogen) para construir el vector de expresión GHSR-pcDNAIII. Se transformaron células CHO por medio del vector de expresión y se seleccionaron las células transformadas que expresaban de manera estable GHS-R en un medio que contenía 1 $\mu\text{g/ml}$ de G418. La cepa de células seleccionada CHO-GHSR62 respondía a GHRP-6 (hexapéptido de liberación de hormona del crecimiento) 10^{-10} a 10^{-9} M. Se midió el cambio en la concentración de ion calcio intracelular (actividad de liberación de Ca) por un sistema FLIPR (Molecular Device). Antes de esta medición, se pusieron 4×10^4 células CHO-GHSR62 en una microplaca de 96 pocillos con pocillos negros (Corning Co., Ltd) y se cultivaron durante 12 a 15 horas. Después, las células se incubaron con una concentración $4 \mu\text{M}$ de colorante fluorescente Fluo4 (Molecular Probe Co., Ltd) durante 1 hora y se lavaron cuatro veces con BSS de Hank (Solución Salina Equilibrada de Hank) que contenía Hepes ([N-2-hidroxietil]-piperazina-N-[ácido 2-etanosulfónico]) 20 mM y probenecid 2,5 mM, y se ensayó la actividad de liberación de Ca añadiendo una muestra y midiendo un cambio en la fluorescencia.

35 Ejemplo 2

Purificación de un péptido inductor de la secreción de GH endógena

Usando las células CHO-GHSR62 descritas en el Ejemplo 1, se examinaron una gran diversidad de tejidos y órganos procedentes de rata para comprobar su actividad de liberación de Ca, y como resultado, se descubrió que un extracto peptídico derivado de estómago de rata tiene una fuerte actividad de liberación de Ca incluso en una pequeña cantidad de 0,5 mg. Por consiguiente, se purificó un péptido que tenía la actividad de liberación de Ca a partir de extracto de estómago de rata por varios tipos de cromatografía.

45 Se hirvieron 40 g de estómago de rata fresco durante 5 minutos en agua en ebullición 5 veces para inactivar las proteasas presentes. Después de enfriarse, la muestra hervida se puso en AcOH 1 M-HCl 20 mM, seguido de extracción del péptido por un mezclador Polytron. El extracto se centrifugó a 11.000 rpm durante 30 min, y el sobrenadante se concentró en aproximadamente 40 ml en un evaporador. El concentrado se precipitó con acetona añadiendo acetona a una concentración de 66%, y después de retirar los precipitados formados, se evaporó la acetona en el sobrenadante. El sobrenadante se aplicó a un cartucho de 10 g Sep-Pak C18 (Waters Co., Ltd) previamente equilibrado con TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1%, se lavó con CH_3CN al 10%/TFA al 0,1% y después se eluyó con CH_3CN al 60%/TFA al 0,1%. Después de evaporar el disolvente del eluato, la muestra se liofilizó. La muestra liofilizada se disolvió en AcOH 1 M y se absorbió en SP-Sephadex C-25 (tipo H^+) previamente equilibrada con AcOH 1 M. La muestra se eluyó por etapas con AcOH 1 M, después con piridina 2 M, y finalmente con piridina 2 M-AcOH (pH 5,0), con lo que se obtuvieron, respectivamente, 3 fracciones, es decir, SP-I, SP-II y SP-III. La fracción SP-III se aplicó a una columna de exclusión molecular Sephadex G-50, y se ensayó una alcuota de cada fracción con respecto a la actividad de liberación de Ca mediante el uso de las células CHO-GHSR62. En la Fig. 1a se muestra un perfil de cromatografía en columna en Sephadex G-50, y las fracciones activas (fracciones 43 a 48 en Fig. 1a) que tenían pesos moleculares de aproximadamente 3.000 se fraccionaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por intercambio iónico CM en una columna TSK CM-2SW (4,6 x 250 mm, Tosoh Corp.) a pH 6,4. Las fracciones activas por CM-HPLC se fraccionaron secundariamente por CM-HPLC en la misma columna a pH 4,8 (Fig. 1b). Las fracciones activas (tiempo de elución de 55 a 56 minutos en la Fig. 1b) se purificaron hasta la homogeneidad por HPLC de fase inversa en una columna $\mu\text{Bondasphere C-18}$ (3,9 x 150 mm, Waters Co., Ltd). A partir de 40 g de estómago de rata, se purificaron 16 μg de péptido que tenía actividad de liberación de Ca y este péptido se denominó grelina.

65

ES 2 335 235 T3

Ejemplo 3

Análisis estructural de grelina

5 La secuencia aminoacídica de la grelina derivada de rata se determinó por medio de un secuenciador de péptidos (ABI 494, Applied Biosystems Co., Ltd). La grelina era un péptido compuesto por 28 restos aminoacídicos consistente en la siguiente secuencia: 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, donde Xaa es un aminoácido no identificado. Basándose en la secuencia de nucleótidos del ADNc de rata, se estimó que Xaa era Ser, indicando una cierta modificación en Ser en el péptido.

10 Por consiguiente, se sintetizó químicamente grelina no modificada en la serina en la 3ª posición desde el extremo amino por un sintetizador de péptidos (ABI 433A, Applied Biosystems Co., Ltd). Como el tiempo de elución de la grelina sintética no modificada en HPLC de fase inversa era significativamente diferente del de la grelina natural (Fig. 2a), se descubrió que la grelina sintética no modificada era significativamente más hidrófila que la grelina natural.

15 A partir de los resultados anteriores se descubrió que, en la grelina natural, la serina en la 3ª posición desde el extremo amino (3ª serina) se había modificado con un resto hidrófobo.

20 Para revelar el grupo de modificación en la 3ª serina, la grelina purificada se analizó por espectrometría de masas de ionización de electronebulización (ESI-MS). El peso molecular encontrado ($3314,9 \pm 0,7$) de la grelina natural fue mayor en aproximadamente 126 que el peso molecular (3188,5) del péptido de grelina no modificada, que se estimó a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc. A partir del resultado anterior, se descubrió que el grupo hidroxilo de la 3ª serina de la grelina natural se ha modificado con ácido graso n-octanoílo (C8 : 0).

25 Para confirmar esto, se sintetizó químicamente el péptido de n-octanoil (C8 : 0) grelina y se examinó su tiempo de elución en HPLC de fase inversa. En la síntesis química del n-octanoil (C8 : 0) péptido, se sintetizó el péptido en el que todos los grupos funcionales excepto el grupo hidroxilo de la 3ª serina estaban protegidos por el método en fase sólida Fmoc usando un sintetizador de péptidos (ABI 433A, Applied Biosystems Co., Ltd), y después se obtuvo el péptido deseado por acilación del grupo hidroxilo de la 3ª serina con ácido n-octanoico y etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida en presencia de 4-(dimetilamino)piridina. El n-octanoil péptido sintético indicó el mismo tiempo de elución que la grelina natural purificada (Fig. 2a). Además, el n-octanoil péptido sintético y un fragmento peptídico en las posiciones 1 a 4 desde el extremo amino (Gly 1 - Phe 4) que se obtuvo por tratamiento de la grelina natural con quimotripsina mostró el mismo tiempo de retención en HPLC de fase inversa.

35 A partir del resultado anterior, se concluyó que la grelina natural derivada de rata tiene la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 2, donde el grupo hidroxilo de la 3ª serina se ha acilado con ácido n-octanoico (ácido caprílico) (Fig. 2c).

40 Además, se purificó grelina humana a partir de extracto de estómago humano y se descubrió que su estructura tiene la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 3, donde el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la 3ª serina se ha acilado con ácido n-octanoico (ácido caprílico) (Fig. 4a).

45 Las estructuras de las grelinas derivadas de rata y humano se determinaron usando las purificadas como fracciones de primer pico (tiempo de elución de 55 a 56 minutos) de las fracciones activas de la Fig. 1b, y después de la purificación, también se analizó la estructura de las otras fracciones activas de la Fig. 1b de la misma manera, indicando la presencia no sólo de ácido caprílico (C8 : 0), sino también de su ácido monoeno (C8 : 1), ácido cáprico (C10 : 0) y su ácido monoeno (C10 : 1), y ácido láurico (C12 : 0) y su ácido monoeno (C12 : 1) como ácido graso de modificación en la 3ª serina.

50 Además, se purificaron grelinas de pollo, anguila y rana a partir de extractos de estómago de la misma manera que en el Ejemplo 2 y se analizaron sus estructuras de la misma manera que en el Ejemplo 3. Se descubrió que la grelina de pollo tenía la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID N°: 25, la grelina de anguila tenía la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID N°: 26, y la grelina de rana tenía la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID N°: 27, y en todas las grelinas, el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la 3ª serina se había acilado con ácido n-octanoico (ácido caprílico).

55 Además, se purificaron grelinas de rana (*Xenopus laevis*), pez (trucha arco iris) y perro a partir de extractos de estómago de la misma manera que en el Ejemplo 2 y se analizaron sus estructuras de la misma manera que en el Ejemplo 3.

60 Se descubrió que la grelina de rana tenía la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID N°: 28, la grelina de trucha arco iris tenía la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID N°: 29 y 30, y la grelina de perro tenía la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID N°: 31, y en todas las grelinas, el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la 3ª serina o treonina se ha acilado con ácido n-octanoico (ácido caprílico).

65 A partir de la trucha arco iris, se obtuvieron la grelina-23 que consiste en 23 restos aminoacídicos mostrados en la SEQ ID N°: 29 y la grelina-20 que consiste en 20 restos aminoacídicos mostrados en la SEQ ID N°: 30.

Ejemplo 4

Actividad de liberación de Ca de la grelina

5 La grelina natural y la grelina sintética modificada con n-octanoilo tenían actividad de liberación de Ca, pero la grelina sintética no modificada no mostraba una actividad de liberación de Ca significativa (Fig. 2b). Además, como el ácido n-octanoico o una mezcla de ácido n-octanoico y la grelina sintética no modificada no mostraba una actividad de liberación de Ca significativa, se descubrió que el resto de ácido n-octanoico de la grelina natural constituye una estructura importante para la actividad de liberación de Ca. En lo sucesivo, grelina se refiere a [O-n-octanoil-serina 3]-grelina (Fig. 2c).

10 En células CHO-GHSR62, la grelina presentó una mayor actividad de aumento de la concentración de ion calcio intracelular (actividad de liberación de Ca) que la conseguida por GHRP-6, mientras que la GHRH (hormona de liberación de GH, expresada como GRF en la Fig. 3a) no presentó la actividad de liberación de Ca (Fig. 3b). La actividad de liberación de Ca de la grelina se reconoció a una concentración de 10^{-11} M o mayor, y su valor de CE_{50} fue de 2,5 nM. La actividad de liberación de Ca de la grelina se inhibió en presencia de un antagonista específico a una concentración 10^{-4} M ([D-Lys 3]-GHRP-6) para GHS-R [R.G. Smith, *et al.* Science 260, 1640-1643 (1993)], y la actividad de liberación de Ca se restauró a una alta concentración de grelina en ausencia del antagonista (Fig. 3b). El resultado anterior indica que la actividad de liberación de Ca de la grelina se inhibe de manera antagonista por el antagonista específico para GHS-R.

Ejemplo 5

Un ADNc para un precursor de grelina y su expresión en diversos órganos

25 La secuencia aminoacídica de la grelina no tenía ninguna homología con las secuencias aminoacídicas de ningún péptido conocido, pero como resultado del examen de homología en la base de datos del GenBank, se encontró la misma secuencia en una secuencia EST (etiqueta de secuencia expresada) de rata (Nº de aceptación del GenBank. A1549172). Basándose en esta secuencia EST, se sintetizaron los siguientes cebadores de PCR:

Cebador con sentido: 5'-TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA-3'

Cebador antisentido: 5'-AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT-3'

35 Estos dos cebadores se usaron en RT-PCR, donde como plantilla se usó ADNc derivado de estómago de rata. Las condiciones de PCR utilizaron 35 ciclos consistiendo cada uno en 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. El fragmento de ADN amplificado se usó como sonda para la selección de una biblioteca de ADNc de estómago de rata. Realizando la selección en aproximadamente 2×10^5 fagos recombinantes, se obtuvo un ADNc de longitud completa que codificaba la grelina derivada de rata.

45 El ADNc de grelina de rata estaba compuesto por 501 bases mostradas en la SEQ ID Nº: 6, que codificaban un precursor de grelina (prepro-grelina) consistente en 117 aminoácidos (Fig. 4a). Los 23 restos aminoacídicos amino-terminales del precursor de grelina tenían propiedades similares a las de un péptido señal. La grelina empieza a partir de la glicina 24, y los dos últimos aminoácidos (Pro-Arg) en la grelina madura formaban una secuencia que experimentó escisión con una proteasa.

50 Usando el ADNc de grelina de rata, se seleccionó una biblioteca de ADNc de estómago humano en condiciones de baja rigurosidad para obtener un ADNc de grelina humana de longitud completa. La biblioteca de ADNc de estómago humano se preparó a partir de poli(A)⁺ARN gástrico humano (Clontech Co., Ltd) por medio del uso de un kit de síntesis de ADNc (Pharmacia Co., Ltd). El ADNc de grelina humana de longitud completa obtenido de esta manera estaba compuesto por 511 bases mostradas en la SEQ ID Nº: 7, que codificaban un precursor de grelina humana (prepro-grelina) consistente en 117 aminoácidos (Fig. 4a). La homología a nivel de la secuencia aminoacídica entre los precursores de grelina derivados de rata y de humano fue de 82,9%, revelando que las grelinas están muy conservadas entre especies.

60 Para conocer la distribución de la grelina en los tejidos, se analizó el poli(A)⁺ARN aislado de diversos tejidos de rata (Fig. 4b). Por análisis de transferencia de Northern de los tejidos de rata, se reconoció el ARNm precursor de grelina de 0,62 kb en estómago. También se reconocieron en ventrículo dos bandas débiles, y éstas eran de ARNm de 6,2 kb y 1,2 kb, que eran mayores que el ARNm de estómago, sugiriendo de esta manera diferentes empalmes de ARNm del existente en estómago. Por los resultados anteriores, se descubrió que un sitio de expresión importante para la grelina es el estómago.

65

Ejemplo 6

Efecto de la grelina sobre la secreción de hormonas de la pituitaria

5 Se examinó *in vitro* e *in vivo* si la grelina tiene actividad inductora de la secreción de GH o no. En primer lugar, se examinó el efecto de la grelina sobre células cultivadas primarias de la pituitaria anterior para un ensayo *in vitro*. Se recogieron pituitarias anteriores a partir de ratas SD macho de cuatro semanas de edad y se dispersaron por tratamiento con colagenasa, y las células se recogieron, se lavaron dos veces con medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) que contenía FCS (suero bovino fetal) al 10% y un antibiótico, y se suspendieron en medio DMEM para
10 preparar las células cultivadas primarias de la pituitaria anterior. Las 5×10^4 células se inocularon en una placa de cultivo de células de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina, y se cultivaron durante 3 a 4 días. El medio de cultivo se cambió por medio DMEM que contenía 0,1 ml de muestra y se mantuvo a 37°C durante 15 minutos. Se recogió una alícuota del medio de cultivo y se midió por radioinmunoensayo para determinar las concentraciones de diversas hormonas de la pituitaria en el medio de cultivo. Entre las hormonas de la pituitaria se midieron GH, FSH, LH, PRL
15 y TSH usando un kit producido por Biotrak/Amersham Co., Ltd, y la ACTH se midió usando un kit de EIA de alta sensibilidad producido por Peninsula Laboratories.

Cuando se añadió grelina a células cultivadas primarias de la pituitaria anterior, se reconoció un aumento en la concentración de ion calcio intracelular, mientras que la grelina sintética no modificada también mostró una actividad de liberación de Ca ligeramente aumentada (Fig. 5a). Este resultado indica que tanto la grelina como la grelina no modificada actúan directamente sobre células de la pituitaria. Después, se examinó la actividad inductora de la secreción de GH de la grelina usando las células cultivadas primarias de la pituitaria anterior, y por medio de la adición de grelina 10^{-6} M, la concentración de GH en el cultivo aumentó dependiendo de la concentración, pero no se observó ningún aumento en las concentraciones de otras hormonas de la pituitaria (FSH, LH, PRL, TSH) (Fig. 5b).
25

La actividad inductora de la secreción de GH de la grelina se examinó *in vivo*. Después de inyectar 10 µg de grelina sintética por vía intravenosa en una rata macho (250 g), se recogió sangre periódicamente durante hasta 60 minutos para medir la concentración de hormonas de la pituitaria en plasma por radioinmunoensayo. Entre las hormonas de la pituitaria sólo se liberó GH en la sangre y alcanzó el nivel máximo en un periodo de 5 a 10 minutos después de
30 la inyección intravenosa de grelina. A partir de este resultado, se descubrió que la grelina liberada desde el estómago a la sangre actúa sobre células de la pituitaria anterior y libera GH en la sangre, y se confirmó que la grelina es una sustancia inductora de la secreción de GH endógena específica no identificada.

35 Ejemplo 7

Aumento del rendimiento cardiaco en rata

Se examinó el efecto de la administración aguda de grelina sobre el sistema cardiovascular en una rata anestesiada.
40 Se dividieron ratas Wistar macho (Carerrie) que pesaban cada una de 220 a 250 g, aleatoriamente, en 4 grupos (como grupos que recibieron 10, 1, 0,5, y 0,2 µg de grelina respectivamente) para examinar el efecto de la administración aguda de grelina sobre el sistema cardiovascular. La grelina se diluyó con solución fisiológica salina y después se preparó una dosis de 10, 1, 0,5 ó 0,2 µg/rata, y se administraron rápidamente 120 µl a través de un tubo de inyección (PE50) que se había insertado en la vena yugular común derecha para medir el rendimiento cardiaco.

45 Como indicador dinámico, se midieron la presión sanguínea sistémica y el rendimiento cardiaco, y se calculó la resistencia vascular periférica. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital y se fijaron en posición dorsal. Para medir la presión sanguínea media, se insertó una cánula de polietileno (PE50) rellena con heparina en la arteria femoral derecha. El rendimiento cardiaco se midió usando un medidor del rendimiento cardiaco de tipo de dilución térmica (CARDIOTHER M500R). Se insertó un tubo de inyección (PE50) relleno con solución fisiológica salina en la vena
50 yugular común derecha en la rata y quedó retenido en el ventrículo derecho. Se insertó un microcatéter desde la vena yugular común derecha de la rata y quedó retenido en la parte de inicio de la aorta.

La infusión usó 100 µl de solución fisiológica salina a temperatura ambiente (25°C). Presionando un conmutador de MEDIDA (MEASURE) del medidor del rendimiento cardiaco de tipo de dilución térmica y simultáneamente inyectando la infusión (100 µl de solución fisiológica salina), se inició la medición del rendimiento cardiaco. El rendimiento cardiaco se midió cinco veces para determinar el rendimiento cardiaco medio. La presión sanguínea media y el rendimiento cardiaco se determinaron 1, 5, 15 y 30 minutos antes y después de la administración de grelina. La resistencia vascular periférica se determinó dividiendo la presión sanguínea media por el rendimiento
60 cardiaco.

65

ES 2 335 235 T3

TABLA 1

	Peso corporal (g)	Rendimiento cardiaco (ml/min/kg) después de la administración de 1 µg de grelina				
		0 min.	1 min.	5 min.	15 min.	30 min.
Media	230	347	382	367	341	338
SEM	3,7	14,3	10,2	11,5	7,9	8,8

En la tabla, SEM es el error típico de la media.

TABLA 2

	Peso corporal (g)	Rendimiento cardiaco (ml/min/kg) después de la administración de 10 µg de grelina				
		0 min.	1 min.	5 min.	15 min.	30 min.
Media	237	350	390	392	370	344
SEM	1,0	8,5	7,4	15,8	14,7	13,8

En la tabla, SEM es el error típico de la media.

En el grupo que recibió 1 µg de grelina (Tabla 1) y el grupo que recibió 10 µg de grelina (Tabla 2), se reconoció un aumento en el rendimiento cardiaco en 1 a 5 minutos después de la administración.

40 Ejemplo 8

Aislamiento de grelina y grelina-27 de diversos orígenes

A partir de extracto de estómago de rata, se purificó grelina usando la actividad de liberación de Ca como indicador en el método descrito en el Ejemplo 2. La fracción activa (tiempo de elución de 59 minutos en la Fig. 1b) en la CM-HPLC secundaria se purificó hasta la homogeneidad por HPLC de fase inversa en una columna µBondasphere C-18 (3,9 x 150 mm, producida por Waters Co., Ltd). Esta fracción se analizó por espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS), indicando un pico del peso molecular (3187,2 ± 0,9) que era menor en aproximadamente 126 que el de la grelina natural modificada con ácido octanoico (C8) consistente en 28 aminoácidos. La determinación de la secuencia aminoacídica de este péptido por un secuenciador de péptidos (ABI 494, fabricado por Applied Biosystems Co., Ltd) reveló que es un péptido compuesto de los siguientes 27 restos aminoacídicos: 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 es un aminoácido no identificado). Es decir, este péptido estaba compuesto por una secuencia aminoacídica en la que en la grelina consistente en 28 aminoácidos, se había delecionado la 13ª o 14ª glutamina. Como la actividad de liberación de Ca de este péptido era similar a la de la grelina de 28 aminoácidos como se muestra en el Ejemplo 9, este péptido se denominó grelina-27. A partir de extracto de estómago humano, se aisló grelina-27 humana de la misma manera que la grelina de rata, y se confirmó que consistía en la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 11. Se purificaron fracciones de picos con tiempos de retención de 64 a 65 minutos en CM-HPLC secundaria y se analizaron por espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS), indicando un pico con el peso molecular (3341,4 ± 0,9). Como este péptido modificado con ácido graso estaba compuesto por 28 aminoácidos, se reveló que era un péptido en el que en la grelina (28 aminoácidos), la tercera serina se había modificado con ácido decanoico (C10).

A partir de la biblioteca de ADNc de estómago de rata preparada en el Ejemplo 5, se clonó un ADNc codificante de un precursor de grelina-27 por hibridación en placa donde el fragmento de ADN amplificado por PCR preparado en el Ejemplo 5 se usó como sonda. Se determinó la secuencia de nucleótidos del ADNc y se confirmó que codificaba el precursor de grelina-27. El ADNc resultante para el precursor de grelina-27 de rata estaba compuesto por la secuencia

ES 2 335 235 T3

de nucleótidos indicada en la SEQ ID N°: 14, que codificaba el precursor de grelina-27 que tenía la secuencia aminoacídica (116 aminoácidos) indicada en la SEQ ID N°: 12. También se clonó un ADNc para el precursor de grelina-27 humana de la misma manera que se ha descrito anteriormente, y reveló que consistía en la secuencia de nucleótidos indicada en la SEQ ID N°: 15, que codificaba el precursor de grelina-27 humana que tenía la secuencia aminoacídica (116 aminoácidos) indicada en la SEQ ID N°: 13.

Se clonó un ADNc que codificaba un precursor de grelina o grelina-27 de origen porcino a partir de una biblioteca de ADNc porcina por el método descrito en el Ejemplo 5 por hibridación en placa, donde se usó como sonda el fragmento de ADN amplificado por PCR descrito en el Ejemplo 5. Se determinó la secuencia de nucleótidos del clon de ADNc resultante y se confirmó que codificaba un precursor de grelina porcina o un precursor de grelina-27 porcina. El ADNc resultante para el precursor de grelina porcina estaba compuesto por la secuencia de nucleótidos indicada en la SEQ ID N°: 20, que codificaba un precursor de grelina que tenía la secuencia aminoacídica (118 aminoácidos) indicada en la SEQ ID N°: 18. El ADNc para el precursor de grelina-27 porcina estaba compuesto por la secuencia de nucleótidos indicada en la SEQ ID N°: 21, que codificaba el precursor de grelina-27 que tenía la secuencia aminoacídica (117 aminoácidos) indicada en la SEQ ID N°: 19. Por consiguiente, la grelina porcina (28 aminoácidos) y la grelina-27 porcina (27 aminoácidos) están compuestas por las secuencias aminoacídicas indicadas en las SEQ ID N°: 16 y 17, respectivamente.

Se clonó un ADNc codificante de un precursor de grelina derivado de anguila, *Xenopus laevis* o trucha arco iris a partir de diversas bibliotecas de ADNc por el método descrito en el Ejemplo 5 por hibridación en placa, donde se usó como sonda el fragmento de ADN amplificado por PCR descrito en el Ejemplo 5. Se determinó la secuencia de nucleótidos del clon de ADNc resultante y se confirmó que codificaba el precursor de grelina.

El ADNc resultante para el precursor de grelina de anguila estaba compuesto por los nucleótidos indicados en la SEQ ID N°: 36, el ADNc para el precursor de grelina de rana estaba compuesto por los nucleótidos indicados en la SEQ ID N°: 37, y el ADNc para el precursor de grelina de trucha arco iris estaba compuesto por los nucleótidos indicados en la SEQ ID N°: 38 ó 39.

En el caso de la trucha arco iris, se obtuvieron el ADNc codificante del precursor de la grelina-23 indicado en la SEQ ID N°: 38 y el ADNc codificante del precursor de grelina-20 indicado en la en SEQ ID N°: 39.

A partir de las secuencias de nucleótidos de los ADNc anteriores, se descubrió que el precursor de grelina de anguila tiene la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 32, el precursor de grelina de rana tiene la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 33, y el precursor de grelina de trucha arco iris tiene la secuencia aminoacídica indicada en las SEQ ID N°: 34 ó 35.

A partir de la trucha arco iris, se encontraron la secuencia aminoacídica del precursor de la grelina-23 indicada en la SEQ ID N°: 34 y la secuencia aminoacídica del precursor de la grelina-20 de la SEQ ID N°: 35.

Se clonó un ADNc para un precursor de grelina bovina por el método de PCR. Es decir, se realizó una PCR donde se usó como cebador un ADN sintético que tenía secuencias de nucleótidos diseñadas basándose en las secuencias aminoacídicas conservadas entre las grelinas y grelinas-27 procedentes de rata, humana y porcina y donde se usó como plantilla una biblioteca de ADNc de estómago bovino. El fragmento de ADN amplificado de esta manera tenía la secuencia de nucleótidos indicada en la SEQ ID N°: 24, que codificaba una parte del precursor de la grelina-27 bovina indicado en la SEQ ID N°: 23. Por consiguiente, la grelina-27 bovina tiene la secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 22. En el fragmento de ADN amplificado por la PCR anterior usando la biblioteca de ADNc de estómago bovino como plantilla, no hubo ningún ADN que codificara un precursor de grelina (28 aminoácidos).

Los aminoácidos de las grelinas de rata, humana y porcina y las grelinas-27 de rata, humana, porcina y bovina eran muy similares, y en particular, las secuencias aminoacídicas del 1^{er} al 10^o aminoácidos en las 7 grelinas descritas anteriormente eran completamente idénticas entre sí.

Ejemplo 9

Comparación de actividad entre diversos derivados de grelina

Se examinaron fragmentos peptídicos obtenidos por digestión parcial de las grelinas de rata y humana por diversas proteasas, o péptidos sintetizados químicamente, con respecto a su actividad de liberación de Ca para determinar la secuencia aminoacídica central y la longitud de cadena óptima del ácido graso de modificación necesario para la actividad de liberación de Ca. La actividad de liberación de Ca de la grelina se expresó en términos de la concentración de grelina (CE₅₀, nM) a la que se consigue 50% de la actividad máxima. Por consiguiente, los valores de CE₅₀ inferiores son indicativos de mayor actividad.

ES 2 335 235 T3

TABLA 3

Comparación de la actividad entre diversos derivados de grelina

Origen	SEC ID N°	Aminoácidos	Modificación con ácido graso	Actividad de liberación de Ca (CE ₅₀ , nM)	Observaciones
humano	3	1-28	Acil (C : 8)	2,6	Grelina natural
humano	3	1-15	Acil (C : 8)	7,0	
humano	3	1-11	Acil (C : 8)	15	
rata	2	1-28	Acil (C : 8)	2,9	Grelina natural
rata	2	1-15	Acil (C : 8)	8,6	
rata	2	1-11	Acil (C : 8)	15	
rata	2	1-10	Acil (C : 8)	19	
rata	2	1-9	Acil (C : 8)	38	
rata	2	1-8	Acil (C : 8)	100	
rata	2	1-4	Acil (C : 8)	480	
rata	2	16-28	Acil (C : 8)	>10000	
rata	2	(1-28)+ (14-28)	Acil (C : 8)	2,8	grelina-27
rata	2	1-28	Acil (C : 16)	3,1	
rata	2	1-28	Acil (C : 10)	2,6	
rata	2	1-28	Acil (C : 6)	16	
rata	2	1-28	Acil (C : 4)	280	
rata	2	1-28	Acil (C : 2)	780	

La actividad de liberación de Ca de la grelina está presente en el lado del extremo amino. Un péptido desde el extremo amino al 4° aminoácido tiene suficiente actividad de liberación de Ca y un péptido desde el extremo amino al décimo aminoácido muestra una fuerte actividad de liberación de Ca parecida a la de la grelina natural. Cuando la longitud de la cadena del ácido graso de modificación es C : 2 (grupo acetilo), se produce una actividad suficiente, y cuando la longitud de la cadena es C : 8 (grupo octanoílo), se consigue una actividad máxima de liberación de Ca, incluso si el número de átomos de carbono del ácido graso se aumenta adicionalmente a C : 10 (grupo decanoílo) o a C : 16, no cambia la fuerte actividad de liberación de Ca. Es decir, cuando el ácido graso para modificar la tercera serina desde el extremo amino contiene 8 o más átomos de carbono, se consigue la mayor actividad de liberación de Ca.

Ejemplo 10

60 *Síntesis de diversos derivados de grelina*

(1) *Síntesis de derivados peptídicos*

65 Se adquirieron derivados de aminoácidos distintos de Fmoc-^DSer (C₈H₁₇) y Fmoc-Ser (C₈H₁₇), y reactivos de síntesis, en Perkin Elmer, Novabiochem or Watanabe Kagaku Co., Ltd. La extensión de la cadena peptídica se realizó principalmente usando un sintetizador Applied Biosystem 433A producido por Perkin Elmer, y se construyó un derivado de péptido protegido-resina por el método Boc o Fmoc. La resina con péptido protegido obtenida por el método

ES 2 335 235 T3

Boc se desprotegió con fluoruro de hidrógeno anhidro (HF) en presencia de p-cresol, liberando de esta manera el péptido, que después se purificó. La resina con el péptido protegido obtenida por el método Fmoc se desprotegió con ácido trifluoroacético (TFA) o TFA diluido que contenía diversos eliminadores, y se purificó el péptido liberado. La purificación se realizó en HPLC de fase inversa en una columna C4 o C18. La pureza del producto purificado se confirmó por HPLC de fase inversa y su estructura se confirmó por el análisis de la composición de aminoácidos y espectrometría de masas.

El péptido de la presente invención se produce por un método de síntesis de péptidos convencional. Por ejemplo, puede producirse por un método descrito en el capítulo 2 y 3 de "Biochemical Experimental Course 1, Protein Chemistry IV (Tokyo Kagaku Dojin) o en "Development of Medicines, a second series, Vol. 14, Peptide Synthesis (Hirokawa Shoten Co., Ltd). Por consiguiente, a continuación se muestran ejemplos típicos del péptido de la presente invención. Específicamente, a continuación se ejemplifican síntesis de péptidos acilados o alquilados. Además, se hizo reaccionar grelina de origen humano (que puede abreviarse en lo sucesivo como hGrelina) o grelina procedente de rata (que puede abreviarse en lo sucesivo como rGrelina) con tripsina o quimiotripsina o las dos enzimas sucesivamente para dar los siguientes fragmentos de 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), y 30. Grelina (1-4). Después, estos fragmentos se aislaron por HPLC analítica y se midió su actividad. 41. La [N-Acetil]-Grelina (1-10) se preparó de la manera habitual tratando Grelina (1-10) con *N*-acetilsuccinimida. El compuesto n° 2 (grelina de rata) hizo uso de un material natural y 10. [Ser³(Butiril)]-rGrelina, 11. [Ser³(Hexanoil)]-rGrelina, 12. [Ser³(Decanoil)]-rGrelina, 13. [Ser³(Lauroil)]-rGrelina y 14. [Ser³(Palmitoil)]-rGrelina se sintetizaron de la misma manera que en la síntesis del compuesto 1 (hGrelina) y después se midió su actividad.

Abreviaturas Principales

25 resina HMP; resina de 4-hidroximetil-fenoximetilo
resina de Fmoc-amida; resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido-etilo
30 resina PAM; resina de fenilacetoamidometilo
HBTU; hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
TBTU; tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
35 HOBt; 1-hidroxibenzotriazol
DCC; diciclohexilcarbodiimida
40 DIPCI; diisopropilcarbodiimida
TFA; ácido trifluoroacético
DIPEA; diisopropiletilamina
45 TIPS; triisopropilsilano
Fmoc; fluorenilmetoxicarbonilo
50 Boc; *t*-butiloxicarbonilo
Trt; tritilo
Bu^t; *t*-butilo
55 Pmc; 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo
Prl; propionilo
60 PhPrl; fenilpropionilo
Bzl; bencilo
Bom; benciloximetilo
65 Tos; toluenosulfonilo
Cl-Z; 2-cloro-benciloxicarbonilo

ES 2 335 235 T3

Pis; 2-fenilisopropilo

Mtt; 4-metiltrilito

5 DMF; *N,N*-dimetilformamida

NMP; *N*-metilpirrolidona

DMAP; 4-dimetilaminopiridina

10 HOSu; *N*-hidroxisuccinimida

Adod; ácido 2-aminododecanoico

15 Aib; ácido 2-aminoisobutílico

Ape; ácido 5-aminopentanoico

Cha; ciclohexilalanina

20 Dap; ácido 2,3-diaminopropiónico

Nal; naftilalanina

25 Nle; norleucina

Aminoácidos de protección usados en la síntesis

30 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*-C₈H₁₇), Fmoc-^DSer (*n*-C₈H₁₇), Fmoc-Cys (*n*-C₈H₁₇), 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 (O-C₇H₁₅)

35

Método Boc:

40 Boc-Gly, Boc-Ser (Bzl), Boc-Ser (Ac), Boc-Ser (PrI), 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*-C₈H₁₇), Boc-Ape, Boc-Ser (*n*-C₈H₁₇)

Unidades usadas

45 (a) Sistema de HPLC analítica

Unidad: Sistema Shimadzu LC-10A

50 Columna: YMC PROTEIN-RP (4,6 mm ϕ x 150 mm)

Temperatura de la columna: 40°C

55 Eluyente: Un gradiente lineal de acetonitrilo de 0 a 50% durante 20 minutos en ácido trifluoroacético al 0,1%

Caudal: 1 ml/min.

Detección: UV (210 nm)

60 Volumen de inyección: de 10 a 100 μ l

65

ES 2 335 235 T3

(b) Sistema de HPLC Preparativa

Unidad: Sistema de Liberación Multidisolvente Waters 600

- 5 Columnas: YMC-Pack-ODS-A (5 μ m, 20 mm x 250 mm)
YMC-Pack-PROTEIN-RP (5 μ m, C4, 10 mm x 250 mm)
YMC-Pack PROTEIN-RP (5 μ m, C4, 20 mm x 250 mm)
10 YMC PROTEIN-RP (4,6 mm ϕ x 150 mm)

Eluyente: Un gradiente lineal adecuado de concentración de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1%

- 15 Caudal: 10 ml/min. (para la columna de un diámetro interno de 20 mm), 3 ml/min. (para la columna de un diámetro interno de 10 mm), 1 ml/min. (para la columna de un diámetro interno de 4,6 mm)

Detección: 210 nm, 260 nm

- 20 Inyección: de 10 a 2000 μ l (se inyectaron 2000 μ l o más mediante una bomba)

(c) Espectrómetro de masas

- 25 Unidad: Finigan MAT TSQ700

Fuente de iones: ESI

Modo de ion de detección: Positivo

- 30 Voltaje de nebulización: 4,5 kV

Temperatura de Capilaridad: 250°C

- 35 Fase móvil: Una mezcla de ácido acético al 0,2% y metanol (1:1)

Caudal: 0,2 ml/min.

- 40 Intervalo de exploración: m/z de 300 a 1.500

(d) Análisis de la secuencia aminoacídica

- 45 Unidad: secuenciador Applied Biosystem 477A, modelo 492 fabricado por Perkin Elmer

(e) Análisis de la composición de aminoácidos

- 50 Unidad: analizador de aminoácidos modelo L-8500 fabricado por Hitachi, Co., Ltd.

Muestra: A menos que se especifique otra cosa, la muestra se hidrolizó con HCl 6 M a 110°C durante 24 horas en un tubo cerrado herméticamente.

- 55 (2) Ejemplo de síntesis de un derivado que tiene acil serina o acil treonina (método Fmoc, derivados de amida de extremo carboxilo)

Compuesto 1 hGrelina: GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

- 60 Se trató Fmoc-Arg(Pmc)-resina HMP (403 mg, 0,25 mmol, ABI Co., Ltd) con piperazina al 20% durante 20 minutos y se sometió repetidamente a introducción de Fmoc-aminoácido por HBTU/HOBt y eliminación de Fmoc con piperazina secuencialmente 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. Después de que se introdujera finalmente Boc-Gly por DCC/HOBt, la resina peptídica protegida resultante (1,3 g) se trató con una solución de TFA al 1%-TIPS al 5%-cloruro de metileno (15 ml) durante 30 minutos. La resina-peptido se filtró, se lavó varias veces con cloruro de metileno (30 ml) y se lavó con DIEA al 5% (10 ml) y después con cloruro de metileno (30 ml). La resina-peptido des-Trt resultante (aproximadamente 1,3 g) se hinchó con NMP (10 ml), se añadieron ácido octanoico (144,2 mg, 1,0 mmol) y DIPCI (126,2 mg, 1,0 mmol)

ES 2 335 235 T3

en presencia de DMAP (61,1 mg, 0,5 mmol) y se dejó reaccionar durante 8 horas. La resina se recuperó por filtración y se lavó con NMP y después con cloruro de metileno, seguido de secado al vacío para dar aproximadamente 1,2 g de resina-péptido protegido, donde la cadena lateral de la 3ª serina estaba octanoilada. A este producto se le añadió un reactivo de desprotección (10 ml) consistente en 88% de TFA-5% de fenol-2% de TIPS-5% de H₂O, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se retiró por filtración y el filtrado se concentró seguido de la adición de éter a los residuos resultantes para formar precipitados. Los precipitados se recuperaron por filtración y se secaron para dar aproximadamente 550 mg de péptido bruto. Se disolvieron 200 mg de este producto en 10 ml de agua y la mezcla se aplicó a YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 54% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar aproximadamente 120 mg del producto deseado.

(3) *Ejemplo de síntesis de un derivado que tiene acil serina o acil treonina (método Fmoc, compuestos de amida carboxilo-terminales)*

15 *Compuesto 3 Grelina (1-9)-NH₂; GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPEH-NH₂*

Se trató Fmoc-amida-resina (403 mg, 0,25 mmol, ABI Co., Ltd) con piperazina al 20% durante 20 minutos y se sometió repetidamente a introducción de Fmoc-aminoácido por HBTU/HOBt y eliminación de Fmoc con piperazina secuencialmente para construir resina Fmoc-Ser(Bu^t)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc). Después de que se introdujera finalmente Boc-Gly por DCC/HOBt, la resina-péptido protegido resultante (aproximadamente 550 mg) se trató con solución de TFA al 1%-TIPS al 5%-cloruro de metileno (10 ml) durante 30 minutos. La resina-péptido se recuperó por filtración, se lavó varias veces con cloruro de metileno (30 ml) y se lavó con DIEA al 5% (10 ml) y después con cloruro de metileno (30 ml). La resina-péptido des-Trt resultante (aproximadamente 750 mg) se hinchó con NMP (10 ml), se añadieron ácido octanoico (144,2 mg, 1,0 mmol) y DIPC1 (126,2 mg, 1 mmol) en presencia de DMAP (61,1 mg, 0,5 mmol) y la mezcla se dejó reaccionar durante 4 horas. La resina se recuperó por filtración y se lavó con NMP y después con cloruro de metileno, seguido de secado al vacío para dar aproximadamente 800 mg de resina-péptido protegido donde la cadena lateral de la 3ª serina estaba octanoilada. A este producto se le añadió TFA (10 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La resina se retiró por filtración y el filtrado se concentró seguido de adición de éter a los residuos resultantes para formar precipitados. Los precipitados se recuperaron por filtración y se secaron para dar aproximadamente 250 mg de péptido bruto. Se disolvieron aproximadamente 200 mg de este producto en 10 ml de ácido acético acuoso al 30% y la mezcla se aplicó a YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 54% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar aproximadamente 150 mg del producto deseado.

(4) *Ejemplo de síntesis de un derivado que tiene acil serina o acil treonina (método Boc)*

40 *Compuesto 9 [Ser³(Propionil)]-rGrelina (1-28); GSS(CO-CH₂CH₃)FLSPEHQKAQQQRKESKPPAKLQPR*

Se construyó resina-grelina de rata (4-28) protegida a partir de resina Boc-Arg (Tos)-Pam (0,75 g, 0,5 mmol) por medio de la química de Boc, y se condensaron Boc-Ser(CO-CH₂CH₃)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH y Boc-Gly-OH con una mitad (1,4 g) de la resina. La resina resultante, 1,5 g, se trató con una mezcla de HF y p-cresol (8,5 ml:1,5 ml) a 0°C durante 1 hora y el HF se evaporó. Se añadió éter a los residuos, con lo que se obtuvieron 671 mg de péptido bruto. Esta muestra se disolvió en ácido acético (AcOH) al 50% y se aplicó a una columna preparativa YMC-Pack-ODS-A (5 µm, 20 mm x 250 mm) y se eluyó a una velocidad de 10 ml/min mediante un gradiente de una concentración de acetonitrilo de 0 a 95% en solución de TFA al 0,1% durante 75 minutos. Las fracciones que contenían el producto deseado se liofilizaron para dar 135,8 mg de péptido bruto. Una parte (0,5 mg) de este producto se aplicó a una columna YMC-A-302 (C18, 4,6 mm φ x 150 mm) y se eluyó a un caudal de 1 ml/min. mediante un gradiente de acetonitrilo a una concentración de 15 a 19%. Este procedimiento de purificación se repitió y las fracciones deseadas se combinaron para dar 0,41 mg del producto deseado.

Los siguientes derivados de péptidos que tienen acil serina o acil treonina se produjeron de la misma manera que en la producción del Compuesto 3 ó 9 descrito anteriormente.

A continuación se resumen los resultados de la espectrometría de masas y del análisis de la composición de aminoácidos de los derivados de péptidos que tienen acil serina o acil treonina.

60 *Compuesto 1. hGrelina*

ESI-MS 3371,0 (valor teórico: 3370,9), composición de aminoácidos: Ser; 3,53 (A), 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)

65

ES 2 335 235 T3

Compuesto 3. Grelina (1-9)-amida

ESI-MS [M+H]; 1085,7 (valor teórico: 1085,2), composición de 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)

5

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

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

10

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

ESI-MS [M+H]; 1211,7 (valor teórico: 1211,4), composición de 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)

15

Compuesto 8. [Ser³(Acetil)]-rGrelina

20

ESI-MS 3231,0 (valor teórico: 3230,7), composición de 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)

25

Compuesto 9. [Ser³(Propionil)]3-rGrelina

ESI-MS 3245,0 (valor teórico: 3242,8), composición de 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)

30

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

ESI-MS 3377,0 (valor teórico: 3376,9), composición de 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)

35

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

ESI-MS 3369,0 (valor teórico: 3368,9), composición de 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)

40

Compuesto 28. Grelina (1-8)-amida

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

45

Compuesto 29. Grelina (1-7)-amida

50

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

55

Compuesto 30. Grelina (1-6)-amida

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

60

Compuesto 31. Grelina (1-5)

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

65

ES 2 335 235 T3

Compuesto 32. Grelina (1-5)-amida

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

5

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

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

10

Compuesto 34. Grelina (1-3)-amida

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

15

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

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

20

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

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

25

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

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

30

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

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

35

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

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

40

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

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

50

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

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

55

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

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

60

65

ES 2 335 235 T3

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

ESI-MS [M+H]; 869,7 (valor teórico: 869,0), composición de aminoácidos después de la hidrólisis con ácido propiónico-ácido clorhídrico (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)

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

ESI-MS [M+H]; 860,7 (valor teórico: 860,1), composición de aminoácidos después de la hidrólisis con ácido propiónico-ácido clorhídrico (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)

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

ESI-MS [M+H]; 789,5 (valor teórico: 788,9), composición de aminoácidos después de la hidrólisis con ácido propiónico-ácido clorhídrico (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)

Compuesto 59. [Thr³(Octanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3384,0 (valor teórico: 3384,9), composición de 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)

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

ESI-MS M; 3410,0 (valor teórico: 3411,0), composición de 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)

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

ESI-MS M; 3343,0 (valor teórico: 3342,9), composición de 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)

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

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

(5) Ejemplo de síntesis de un derivado acilado amino-terminal

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

Se trató resina-Fmoc-amida (403 mg, 0,25 mmol, ABX Co., Ltd) con piperazina al 20% durante 20 minutos y se sometió repetidamente a introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU/HOBt y eliminación de Fmoc con piperazina secuencialmente para construir Fmoc-Gly-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-resina. Después del tratamiento con piperazina, la resina-péptido resultante (550 mg) se lavó con NMP, se añadieron DIPCl (126,2 mg, 1 mmol) y ácido octanoico (144,2 mg, 1,0 mmol) en presencia de HOBt (135,1 mg, 1 mmol) y la mezcla se dejó reaccionar durante 4 horas. La resina se recuperó por filtración, se lavó con NMP y después con cloruro de metileno y se secó al vacío para dar aproximadamente 600 mg de resina-péptido protegido donde el grupo amino de la Gly amino-terminal estaba octanoilado. Este producto se desprotegió con TFA (10 ml) (tratamiento durante 30 minutos) para dar 200 mg de péptido bruto. Toda la muestra se aplicó a YMC-Pack PROTEIN-RP (5 μm, C4, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 54% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Se obtuvieron aproximadamente 180 mg del producto deseado.

Valores medidos: ESI-MS [M+H]; 1085,6 (valor teórico: 1085,2), composición de 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)

ES 2 335 235 T3

(6) Ejemplo de síntesis de un derivado que contiene serina que tiene una cadena lateral alquilo

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

5 GSS(C₈H₁₇)FLSP-NH₂

Fmoc-Ser (C₈H₁₇)

10 Con refrigeración en hielo, se añadió hidruro sódico (3,19 g, 133 mmol) a una solución de Boc-Ser (12,3 g, 53,9 mmol) en DMF (300 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió yoduro de octano (11,0 ml, 60,9 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Después de que a la solución de reacción se le añadiera gota a gota agua (40 ml) con refrigeración con hielo, el disolvente se evaporó al vacío. Los residuos resultantes se purificaron aplicándolos a cromatografía en columna de gel de sílice (gel; Art9385, Merck Co., Ltd, eluyente: diclorometano:metanol:ácido acético = 120:10:1), para dar 6,88 g de Boc-Ser (C₈H₁₇) (rendimiento, 36,2%) en forma de un material oleoso amarillo pálido. A este producto, Boc-Ser (C₈H₁₇) (6,88 g, 21,7 mmol), se le añadió ácido trifluoroacético (120 ml) con refrigeración sobre hielo y se agitó durante 0,5 horas a temperatura ambiente. Después de que se evaporara el ácido trifluoroacético, los residuos resultantes se disolvieron en éter dietílico (120 ml), se añadió HCl 4 N-dioxano (22 ml) y la mezcla se agitó durante 1 hora con refrigeración en hielo. Los cristales precipitados se recuperaron por filtración para dar 5,23 g de H-Ser (C₈H₁₇)-HCl (rendimiento, 96,3%) en forma de cristales incoloros. Después de que se añadiera trietilamina (1,40 ml, 10 mmol) a una suspensión (50 ml) de este producto H-Ser (C₈H₁₇)-HCl (2,54 g, 10,0 mmol) en hidrogenocarbonato sódico al 10%, se añadió gota a gota una solución de Fmoc-Osu (5,00 g, 14,8 mmol) en 1,2-dimetoxietano (20 ml) durante un periodo de 10 minutos y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Los materiales insolubles se retiraron por filtración, después al filtrado se le añadió diclorometano y la fase orgánica se separó y se lavó con una solución al 13% de NaCl. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se evaporó. Los residuos resultantes se purificaron aplicándolos a cromatografía en columna en gel de sílice (gel; BW-30Q, Fuji Silicia Co., Ltd, eluyente: diclorometano:metanol = 93:7), para dar 2,75 g de Fmoc-Ser (C₈H₁₇) (rendimiento: 62,6%) en forma de cristales incoloros. Rf = 0,45 (CHCl₃:MeOH = 9:1, Gel de Sílice 60F₂₅₄, MERCK Co., Ltd). Fmoc-^DSer (C₈H₁₇) : Rf = 0,45 (CHCl₃:MeOH = 9:1, Gel de Sílice 60F₂₅₄, MERCK Co., Ltd).

30 Se trató Fmoc-amida-resina (400 mg, 0,25 mmol, ABI Co., Ltd) con piperazina al 20% durante 20 minutos y se sometió repetidamente a introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU/HOBt y eliminación de Fmoc con piperazina secuencialmente para construir Fmoc-Ser(Bu^t)-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-Pro-resina. Después de que se introdujera finalmente Boc-Gly por DCC/HOBt, una parte (250 mg) de la resina-péptido protegido resultante se trató con TFA (10 ml) durante 30 minutos. La resina se retiró por filtración y el filtrado se concentró seguido de adición de éter a los residuos resultantes para dar aproximadamente 120 mg del péptido bruto en forma de precipitados. Este producto se disolvió en AcOH al 5% (10 ml), se aplicó a YMC-Pack-ODS-A (5 μm, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 60% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar aproximadamente 40 mg del producto deseado.

40 Compuesto 84. [N-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-bencil amida

H-Ape-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-NH-CH₂-Ph

45 Se puso resina de oxima (230 mg/0,25 mmol, Novabiochem Co., Ltd) en un recipiente de reacción equipado con un filtro de vidrio y Boc-Leu-OH · H₂O (190 mg, 0,75 mmol) disuelto previamente en cloruro de metileno (DCM), se secó sobre MgSO₄, se añadieron DCC (160 mg, 0,75 mmol) y 5 ml de DCM y la mezcla se agitó durante una noche. El producto de reacción se lavó varias veces con una cantidad adecuada de DCM, DCM/EtOH (1:1) y DCM en este orden. Después de la introducción de Leu, <1> se añadieron 10 ml de TFA al 25%/DCM, la mezcla se agitó durante 30 minutos y la resina se lavó varias veces con DCM, alcohol isopropílico (iPrOH), DCM y DMF en este orden, y <2> una solución preparada disolviendo 0,75 mmol (3 equivalentes) de Boc-aminoácido, 0,75 mmol (3 equivalentes) de TBTU y 0,75 mmol (3 equivalentes) de HOBt y después añadiendo 1,25 mmol (5 equivalentes) de DIPEA en 5 ml de DMF en un matraz Erlenmeyer se introdujo en el recipiente de reacción y la mezcla se agitó durante 1 hora; esta operación se realizó repetidamente para condensar secuencialmente los aminoácidos. Finalmente, se obtuvo resina Boc-NH-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Oxima, 370 mg. La resina se suspendió en aproximadamente 5 ml de DMF, se añadieron hidrocloreto de bencilamina (180 mg, 1,25 mmol), trietilamina (173 μl, 1,25 mmol) y ácido acético (72 μl, 1,25 mmol) y la mezcla se agitó. Después de 24 horas, la resina se retiró por filtración, el filtrado se evaporó, y el péptido protegido con Boc resultante se precipitó en 10 ml de HCl 1 N. Este producto se lavó con agua y se secó, se añadieron 5 ml de TFA y se hizo reaccionar durante 30 minutos eliminando de esta manera el Boc. El TFA se evaporó y el producto se precipitó con éter (Et₂O), por lo que se obtuvo el producto deseado [N-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-bencilamida, 110 mg. Los compuestos 82, 83 y 85 se sintetizaron de la misma manera.

65 Los siguientes derivados peptídicos que tienen alquil serina, excepto los Compuestos 82 a 85, se produjeron de la misma manera que en la producción del Compuesto 50 descrito anteriormente.

Los resultados de la espectrometría de masas y el análisis de composición de aminoácidos de los derivados peptídicos que tienen alquil serina se resumen a continuación.

ES 2 335 235 T3

Compuesto 17. [Ser³(Octil)]-hGrelina

ESI-MS; 3357,0 (valor teórico: 3356,9), composición de 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)

5

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

ESI-MS [M+H]; 805,5 (valor teórico: 805,0), composición de aminoácidos después de la hidrólisis con ácido propiónico-ácido clorhídrico (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)

10

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

ESI-MS [M+H]; 805,4 (valor teórico: 805,0), composición de aminoácidos después de la hidrólisis con ácido propiónico-ácido clorhídrico (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)

15

20

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

ESI-MS [M+H]; 805,4 (valor teórico: 805,0), composición de aminoácidos después de la hidrólisis con ácido propiónico-ácido clorhídrico (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)

25

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

ESI-MS [M+H]; 805,5 (valor teórico: 805,0), composición de aminoácidos después de la hidrólisis con ácido propiónico-ácido clorhídrico (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)

30

35

Compuesto 67. [Ser³(Bzl)]-hGrelina

ESI-MSM; 3335,0 (valor teórico: 3334,8), composición de 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)

40

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

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

45

Compuesto 77. [N-Aminopentanoil, ^DSer³(Octil), ^DPhe⁴, Lys⁵]-Grelina (3-5)-amida

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

50

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

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

55

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

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

60

Compuesto 81. [N-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-amida

ESI-MS [M+H]; 576,5 (valor teórico: 575,8), composición de aminoácidos: Ser; 0,49 (1), Leu; 2, Phe; 0,99 (1)

65

ES 2 335 235 T3

Compuesto 82. [*N*-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-metilamida

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

5

Compuesto 83. [*N*-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-etilamida

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

10

Compuesto 84. [*N*-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-bencilamida

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

15

Compuesto 85. [*N*-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-aminoetilamida

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

20

(7) Ejemplo de síntesis de un derivado que contiene cisteína que tiene una cadena lateral alquilo

Compuesto 48. [Cys³(Octil)]-Grelina (1-7)-NH₂

25

GSC(C₈H₁₇)FLSP-NH₂

Se trató Fmoc-amida-resina (403 mg, 0,25 mmol, ABI Co., Ltd) con piperazina al 20% durante 20 minutos y se sometió repetidamente a introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU/HOBt y eliminación de Fmoc con piperazina secuencialmente para construir Fmoc-Ser(Bu^t)-Cys(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-Pro-resina. Después de que se introdujera finalmente Boc-Gly con DCC/HOBt, la resina-péptido protegido resultante (550 mg) se trató con TFA (10 ml) durante 30 minutos. La resina se retiró por filtración y el filtrado se concentró seguido de adición de éter a los residuos resultantes para dar aproximadamente 120 mg del péptido bruto en forma de precipitados. Este producto se disolvió en 10 ml de ácido acético al 5%, se aplicó a YMC-Pack-ODS-A (5 µl, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 60% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar aproximadamente 44 mg del producto deseado.

40

Compuesto 68. [Cys³(Trt)]-hGrelina

GSC(C-Ph₃)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Se trató Fmoc-Arg(Pmc)-resina (403 mg, 0,25 mmol, ABI Co., Ltd) con piperazina al 20% durante 20 minutos y se sometió repetidamente a introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU/HOBt y eliminación de Fmoc con piperazina secuencialmente 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-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP-resina. Después de que se introdujera finalmente Boc-Gly con DCC/HOBt, se recuperó la resina-péptido protegido resultante (1,4 g). Se añadió TFA (15 ml) a una parte (400 mg) de la resina resultante y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La resina se retiró por filtración y el filtrado se concentró seguido de la adición de éter a los residuos resultantes para formar precipitados. Se disolvieron aproximadamente 90 mg de los precipitados en 40 ml de agua, después la mezcla se aplicó a YMC-PackPROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 54% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar aproximadamente 60 mg del producto deseado.

55

Los siguientes derivados peptídicos que tienen alquil cisteína se produjeron de la misma manera que en la producción del Compuesto 48 ó 68 descrita anteriormente.

Los resultados de la espectrometría de masas y el análisis de composición de aminoácidos de los derivados peptídicos que tienen alquil cisteína se resumen a continuación.

60

Compuesto 18. [Cys³(Octil)]-rGrelina

ESI-MS; 3317,0 (valor teórico: 3316,9), composición de 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)

ES 2 335 235 T3

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

ESI-MS [M+H]; 821,7 (valor teórico: 821,1), composición de aminoácidos después de la hidrólisis con ácido propiónico-ácido clorhídrico (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)

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

ESI-MS [M+H]; 821,6 (valor teórico: 821,1), composición de aminoácidos después de la hidrólisis con ácido propiónico-ácido clorhídrico (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)

Compuesto 68. [Cys³(Trt)]-hGrelina

ESI-MS 3503,0 (valor teórico: 3503,1), composición de 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) Ejemplo de síntesis de un derivado peptídico que contiene N-metilaminoácidos

Compuesto 86. [N-Aminopentanoil, Ser³(Octil), MePhe⁴, MeLeu⁵]-Grelina (3-5)-amida



Se puso Fmoc-amida-resina (0,40 g, 0,25 mmol) en un recipiente de reacción equipado con un filtro de vidrio, se añadieron 15 ml de piperidina al 20% en NMP y la mezcla se agitó durante 20 minutos, retirando de esta manera el grupo Fmoc. Después, se añadieron 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 y 1,0 mmol (4 equivalentes) de DIPEA y la mezcla se agitó durante 1 hora para condensar el Fmoc-MeLeu. Después, la cadena peptídica se prolongó realizando repetidamente la retirada del grupo Fmoc con piperidina al 20% y condensación de Fmoc-aminoácido (3 equivalentes) por hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio (3 equivalentes) en presencia de 2,25 mmol (9 equivalentes) de DIPEA. La conclusión de la reacción de condensación se confirmó por desprotección de una pequeña cantidad de la resina con TFA y examinándola por HPLC y espectrometría de masas (MS). Después de que se obtuviera Boc-NH-(CH₂)₄-CO-Ser(O-C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-resina, esta resina se trató con TFA durante 30 minutos, por lo que la resina se escindió para desproteger el péptido. Después de que se evaporara el TFA, el péptido se lavó con éter (Et₂O) para dar 120 mg de NH₂-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-NH₂. Este producto se aplicó a YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal; 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 54% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar 70 mg del producto deseado. Después de que se hidrolizara este derivado con ácido propiónico-HCl (50/50) a 150°C durante 2 horas, la cantidad del péptido se cuantificó usando la proporción de área de los picos de ácido aminopentanoico detectada en el analizador de aminoácidos con la de 10 nmol de ácido aminopentanoico como patrón.

ESI-MS [M+H]; 604,5 (valor teórico: 603,8), aminoácidos detectados después de la hidrólisis con ácido propiónico-HCl (50/50) a 150°C durante 2 horas: Ser, Ape.

(9) Síntesis de un derivado de disulfuro mixto

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



Un reactivo de desprotección (15 ml) que consiste en TFA al 88%-fenol al 5%-TIPS al 2%-H₂O al 5% se añadió a una resina HMP-péptido protegido (1 g) obtenida por síntesis de la misma manera que en la producción del Compuesto 68, y después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se retiró por filtración y el filtrado se concentró seguido de adición de éter a los residuos resultantes, por lo que se obtuvieron aproximadamente 550 mg de polvo de [Cys³]-hGrelina en bruto. Este producto se aplicó a YMC-PackODS-A (C18, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 54% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar 300 mg de [Cys³]-hGrelina (1-28). 40 mg (11,4 μmol) de este producto se disolvieron en agua (20 ml), se añadió una solución de 1 ml de 4,4'-ditiodipiridina (7,5 mg, 34,2 μmol) en acetonitrilo y la mezcla se dejó durante 1 hora. Después de que se confirmara la finalización de la reacción, la solución de reacción se lavó varias veces con cloroformo para retirar el exceso del derivado de 4,4'-ditiodipiridina y piridona. La capa acuosa (10 ml) que contenía [tiopiridil Cys³]-hGrelina (1-28) se ajustó a un valor de pH de 7,4 con NH₃ ac. al 5% y se añadió una solución de 1-heptano [sic.] tiol (4,5 mg, 34,2 μmol) en 2 ml de acetonitrilo. Después de 1 hora, la solución de reacción se aplicó a YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un

ES 2 335 235 T3

gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 54% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar 15 mg del producto deseado.

5 *Compuesto 57. [Cys³(S-Heptil)]-hGrelina*

ESI-MS 3391,0 (valor teórico: 3391,0), composición de 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 (10) *Ejemplos de síntesis de un derivado que tiene una amida en una cadena lateral en la posición 3 y un éster en la dirección inversa*

15 *Compuesto 55. [Asp³(NH-Heptil)]-hGrelina*

GSD(NH-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Se trató resina Fmoc-Arg(Pmc)-HMP (403 mg, 0,25 mmol, ABI Co., Ltd) con piperazina al 20% durante 20 minutos y se sometió repetidamente a la introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU/HOBt y eliminación de Fmoc con piperazina secuencialmente para construir Fmoc-Ser(Bu¹)-Asp(OPis)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu¹)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu¹)-Ser(Bu¹)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-resina HMP. Después de que se introdujera finalmente Boc-Gly con DCC/HOBt, la resina-péptido protegido resultante (1,3 g) se trató con una solución (15 ml) de TFA al 4%-cloruro de metileno durante 15 minutos. El péptido-resina se recuperó por filtración, se lavó varias veces con cloruro de metileno (30 ml), y se lavó con DIEA al 4% (10 ml) y después con cloruro de metileno (30 ml).

La resina-péptido des-Pis resultante (aproximadamente 1,3 g) se hinchó con NMP (10 ml), se añadieron hidrocloreuro de carbodiimida soluble en agua (191,7 mg, 1,0 mmol), HOBt (135,2 mg, 1,0 mmol) y n-heptilamina (115,2 mg, 1,0 mmol) y la mezcla se dejó reaccionar durante 8 horas.

30 La resina se recuperó por filtración, se lavó con NMP y cloruro de metileno y se secó al vacío para dar aproximadamente 1,2 g de resina-péptido protegido donde el resto Asp 3 estaba heptilamidado. Se añadió un reactivo de desprotección (10 ml) que consistía en TFA al 88%-fenol al 5%-TIPS al 2%-H₂O al 5% y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se retiró por filtración y el filtrado se concentró seguido de adición de éter a los residuos resultantes para formar precipitados. Los precipitados se recuperaron por filtración y se secaron para dar aproximadamente 550 mg de péptido bruto.

35 Se disolvieron 200 mg de este producto en 10 ml de agua y la mezcla se aplicó a YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 54% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar aproximadamente 120 mg del producto deseado.

45 *Compuesto 61. [Lys³(Octanoil)]-hGrelina*

GSK(CO-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Se trató Fmoc-Arg(Pmc)-resina HMP (403 mg, 0,25 mmol, un producto de ABI Co., Ltd) con piperazina al 20% durante 20 minutos y se sometió repetidamente a introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU/HOBt y eliminación de Fmoc con piperazina secuencialmente para construir Boc-Gly-Ser(tBu)-Lys(Mtt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu¹)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu¹)-Ser(Bu¹)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-resina HMP. Se trataron aproximadamente 300 mg de la resina-péptido protegido resultante con una solución (15 ml) de TFA al 1%-TIPS al 5%-cloruro de metileno durante 60 minutos.

55 La resina-péptido se recuperó por filtración y se lavó varias veces con cloruro de metileno (30 ml), se lavó con DIEA al 10% (10 ml) y después con cloruro de metileno (30 ml). La resina-péptido des-Mtt resultante (aproximadamente 300 mg) se hinchó con NMP (2 ml), se añadieron ácido octanoico (40 µl, 0,25 mmol) y DCC (52 mg, 0,25 mmol) en presencia de HOBt (34 mg, 0,25 mmol) y se dejó reaccionar durante una noche.

60 La resina se recuperó por filtración, se lavó con NMP y después con cloruro de metileno y se secó al vacío para dar aproximadamente 300 mg de resina-péptido protegido donde el 3^{er} resto de lisina estaba octanoilado. Se añadió un reactivo de desprotección (5 ml) que consistía en TFA al 88%-fenol al 5%-TIPS al 2%-H₂O al 5% y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se retiró por filtración y el filtrado se concentró seguido de adición de éter a los residuos resultantes para formar precipitados. Los precipitados se separaron por filtración y se secaron para dar aproximadamente 234 mg de péptido bruto.

ES 2 335 235 T3

Este producto se disolvió en 6 ml de ácido acético, se aplicó a YMC-Pack ODS-A (5 μ m, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 60% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar aproximadamente 100 mg de polvo. Este producto se disolvió en 2 ml de ácido acético al 50%, se aplicó a YMC-Pack PROTEIN-RP (5 μ m, C4, 20 mm x 250 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) durante 60 minutos de acetonitrilo de 0 a 60% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar aproximadamente 52 mg de polvo.

Los siguientes compuestos se produjeron de la misma manera que en la preparación del Compuesto 55 ó 61 descrita anteriormente.

Los resultados de la espectrometría de masas y el análisis de la composición de aminoácidos de los derivados peptídicos sintetizados por el método convencional Fmoc se resumen a continuación.

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

ESI-MS 3371,0 (valor teórico: 3370,9), composición de 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)

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

ESI-MS 3370,0 (valor teórico: 3369,9), composición de 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)

Compuesto 56. [Dap³(Octanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3370,0 (valor teórico: 3369,9), composición de 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.

Compuesto 58. [Adod³]-hGrelina (1-28)

ESI-MS M; 3355,0 (valor teórico: 3355,0), composición de 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)

Compuesto 61. [Lys³(Octanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3412,0 (valor teórico: 3412,0), composición de 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)

Compuesto 62. [Trp³]-hGrelina

ESI-MS M; 3343,0 (valor teórico: 3343,9), composición de 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)

Compuesto 63. [Phe³]-hGrelina

ESI-MS M; 3305,0 (valor teórico: 3304,8), composición de 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)

Compuesto 64. [Cha³]-hGrelina

ESI-MS M; 3411,0 (valor teórico: 3410,9), composición de 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)

ES 2 335 235 T3

Compuesto 65. [2-¹NaF³]-hGrelina

ESI-MS M; 3354,0 (valor teórico: 3354,9), composición de 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)

Compuesto 66. [2-^DNaF³]-hGrelina

ESI-MS M; 3355,0 (valor teórico: 3354,9), composición de 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)

Compuesto 70. [Leu³]-hGrelina

ESI-MS M; 3270,0 (valor teórico: 3270,8), composición de 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)

Compuesto 71. [Ile³]-hGrelina

ESI-MS M; 3270,0 (valor teórico: 3270,8), composición de 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)

Compuesto 72. [Lys³(Octanoil)]-hGrelina

ESI-MS M; 3286,0 (valor teórico: 3285,8), composición de 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)

Compuesto 73. [Nle³]-hGrelina

ESI-MS M; 3270,0 (valor teórico: 3270,8), composición de 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)

Compuesto 74. [Val³]-hGrelina

ESI-MS M; 3256,0 (valor teórico: 3256,8), composición de 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)

Compuesto 80. [Aib¹, His², ^DNaF³, ^DPhe⁴, Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida; Ipamorelina

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

Ejemplo 11

Comparación de actividad entre compuestos de tipo péptido derivados de grelina

Las actividades de liberación de Ca de los compuestos de tipo péptido derivados de grelina sintetizados en el Ejemplo 10 y el péptido de grelina natural se midieron de la misma manera que en el Ejemplo 1.

(1) Modificación de una cadena lateral de la 3^a serina

A. Posición del grupo octanoilo

La característica estructural significativa de la grelina recae en el grupo octanoilo del grupo hidroxilo de la 3^a serina. En primer lugar, se examinó si era o no ventajoso para presentar la actividad que la posición de la serina a octanoilar fuera la 3^a posición. En este examen, se usó como indicador la actividad de liberación de Ca intracelular en células CHO que expresan el receptor de GSH de rata.

ES 2 335 235 T3

Basándose en la grelina (1-9) amida (un derivado de grelina de cadena corta) cuyo valor de CE_{50} se mantenía a 5,4 nM, se sintetizaron [serina² (octanoil), serina³]-grelina (1-9) amida, [serina² (octanoil)]-grelina (1-9) amida y [N^o-octanoil, serina³]-grelina (1-9) amida, y se examinó su actividad de liberación de Ca intracelular.

5 Los resultados se resumen en la Tabla 4

Actividad del derivado de grelina 1

Compuesto Estructura	Actividad de liberación de Ca CE_{50} (nM)
1. Grelina humana GSS(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,3
2. Grelina de rata 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. [Ser²(Octanoil), Ser³]-Grelina (1-9)-amida H-Gly-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂	1,100
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	1,400
6. [N-Octanoil, Ser³]-Grelina (1-9)-amida C ₇ H ₁₅ CO-Gly-Leu-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂	>10.000

La actividad se redujo a aproximadamente 1/200 por transferencia de un grupo octanoílo desde la 3^a serina a la 2^a serina en grelina humana ($CE_{50} = 1.100$ nM).

45 El derivado que tiene grupos octanoílo tanto en la 2^a como en la 3^a posición también mostró una actividad reducida ($CE_{50} = 1.400$ nM).

Además, la actividad se había debilitado relativamente por N-octanoilación sólo en el grupo amino del extremo amino ($CE_{50} > 10.000$ nM).

50 A partir de estos resultados, se reveló que la posición del aminoácido modificado con un grupo octanoílo es particular y preferiblemente la 3^a posición en la molécula de grelina.

55 B. Longitud de cadena de un ácido graso

La actividad de liberación de Ca intracelular del derivado des-octanoílo obtenido a partir de grelina de rata por eliminación del grupo octanoílo de la cadena lateral de la 3^a serina fue de 3.500 nM en comparación con la actividad (2,6 nM) de la grelina octanoilada, y por lo tanto es evidente que el grupo octanoílo de la cadena lateral de la 3^a serina juega un papel muy importante en la expresión de la actividad.

65 Por consiguiente, se examinó la relación entre la actividad y el número de átomos de carbono en el grupo acilo de la cadena lateral de serina en la grelina de rata usando diversos ácidos grasos saturados. Es decir, se determinaron las actividades de liberación de Ca intracelular de los derivados de grelina donde el grupo hidroxilo de la 3^a serina se había acilado con un grupo acetilo (CH₃CO-), un grupo propionilo (CH₃CH₂CO-), un grupo butirilo (CH₃(CH₂)₂CO-), un grupo hexanoílo (CH₃(CH₂)₄CO-), un grupo decanoílo (CH₃(CH₂)₈CO-), un grupo lauroílo (CH₃(CH₂)₁₀CO-) y un grupo palmitoílo (CH₃(CH₂)₁₄CO-).

ES 2 335 235 T3

Actividad del derivado de grelina 2

5 10	Compuesto Estructura	Actividad de liberación de Ca CE ₅₀ (nM)
	7. [Ser³]-Grelina de rata GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	3.500
15	8. [Ser³(Acetil)]-rGrelina GSS(CO-CH ₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	780
20	9. [Ser³(Propionil)]-rGrelina GSS(CO-C ₂ H ₅)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	n.e.
25	10. [Ser³(Butiril)]-rGrelina GSS(CO-C ₃ H ₇)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	280
30	11. [Ser³(Hexanoil)]-rGrelina GSS(CO-C ₅ H ₁₁)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	16
35	12. [Ser³(Decanoil)]-rGrelina GSS(CO-C ₉ H ₁₉)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	1,7
40	13. [Ser³(Lauroil)]-rGrelina GSS(CO-C ₁₁ H ₂₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	2,4
	14. [Ser³(Palmitoil)]-rGrelina GSS(CO-C ₁₅ H ₃₁)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	6,5

En la tabla, "n.e." indica que la muestra no se ensayó.

La influencia de la longitud de la cadena del ácido graso sobre la actividad se ha hecho cada vez más significativa con un valor de CE₅₀ de 780 nM para los derivados de grelina que tienen un grupo acetilo (C2) y un valor de CE₅₀ de 280 nM para los derivados de grelina que tienen un grupo butanoilo (C4), y los derivados de grelina que tenían el grupo hexanoilo (C7) provocaron un aumento adicional en la actividad de liberación de Ca (valor de CE₅₀, 16 nM), y el grupo octanoilo de la grelina permitió que la actividad de liberación de Ca alcanzara un pico (valor de CE₅₀, 1,5 nM). Incluso los derivados de grelina que tenían el grupo decanoilo (C10) mantenían una actividad de liberación de Ca similar (valor de CE₅₀, 1,7 nM) a la de la grelina, y además el valor de CE₅₀ era de 2,4 nM para los derivados de grelina que tenían un grupo lauroilo (C12) y de 6,5 nM para los derivados de grelina que tenían un grupo palmitoilo (C16), indicando de este modo que la actividad de liberación de Ca se mantenía incluso si se aumentaba la longitud de la cadena de ácido graso.

C. Sustitución de diversos grupos acilo

Se prepararon derivados de grelina humana uniendo ácido 3-fenilpropiónico (HO-CO-CH₂CH₂Ph) como ejemplo típico de ácido graso aromático, ácido 3-octenoico (CH₃(CH₂)₃CH=CH-CH₂COH) como ejemplo típico de ácido graso insaturado o ácido 4-metilpentanoico ((CH₃)₂CH-CH₂CH₂CO₂H) como ejemplo típico de ácido graso ramificado, en lugar de ácido graso saturado, a través de un enlace éster al grupo hidroxilo de la 3^a serina, y se examinó su actividad.

D. Conversión en grupos alquilo

Convirtiendo el enlace éster químicamente inestable en un enlace éter o tioéter químicamente estable o similar, pueden formarse derivados de grelina químicamente estables. Sin embargo, sobra decir que el propósito para esta conversión es el mantenimiento de la actividad.

Por lo tanto, se examinaron un derivado éter de grelina humana donde la 3ª serina estaba octanoilada (C₈H₁₇) y un derivado tioéter de grelina de rata donde la 3ª serina se había reemplazado por cisteína y estaba octilada, para determinar su actividad.

Además, se prepararon un derivado de grelina humana en el que la 3ª serina estaba bencilada (-CH₂Ph) y un derivado de grelina humana en el que la 3ª serina se había reemplazado por cisteína y estaba tritiada (-C(Ph)₃).

Los resultados se resumen en la Tabla 6. Las actividades de liberación de Ca del derivado de grelina humana en el que la 3ª serina estaba bencilada (-CH₂Ph) y el derivado de grelina humana en el que la 3ª serina se había reemplazado por cisteína y estaba tritiada (-C(Ph)₃) se muestran como los Compuestos 67 y 68, respectivamente, en la Tabla 13. La actividad de liberación de Ca del derivado de grelina humana en el que se unió ácido 4-metil pentanoico ((CH₃)₂CH-CH₂CH₂CO₂H) a través de un enlace éster al grupo hidroxilo de la 3ª serina también se muestra como la del Compuesto 69 en la Tabla 13.

TABLA 6

Actividad del derivado de grelina 3

Compuesto	Actividad de liberación de Ca CE ₅₀ (nM)
15. [Ser³(3-Fenilpropionil)]-hGrelina Estructura GSS(CO-CH ₂ CH ₂ Ph)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,4
16. [Ser³(3 -Ootenoil)]-hGrelina GSS(CO-CH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ CH ₃)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,7
17. [Ser³(Octil)]-hGrelina GSS(C ₈ H ₁₇)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,2
18. [Cys³(Octil)]-rGrelina GSC(C ₈ H ₁₇)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	5,4

La introducción del grupo 3-octenoilo como un ejemplo de ácido graso insaturado en la cadena lateral de la 3ª serina produjo una actividad de liberación de Ca similar (CE₅₀ = 1,7 nM) a la actividad de los derivados de grelina que tienen un grupo octanoilo.

De manera interesante, incluso cuando se introdujo un grupo fenil propionilo, la actividad de liberación de Ca se mantuvo elevada (CE₅₀ = 1,4 nM), e incluso cuando se introdujo un grupo 4-metilpentanoilo (C6) como un ejemplo de ácido graso ramificado, el valor de CE₅₀ fue de 4,4 nM, indicando que la actividad de liberación de Ca se mantenía (Compuesto 69 de la Tabla 13), y revelando de esta manera que no siempre es necesario que el grupo acilo de la cadena lateral de la 3ª serina sea un grupo alcanóilo de cadena lineal.

Además, los valores de CE₅₀ de los derivados de éter y tioéter que se espera que sean químicamente estables, donde la 3ª serina o la 3ª cisteína estaban octanoiladas, se mantuvieron a 1,2 nM y 5,4 nM, respectivamente, revelando de esta manera que no siempre es necesario que la cadena lateral del resto aminoacídico de la 3ª posición sea un grupo acilo.

Además, los valores de CE₅₀ de las grelinas en las que el resto aminoacídico de la 3ª posición se reemplazó por Ser(Bzl) [es decir, el derivado de grelina humana en el que la 3ª serina estaba bencilada (-CH₂Ph)] o con Cys(Trt)

ES 2 335 235 T3

[es decir, el derivado de grelina humana en el que la 3ª serina estaba reemplazada por cisteína y tritilada (-C(Ph)₃)] eran de 7,6 nM y 20 nM, respectivamente, indicado de esta manera que la actividad de liberación de Ca se mantenía (Compuestos 67 y 68 de la Tabla 13).

5

(2) Determinación de la región activa

La actividad de liberación de Ca intracelular de grelina (16-28) que contenía la región carboxilo-terminal original era relativamente baja ($CE_{50} > 10.000$ nM), mientras que los valores de CE_{50} de la grelina humana (1-15) y de la grelina de rata (1-15) que contenían la región amino-terminal original eran de 7,0 nM y 8,6 nM, respectivamente, indicando de esta manera que la actividad de liberación de Ca intracelular se mantenía, y por lo tanto revelando que el sitio activo de la grelina está presente en la región amino-terminal (Tabla 7).

10

TABLA 7

15

Actividad del derivado de grelina 4

20

25

30

35

40

45

Compuesto Estructura	Actividad de liberación de Ca CE_{50} (nM)
19. Grelina (16-28) H-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg-OH	>10.000
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

Además, debido a que las actividades de las grelinas humana y de rata (1-15) eran prácticamente iguales, los restos aminoácidos de las posiciones 11 y 12 (arginil-valil- en la humana y -lisil-aranil- en la de rata) no se limitan a estos aminoácidos.

50

Los resultados de la correlación entre la estructura y la actividad, obtenidos usando grelina humana o de rata, pueden aplicarse a las grelinas de rata y humana, respectivamente.

55

Además, la [des-glutamina¹⁴]-grelina de rata preparada retirando la 14ª glutamina de la grelina mostraba una actividad de liberación de Ca ($CE_{50} > 1,5$ nM) similar a la de la grelina de rata, indicando que el aminoácido situado en el medio de la molécula de grelina puede deleccionarse.

60

(3) Longitud de la cadena peptídica e introducción de un grupo básico en el extremo carboxilo

Basándose en la grelina (1-15) que se descubrió que tenía una actividad relativamente fuerte, se preparó un derivado deleccionando de manera adecuada restos aminoácidos del extremo carboxilo de la grelina (1-15), y se evaluó su actividad.

65

En la Tabla 8 se presentan las actividades de los derivados de cadena corta que tienen un ácido carboxílico en el extremo carboxilo y los derivados de cadena corta amidados en el extremo carboxilo.

ES 2 335 235 T3

TABLA 8

Actividad del derivado de grelina 5

Compuesto	Actividad de liberación de Ca
Estructura	CE ₅₀ (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	>10.000

La actividad de liberación de Ca de la grelina (1-3) amida era relativamente baja (CE₅₀ >10.000 nM). El valor de CE₅₀ de grelina (1-4) que era grelina (1-3) a la que se había añadido fenilalanina era de 480 nM y el valor de CE₅₀ del derivado amida carboxilo-terminal de la misma era de 160 nM, revelando de esta manera que tenía una actividad de liberación de Ca significativa.

ES 2 335 235 T3

Además, la actividad de grelina (1-5) amida, que era grelina (1-4) a la que se le había añadido leucina amida era aproximadamente 26 veces ($CE_{50} = 6,2 \text{ nM}$) más alta que la de la grelina (1-4) amida, mostrando de esta manera una actividad de liberación de Ca al mismo nivel que la de la grelina natural.

5 La mayor actividad de liberación de Ca se encontró en la grelina (1-7) amida, y su valor de CE_{50} era casi equivalente al de la grelina natural.

10 Según el resultado anterior, el factor estructural esencial para expresar la actividad de la grelina podría atribuirse a la secuencia de los 4 restos amino-terminales, pero debido a su afinidad por el receptor de grelina o a que la transducción de señales se mejora espectacularmente por la adición de un resto tal como leucina en la 5ª posición, preferiblemente se añade un resto tal como leucina en la 5ª posición.

15 Como es evidente por el resultado anterior, la actividad de liberación de Ca tendía a aumentar por amidación del ácido carboxílico carboxilo-terminal.

20 Por ejemplo, la actividad de liberación de Ca ($CE_{50} = 5,4 \text{ nM}$) de la grelina (1 - 9) después de la amidación era aproximadamente 7 veces mayor que la actividad ($CE_{50} = 38 \text{ nM}$) antes de la amidación, y la actividad de liberación de Ca ($CE_{50} = 160 \text{ nM}$) de la grelina (1-4) después de la amidación era aproximadamente 3 veces mayor que la actividad ($CE_{50} = 480 \text{ nM}$) antes de la amidación. Además, la actividad de liberación de Ca ($CE_{50} = 13 \text{ nM}$) de la grelina (1-8) amida producida a partir de la grelina (1-9) amida retirando el resto 9 de histidina básico era menor que la actividad ($CE_{50} = 5,4$) de la grelina (1-9) amida, mientras que la actividad de liberación de Ca ($CE_{50} = 2,6 \text{ nM}$) de la grelina (1-7) amida producida retirando el ácido glutámico 8 como aminoácido ácido era mayor que la actividad ($CE_{50} = 13 \text{ nM}$) antes de la eliminación.

25 Un efecto de la amidación es neutralizar la carga negativa del ácido carboxílico, y el resultado anterior indica que la basicidad del aminoácido carboxilo-terminal en el derivado de cadena corta contribuye significativamente al aumento de actividad.

30 Basándose en este resultado, se prepararon derivados dotados de basicidad en el extremo carboxilo, que son similares a la grelina (1-7) amida que muestra alta actividad, y se examinó su actividad.

Los resultados se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

Actividad de derivado de grelina 6

Compuesto Estructura	Actividad de liberación de Ca CE_{50} (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	1.700

ES 2 335 235 T3

La actividad de liberación de Ca ($CE_{50} = 12$ nM) de la [lisina⁶]-grelina (1-6) amida que tenía lisina añadida en el extremo carboxilo de grelina (1-5) era ligeramente menor que la actividad ($CE_{50} = 4,8$ nM) de la grelina (1-5), mientras que la actividad de liberación de Ca ($CE_{50} = 10$ nM) de la grelina (1-4) que tenía lisina añadida en el extremo carboxilo era aproximadamente 50 veces mayor que la actividad ($CE_{50} = 480$ nM) antes de la adición. Además, la actividad de liberación de Ca ($CE_{50} = 1,1$ nM), respectivamente, del derivado de amida que tenía arginina o lisina añadida en el extremo carboxilo de la grelina (1-7) era mucho mas fuerte que la actividad ($CE_{50} = 2,6$ nM) de la grelina (1-7) amida.

Se reveló que en casi todos los casos, la actividad aumenta enmascarando la acidez en el extremo carboxilo y por la introducción de un grupo básico.

(4) Glicina amino-terminal y 2º resto de serina

Basándose en la grelina (1-7) amida ($CE_{50} = 2,6$ nM) [Compuesto 29 en la Tabla 8] o la grelina (1-9) amida ($CE_{50} = 5,4$ nM) [Compuesto 3 en la Tabla 4] que se descubrió que tenían actividad, se examinó la influencia sobre la actividad de la glicina amino-terminal y la 2ª serina.

Los resultados del resumen en la Tabla 10.

TABLA 10

Actividad del derivado de grelina 7

Compuesto Estructura	Actividad de liberación de Ca CE_{50} (nM)
40. [N-Aminopentanoil]-Grelina (3-7)-amida NH ² -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	3,4
41. [N-Acetil]-Grelina (1-10) CH ₃ CO-Gly-Ser-Ser-(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH	>10.000
42. [N-Tyr]-Grelina YGSS (CO-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	120
43. [N-Glicil]-Grelina (3-7)-amida H-Gly-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	380
44. [Leu²]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Leu-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	42
45. [His²]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-His-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	35
46. [Lys²]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Lys-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	24
47. [Gly²]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Gly-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	78

La actividad de N^o-acetil-grelina (1-10) donde el grupo amino-terminal de la grelina (1-10) estaba bloqueado era relativamente baja ($CE_{50} > 10.000$ nM). Como se ha descrito anteriormente, la actividad de la [N^o-octanoil, serina³]-grelina (1-9) amida (Compuesto 6 de la Tabla 1) también era relativamente baja ($CE_{50} > 10.000$ nM), y de esta manera el grupo amino del extremo amino preferiblemente no está bloqueado para expresar la actividad de liberación de Ca.

Por otra parte, la actividad de liberación de Ca de la N^o-aminopentanoil-grelina (3-7) amida donde la glicina amino-terminal y la 2ª serina se reemplazaron por ácido-5-amino-n-pentanoico (NH₂-(CH₂)₄-CO-) con una longitud de 2 restos casi se mantuvo ($CE_{50} = 3,4$ nM), la actividad de liberación de Ca de la [N^o-glicil]-grelina (3-7) amida de

ES 2 335 235 T3

la cual se había eliminado la 2ª serina era menor ($CE_{50} = 380$ nM), y la actividad de liberación de Ca de la [N-Tirosil]-grelina de rata que tenía un resto de tirosina añadido en el extremo amino de la grelina de rata era menor ($CE_{50} = 120$ nM), de forma que es preferible, para obtener una actividad más fuerte, que el grupo amino-terminal esté presente en una posición de una longitud de 2 restos desde el 3º resto de serina con octanoílo hasta el extremo amino.

Además, los valores de CE_{50} de los derivados de grelina (1-7) amida donde la 2ª serina se había reemplazado por leucina, glicina, histidina y lisina fueron 42 nM, 78 nM, 24 nM y 35 nM respectivamente, lo que indica una actividad de liberación de Ca ligeramente menor que la de la grelina (1-7) amida.

Como este resultado indica que el 2º resto de serina (-NH-CH(CH₂OH)-CO-) puede reemplazarse por la estructura parcial -CH₂-CH₂-CO- del ácido aminopentanoico, el 2º resto de serina actúa al menos como un espaciador para separar el grupo amino del extremo amino de la grelina una distancia predeterminada desde el 3º grupo octanoílo. La razón de que la actividad se mantuviera por el reemplazo del 2º resto de serina por ácido 5-aminopentanoico es que la basicidad del extremo amino aumentaba introduciendo su estructura de alquilamina.

En resumen, se considera que el grupo amino del resto de glicina amino-terminal confiere basicidad al extremo amino de la molécula de grelina, expresando de esta manera la actividad de la grelina y, por lo tanto, el grupo amino en el extremo amino preferiblemente no está bloqueado.

Además, se considera que el 2º resto de serina actúa como espaciador para separar el grupo amino en el extremo amino una distancia predeterminada desde el 3º grupo octanoílo, y por lo tanto el 2º resto de serina puede reemplazarse por un aminoácido o un compuesto no aminoacídico con una cadena lateral relativamente menos voluminosa. Es decir, la posición del grupo octanoílo en la molécula de grelina se define con respecto al grupo amino del extremo amino, y esta relación posicional constituye una parte de la estructura activa de la grelina.

Es decir, la cadena lateral del 2º aminoácido preferiblemente es relativamente menos voluminosa, tal como ocurre en la serina, alanina y norvalina, en lugar de un aminoácido que tiene una estructura voluminosa, y como 2º aminoácido se prefiere un resto aminoacídico que no restrinja la flexibilidad de los restos vecinos. Además, como la actividad de liberación de Ca de la N^α-aminopentanoil-grelina (3-7) amida casi se mantiene ($CE_{50} = 3,4$ nM), la 2ª serina puede reemplazarse por un compuesto no aminoacídico.

(5) Actividad óptica del 3º y 4º restos aminoacídicos

Basándose en la estructura de la grelina (1-7) amida, se prepararon derivados en los que la 3ª L-serina y la 4ª L-fenilalanina se habían reemplazado por los L-aminoácidos correspondientes, y se examinó la influencia que tiene la configuración del 3º y 4º aminoácidos sobre la actividad de liberación de Ca. Específicamente, basándose en la [Serina³ (octil)]-grelina (1-7) amida ($CE_{50} = 5,8$ nM) [Compuesto 50 en la Tabla 11] y la [cisteína³ (octil)]-grelina (1-7) amida ($CE_{50} = 7,4$ nM) [Compuesto 48 en Tabla 11] que mantenían una buena actividad, se prepararon sus derivados en los que se había reemplazado la 3ª serina y la 4ª fenilalanina por los L o D aminoácidos correspondientes.

Los resultados se resumen en la Tabla 11. A partir de estos resultados, tanto el 3º como el 4º aminoácido son preferiblemente L-aminoácidos.

TABLA 11

Actividad del derivado de grelina 8

Compuesto Estructura	Actividad de liberación de Ca CE_{50} (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	3.000
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	2.200

52. [^D Ser ³ (Octil)]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	>10.000
53. [^D Ser ³ (Octil), ^D Phe ⁴]-Grelina (1-7) -amida H-Gly-Ser- ^D Ser (C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	>10.000

10 (6) *Modo de unión de una cadena lateral en la 3ª posición*

Se prepararon derivados de grelina en los que el enlace éster original se reemplazó por un éster en la dirección inversa (Compuesto n° 54), una amida (Compuestos n° 55 y 56), un disulfuro (Compuesto n° 57) y metileno (Compuesto n° 58) de tal forma que la cadena lateral en la 3ª posición tuvo la misma longitud que la de la cadena de grelina (-CH₂-O-CO-C₇H₁₅). Además, se prepararon derivados de éster con impedimento estérico en el átomo de carbono-β del aminoácido en la 3ª posición (Compuestos n° 59 y 60) y un derivado amida en el que se habían extendido 3 unidades de metileno (Compuesto n° 61). Los resultados se resumen en la Tabla 12.

20 TABLA 12

Actividad del derivado de grelina 9

Compuesto	Actividad
Estructura	CE ₅₀ (nM)
54. [Asp ³ (O-Heptil)]-hGrelina GSD(O-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	5,1
55. [Asp ³ (NH-Heptil)]-hGrelina GSD(NH-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	11
56. [Dap ³ (Octanoil)]-hGrelina GS-NH- ^L CH(CH ₂ NHCO-C ₇ H ₁₅)-CO- FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2,6
57. [Cys ³ (S-Heptil)]-hGrelina GSC(S-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,4
58. [Adod ³]-hGrelina GS-NH-CH(n-C ₁₀ H ₂₁)-CO-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	0,91
59. [Thr ³ (Octanoil)]-hGrelina GST(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	10
60. [Leu ² , Thr ³ (Octanoil)]-hGrelina GLT(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	46
61. [Lys ³ (Octanoil)]-hGrelina GSK(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	32

La actividad del Compuesto 58, donde la cadena lateral en la tercera posición se había reemplazado por unidades de metileno exclusivamente, mostró la mayor actividad (valor de CE₅₀ = 1 nM o menor). La actividad de otros derivados varió dependiendo del tipo de enlace, pero se confirmó que el modo de unión de una cadena lateral del aminoácido 3 no ejerce una influencia significativa sobre la actividad.

ES 2 335 235 T3

(7) *Hidrofobia de una cadena lateral en la 3ª posición*

Se prepararon derivados en los que en grupo 3 de Ser (octanoílo) se había reemplazado por un aminoácido hidrófobo del que la mayor parte era un aminoácido natural, y se examinó su actividad. Los resultados se resumen en la Tabla 13.

TABLA 13
Actividad de derivados de grelina 10

Compuesto	Actividad
Estructura	CE ₅₀ (nM)
62. [Trp³]-hGrelina GSWFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	31
63. [Phe³]-hGrelina GSFFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2.000
64. [Cha³]-hGrelina GS-Cha-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	19
65. [2-^LNal³]-hGrelina GS- ^L Nal-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	8,2
66. [2-^DNal³]-hGrelina GS- ^D Nal-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	>10.000
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	4.400
71. [Ile³]-hGrelina GSIFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	>10.000
72. [Lys³]-hGrelina GSKFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	120
73. [Nle³]-hGrelina GS-Nle-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2.800
74. [Val³]-hGrelina GSVFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.600

Los valores de CE₅₀ de los derivados que tenían un aminoácido hidrófobo aromático tal como triptófano, ciclohexil alanina o naftil alanina en la 3ª posición fueron 31 nM, 19 nM y 8,2 nM respectivamente, lo que indica que se mantuvo la actividad de liberación de Ca. Inesperadamente, cuando se introdujo fenil alanina en la 3ª posición, la actividad de liberación de Ca era ligeramente baja, pero incluso cuando se introdujo el aminoácido Ser (Bzl) o Cys (Tritilo) más hidrófobo en la 3ª posición, la actividad de liberación de Ca se mantuvo en un nivel similar, y de esta forma se confirmó que la hidrofobia de la cadena lateral en la 3ª posición es más preferible para expresar la actividad.

ES 2 335 235 T3

Por una parte, cuando se introdujo un aminoácido hidrófobo alifático tal como leucina, isoleucina, norleucina o valina en la 3ª posición, generalmente se mantuvo la actividad de liberación de Ca de los derivados, pero ligeramente por debajo de la de los derivados que introducen el aminoácido aromático. La actividad del Compuesto 73 que tenía norleucina en la 3ª posición era $CE_{50} = 2.800$ nM, mientras que la actividad de la 6-amino-norleucina (lisina; Compuesto 72) que tenía un grupo amino añadido a una cadena lateral de norleucina aumentó a 120 nM en términos de los valores de CE_{50} , de forma que se confirmó que similar a la basicidad del extremo carboxilo descrita anteriormente, también es preferible la basicidad de una cadena lateral en la 3ª posición.

10 (8) Derivados de grelina de cadena corta

Como se ha descrito anteriormente, se descubrió que un fragmento de grelina de los aminoácidos amino-terminales 1 a 4 muestra una actividad significativa y esta actividad se aumenta adicionalmente añadiendo leucina en la 5ª posición a dicho fragmento; el 3º resto aminoacídico preferiblemente es el que tiene una cadena lateral hidrófoba; la actividad aumenta introduciendo un resto básico; y los restos aminoacídicos 1 y 2 pueden remplazarse por un compuesto no aminoacídico con una longitud de 2 restos, tal como un δ -aminoácido. Basándose en estos resultados, se prepararon diversos derivados de grelina de cadena corta basados en la región amino-terminal (1-5) como se muestran en los Compuesto nº 76 a 87 en las Tablas 14 y 15, y se examinaron sus actividades. Los resultados se resumen en las Tablas 14 y 15.

20 El Compuesto 80 es conocido (Ipamorerin; K. Raum *et al.*, Eur. J. of Endocrinol., 139: 552-561, 1998).

TABLA 14

Actividad del derivado de grelina 11

Compuesto	Actividad
Estructura	CE_{50} (nM)
75. [Lys⁷]-Grelina (1-7)-amida H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Lys-NH ₂	11
76. [N-Aminopentanoil, Ser³(Octil), Lys⁵]-Grelina (3-5)-amida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Lys-NH ₂	12
77. [N-Aminopentanoil, ^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	1.600
78. [Aib¹, His², Ser³(Octil), Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida H-Aib-His-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Lys-NH ₂	34
79. [Aib¹, His², Ser³(Octil), ^DPhe⁴-Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida H-Aib-His- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Lys-NH ₂	38
80. [Aib¹, His², ^DNal³, ^DPhe⁴, Lys⁵]-Grelina (1-5)-amida H-Aib-His- ^D Nal- ^D Phe-Lys-NH ₂	2,5

Como la actividad de liberación de Ca del Compuesto 80 conocido era elevada (2,5 nM), también se examinó la actividad del Compuesto 79 derivado del Compuesto 80 reemplazando 2-D-naftil alanina en la 3ª posición por D-octil serina, y como resultado, su valor de CE_{50} fue 38 nM, lo que indica que se mantenía la actividad. El Compuesto 77 que tenía D-octil serina y D-fenil alanina en la 3ª y 4ª posiciones, que tiene la misma estructura de aminoácidos que el Compuesto 79 con la excepción de los aminoácidos 1 y 2, mostró una actividad menor (1.600 nM), y estos resultados indican que la secuencia o estructura de los aminoácidos 1 y 2 también afecta a la configuración estérica de las cadenas laterales del 3º y 4º aminoácidos importantes para presentar la actividad.

ES 2 335 235 T3

Es decir, en el caso en el que los aminoácidos 1 y 2 se reemplazaran por ácido aminopentanoico, la actividad se mantuvo a 34 nM incluso si la 2-D-naftil alanina en la 3^a posición y la D-fenil alanina en la 4^a posición se reemplazaban por sus L-aminoácidos correspondientes (Compuesto 78), y de esta manera la secuencia aminoacídica (Gly-Ser) en la 1^a a 2^a posiciones en la grelina requiere la configuración L para los aminoácidos 3 y 4, pero incluso si los aminoácidos 3 y 4 tienen la configuración D, la actividad se hace significativa introduciendo otra secuencia aminoacídica tal como Aib-His. También se confirmó que independientemente de la configuración L o D en la 3^a y 4^a posiciones, la actividad se expresa por introducción de ácido aminopentanoico en la 1^a y 2^a posiciones.

TABLA 15

Actividad del derivado de grelina 12

Compuesto	Actividad
Estructura	CE ₅₀ (nM)
81. [N-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-amida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH ₂	11
82. [N-Aminopentanoil, 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-Aminopentanoil, 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-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5)-bencilamida NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅	98
85. [N-Aminopentanoil, 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-Aminopentanoil, 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 ₁₇)F- ^D L-SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	220

Usando [N-Aminopentanoil, Ser³(Octil)]-Grelina (3-5) basándose en la región amino-terminal (1-5) de la grelina, se examinó la correlación entre la actividad y la estructura en la región carboxilo-terminal. La actividad de sus derivados donde la leucina carboxilo-terminal en la 5^a posición se había modificado con amida, metilamida, etilamida o bencilamida se mantuvo, pero tendía a reducirse como se muestra por los valores de CE₅₀ de 11 nM, 12 nM, 22 nM y 98 nM, respectivamente. Por otra parte, reemplazando etilamida por aminoetilamida, la actividad aumentó como se muestra por un valor de CE₅₀ de 3,5 nM, revelando de esta manera que es preferible impartir basicidad al extremo carboxilo de la molécula de grelina.

Estos diversos derivados de amida carboxilo-terminales son compuestos útiles debido a su resistencia *in vivo* a la descomposición con carboxi peptidasas. El Compuesto 86 (CE₅₀ = 86 nM) que contenía N-metilaminoácido también es un compuesto útil debido a su resistencia a las enzimas.

Ejemplo 12

Actividad de liberación de GH de derivados de grelina en rata

(1) Actividad de liberación de GH de diversos derivados de grelina de cadena larga en rata

Se administraron 18 nmol/kg del Compuesto 17 ([Ser³(Octil)]-hGrelina), 30 nmol/kg del Compuesto 18 ([Cys³(Octil)]-rGrelina), 100 nmol/kg del Compuesto 65 ([^{2-^L}NaI³]-hGrelina), o 18 nmol/kg del Compuesto 15 ([Ser³(3-

ES 2 335 235 T3

Fenilpropinil)]-hGrelina) rápidamente y por vía intravenosa en ratas IGS-SD (de aproximadamente 7 semanas de edad) con anestesia con Nembutal para cada muestra (n=3). Quince minutos después de la administración, se recogió el plasma y la concentración de GH en plasma se midió por radioinmunoensayo (Biotrak/Amersham). Por separado, se administró albúmina de suero bovino (BSA)-solución fisiológica salina al 0,2%, 6 nmol/kg de rGrelina y hGrelina, u 80 nmol/kg de Ipamorelina (Compuesto 80) en otras ratas como control, respectivamente, y se compararon las concentraciones de GH en plasma en 15 minutos después de la administración (para cada muestra n=3).

Los resultados se muestran en la Tabla 13. El Compuesto 17 (Ser³(Octil)]-hGrelina), el Compuesto 18 ([Cys³(Octil)]-rGrelina) y el Compuesto 15 ([Ser³(3-PhPrI)]-hGrelina) presentaron una fuerte actividad de liberación de GH y la actividad de liberación de GH de [2-^LNaI³]-hGrelina mostró una buena correlación con la actividad de liberación de Ca intracelular.

TABLA 16

Actividad de liberación de GH de diversos derivados de grelina de cadena larga

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Compuesto administrado	Valor de CE ₅₀ (nM)	Dosis (nmol/kg)	Nivel de GH en plasma en 15 minutos después de la administración (ng/ml)			
			Rata 1	Rata 2	Rata 3	M± S.D.
Solución fisiológica salina	-	-	32	52	59	49 ±12
hGrelina	1,3	6	1802	1613	2203	1873 ±301
rGrelina	1,5	6	2056	1082	1205	1448 ±530
Ipamorelina (Compuesto 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- ^L NaI ³]-hGrelina	8,2	100	1637	1576	1357	1524 ±147

ES 2 335 235 T3

(2) Cambio de GH en plasma por la administración de [Cys³(Octil)]-grelina de rata

Después de administrar el Compuesto 18 ([Cys(Octil)]-grelina de rata) por vía intravenosa en una dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{cabeza}$ en ratas macho de la cepa Wistar (de aproximadamente 260 a 280 g) con anestesia con Nembutal, se midió la GH liberada en la sangre. También se administraron solución fisiológica salina como control y grelina de rata (5 $\mu\text{g}/\text{cabeza}$) y se compararon con el Compuesto 18.

Como se muestra en las Tablas 17 a 19, la actividad de promotora de la secreción de GH de [Cys³(Octil)]-grelina de rata fue equivalente a la de la grelina natural (es decir, la C_{max} de la GH secretada fue de aproximadamente 1.100 ng/ml para las dos grelinas) y además el tiempo de secreción tendía a prolongarse. La actividad de liberación de Ca intracelular del Compuesto 18 fue de 5,4 nM en términos de CE_{50} .

TABLA 17

Cambio del nivel de GH en plasma por medio de la administración de [Cys³(Octil)]-grelina de rata

Cys(C18) ³ - grelina de rata 5 $\mu\text{g}/\text{cabeza}$		Tiempo (min)						
		0	5	10	15	20	30	60
Nivel de GH en plasma (ng/ml)	Rata 1	377	338	687	927	900	469	98
	Rata 2	101	294	258	300	358	245	86
	Rata 3	59	476	949	1229	1417	704	133
	Rata 4	33	530	959	1451	1299	800	220
	Rata 5	32	613	1060	1561	1359	726	122
Media \pm S.D.		120 \pm 146	450 \pm 133	783 \pm 324	1093 \pm 506	1067 \pm 445	589 \pm 229	132 \pm 53

TABLA 18

Cambio del nivel de GH en plasma por la administración de solución fisiológica salina

solución fisiológica salina		Tiempo (min)						
		0	5	10	15	20	30	60
Nivel de GH en plasma (ng/ml)	Rata 1	0	88	129	133	116	107	430
	Rata 2	204	122	118	134	128	69	36
	Rata 3	77	0	0	0	0	0	11
	Rata 4	0	0	0	0	48	27	110
	Rata 5	0	0	0	0	0	0	210
Media \pm S.D.		56 \pm 89	42 \pm 58	49 \pm 67	53 \pm 73	58 \pm 61	41 \pm 47	159 \pm 170

ES 2 335 235 T3

TABLA 19

Cambio del nivel de GH en plasma por la administración de grelina de rata

Grelina de rata 5 µg/cabeza		Tiempo (min)						
		0	5	10	15	20	30	60
Nivel de GH en plasma (ng/ml)	Rata 1	143	186	425	405	215	56	3
	Rata 2	10	1396	2028	1566	876	242	27
	Rata 3	838	163	443	681	419	120	36
	Rata 4	348	556	1387	1469	1293	663	100
	Rata 5	0	875	1380	1009	1414	452	20
Media ± S.D.		268 ± 348	635 ± 517	1133 ± 690	1026 ± 498	843 ± 525	306 ± 250	37 ± 37

Ejemplo 13

Acción de aumento del apetito de la grelina

(1) *Acción de aumento del apetito por medio de la administración en el ventrículo*

Se administró solución fisiológica salina que contenía grelina de rata a diversas concentraciones a las 8:45 a.m. en ventrículos cerebrales de ratas macho de la cepa Wistar (de 16 a 20 animales por grupo), que pesaban de 300 a 325 g. Como control, se administró solución fisiológica salina sin grelina en los ventrículos. Después de la administración, se dejó que las ratas se alimentaran *ad libitum* y se midió la cantidad de pienso tomado durante las 2 horas posteriores a la administración. Como se muestra en la Fig. 6, se observó un aumento en la cantidad de pienso consumido en las ratas que recibieron 50 pmol de grelina por vía intracerebroventricular, y se observó un aumento dependiente de la dosis en la cantidad de pienso consumido en las ratas que recibieron 200 pmol y 500 pmol de grelina, pero la cantidad de pienso consumido se redujo en las ratas que recibieron 2 nmol de grelina. Habitualmente, las ratas toman el pienso por la noche, de forma que por la mañana, la rata tiene el estómago lleno y rara vez consume pienso (véase la rata que recibió solución fisiológica salina como control en la Fig.6), y por lo tanto el aumento en la cantidad de pienso consumido por la administración de grelina dentro del ventrículo cerebral indica que la grelina tiene una acción de aumento del apetito.

(2) *Acción de aumento del apetito por medio de la administración intravenosa*

Se administraron por vía intravenosa 50 µg/kg de grelina de rata en las venas de la cola en ratas SD (Sprague-Dawley) macho de 9 meses de edad (5 animales) y ratas Wistar (4 animales), y se midió la cantidad de pienso consumido durante las 2 horas posteriores a la administración (evaluado durante 16:00 a 19:00 p.m.). Como se muestra en la tabla 20, la cantidad de pienso consumido aumentó evidentemente por medio de la administración intravenosa de grelina, en comparación con la cantidad de pienso consumido y sin la administración de grelina de rata, que se determinó usando el mismo animal a la misma hora otro día. Es decir, se demostró que la grelina tiene una acción de aumento del apetito incluso por medio de la administración intravenosa

ES 2 335 235 T3

TABLA 20

Cepa	Rata N°	Cantidad de pienso consumido (g)	
		Administración de grelina	Sin administración 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
	Media	3,1	1,1
	S.D.	0,4	0,8
Wistar	6	2,3	0,2
	7	1,9	1,4
	8	1,6	0,1
	9	2,1	0,3
	Media	2,0	0,5
	S.D.	0,3	0,6

Ejemplo 14

Aumento de las funciones gástricas por grelina

Para examinar el efecto de la grelina sobre las funciones gástricas, se realizó el siguiente experimento. Se dejaron en ayunas durante 20 horas o más ratas de la cepa SD macho (de 7 a 8 semanas de edad, que pesaban de 200 a 280 g) y después se usaron en el experimento. Las ratas se anestesiaron por medio de la administración intraperitoneal de uretano (1,25 g/kg) y se mantuvieron calientes usando una manta calefactora y una luz calefactora. Se insertó una cánula traqueal y se realizó una ligadura en el esófago con hilo de seda, y cada rata se sometió a la siguiente operación para medir la secreción de ácido gástrico o la motilidad gástrica. En el experimento usando el animal consciente, la rata se sometió a la operación para medir la secreción de ácido gástrico o la motilidad gástrica con anestesia ligera por inhalación de éter.

En el experimento para la secreción de ácido gástrico con anestesia con uretano, la operación se realizó de acuerdo con el método propuesto por Ohno *et al.* [Ohno, T., *et al.*, *Jpn. J. Pharmacol.* 43, 429-439 (1987)]. En resumen, se realizó una incisión en el abdomen en posición supina y se expusieron el estómago y el duodeno. Se insertó un tubo de polietileno en la parte frontal del estómago para preparar una fístula estomacal aguda. Se insertó otro tubo de polietileno en el estómago después de escindir el duodeno y la parte circundante del píloro se ligó y fijó. El interior del estómago se sometió a infusión con solución fisiológica salina que se ajustó a pH 7,0 en un depósito y se calentó a 37°C. El caudal fue de 1,0 ml/min. El líquido de infusión se ajustó a pH 7,0 por valoración con NaOH 100 mM usando una unidad de fijación del pH (Hiranuma, Comitite-8). Después de confirmar que una cantidad básica de secreción de ácido gástrico era estable, se administró vía por intravenosa el agente químico de ensayo y se midió la velocidad de secreción de ácido gástrico a intervalos de 5 minutos. En cada grupo se usaron 4 ratas.

En el experimento durante la excitación, la rata se sometió a la misma operación con anestesia ligera por inhalación de éter y después se realizó un corte pequeño en el costado, y se extrajo el tubo de infusión del cuerpo. El estómago expuesto y el duodeno se pusieron de nuevo en el abdomen y el sitio escindido se saturó, y el animal se dejó en ayunas mientras reposaba sobre la parte dorsal en una jaula de sujeción de ratas de tipo Ballman, y después de confirmar que la rata se había recuperado de la anestesia, se sometió al experimento. El esófago estaba ligado, pero no se había insertado una cánula traqueal.

En el experimento para medir la motilidad del estómago con anestesia con uretano se usó un método de globo miniaturizado de acuerdo con el método propuesto por Takeuchi & Nobuhara [Takeuchi, K. y Nobuhara, Y., *Digestive Diseases and Sciences* 30, 1181-1188 (1985)]. Es decir, un globo relleno con agua y un catéter de soporte se insertaron en el estómago después de escindir la parte frontal del estómago. Se fijó en una glándula de la línea del estómago y un extremo del catéter se conectó a un transductor de presión (LPU-0.1-350-0-II, de Nihon Kohoden Corporation). Después de confirmar que la motilidad gástrica era estable, se administró por vía intravenosa el agente químico de ensayo acumulativamente a intervalos de 60 minutos. Para la motilidad gástrica, se midieron a intervalos de 10 minutos la amplitud de la presión interna en el estómago y el número de reacciones de contracción en la motilidad de contracción con una amplitud de 20 cm de H₂O o más. En cada grupo se usaron cuatro animales. En el experimento que usa animales conscientes, la rata se sometió a la misma operación con anestesia ligera por inhalación de éter y después se suturar el sitio de las escisión, el animal se dejó en ayunas en la posición boca abajo en una jaula de sujeción de ratas de tipo Ballman. Después de confirmarse que la rata se había recuperado de la anestesia, el animal se sometió al experimento.

Se disolvieron grelina de rata y dihidrocloruro de histamina en solución fisiológica salina y se administraron en una dosis de 1 ml/kg en la vena de la cola. Para examinar si la acción del nervio vago está implicada en la acción de la grelina, se administró por vía subcutánea sulfato de atropina 30 minutos antes de la administración de grelina, o se cortaron bilateralmente haces cervicales del nervio vago. Para examinar la implicación del receptor de histamina H₂ en la acción de la grelina, se administró por vía subcutánea famotidina (Gaster®, producida por Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.) 30 minutos antes de la administración de grelina. Los resultados se muestran en media ± error típico. El análisis estadístico se realizó usando ensayos de comparación múltiple de Dunnett. Un valor P < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Como se muestra en la Fig. 7A y en la Tabla 21, la secreción del ácido gástrico se promovió de una manera dependiente de la dosis tras la administración intravenosa de grelina de rata en una dosis de 0,8 a 20 µg/kg en la rata con anestesia con uretano.

En la rata anestesiada, apenas se observó una motilidad espontánea del estómago antes de la administración de grelina. Cuando a las ratas se le administró por vía intravenosa grelina en una dosis de 0,8 a 20 µg/kg en este estado, se promovieron tanto la amplitud como la frecuencia de la motilidad gástrica como se muestra en la Fig. 8A y B y en la Tabla 21. Estas reacciones se observaron inmediatamente después de la administración de grelina de rata. Por medio de la administración de 20 µg/kg, la secreción de ácido gástrico aumentó y alcanzó el nivel máximo en 20 minutos y se redujo gradualmente durante los 90 minutos posteriores a la administración. Como se muestra en la Fig. 7A y B, la reacción máxima en la acción de promoción de la secreción de ácido gástrico por la administración de 20 µg/kg de grelina de rata fue casi comparable con la reacción inducida por la administración intravenosa de 3 mg/kg de histamina. La acción de promoción de la amplitud de motilidad gástrica alcanzó la reacción máxima en 10 minutos a cualquier dosis, y por medio de la administración de 20 µg/kg de grelina, la acción se redujo gradualmente hasta 50 minutos después de la administración.

Además, como se muestra en la Tabla 21, la acción de promoción de la secreción gástrica inducida por la administración de 20 µg/kg de grelina de rata se inhibió casi completamente por el pretratamiento con atropina o vasotomía cervical bilateral, pero esta acción no se vio afectada por el pretratamiento de la administración subcutánea de 1 mg/kg de famotidina, es decir, un antagonista del receptor de histamina H₂. Además, la acción de promoción de la motilidad gástrica inducida por la administración de grelina de rata se inhibió completamente por pretratamiento con atropina o vagotomía cervical bilateral. Por estos resultados, se confirmó que la acción de promoción de la grelina sobre las funciones gástricas no se realiza a través de un mecanismo histaminérgico, sino por la activación del sistema del nervio vago.

Por medio de la administración intravenosa de grelina de rata (4 y 20 µg/kg), se promovió la secreción de ácido gástrico en la rata consciente de la misma manera que en la rata con anestesia con uretano. En comparación con la rata con anestesia, la rata consciente tuvo una motilidad gástrica espontánea antes de la administración del agente químico de ensayo, e incluso en este estado por medio de la administración de 0,8 a 20 µg/kg de grelina de rata a la rata, la motilidad gástrica se promovió junto con su amplitud y frecuencia. A partir del resultado anterior, se confirmó que por medio de la administración intravenosa de grelina, se produce la promoción de la secreción de ácido gástrico y la promoción de motilidad gástrica no sólo en la rata anestesiada, sino también en la rata consciente.

ES 2 335 235 T3

TABLA 21

Tratamiento		Secreción de ácido gástrico (μ equivalente 60 min)	Motilidad gástrica	
			Frecuencia (veces/60 min)	Amplitud (cm de H ₂ O/60 min)
Solución fisiológica salina		17,6 \pm 1,2	1,3 \pm 1,0	1,7 \pm 1,0
Grelina de rata	0,8 μ g/kg por inyección i.v	24,5 \pm 2,2	35,5 \pm 18,1	6,7 \pm 4,4
	4 μ g/kg por inyección i.v.	23,5 \pm 2,6	60,8 \pm 25,6	11,1 \pm 5,3
	20 μ g/kg por inyección i.v.	43,3 \pm 4,6 (*1)	100,5 \pm 20,4 (*1)	21,8 \pm 2,5 (*1)
Inyección intravenosa de 20 μ g/kg de grelina de rata	+atropina 1 mg/kg por administración subcutánea	26,1 \pm 3,9 (*2)	0 (*3)	0 (*3)
	+ eliminación de nervio vago	18,4 \pm 3,7 (*3)	0 (*3)	0 (*3)
	+famotidina 1 mg/kg por administración subcutánea	43,0 \pm 4,2	NT	NT

Los símbolos de la tabla indican:

*1, $p < 0,01$; *2, $p < 0,05$; y *3, $p < 0,01$

NT: No ensayado

Ejemplo 15

Acción de la grelina y derivados de grelina de promoción del crecimiento celular

Para examinar la acción de la grelina administrada sobre la promoción del crecimiento celular, se realizó el siguiente experimento. Se administraron 20 μ g/kg de grelina de rata o grelina de rata de tipo tioéter (Compuesto 18 [Cys³ (octil)]-hGrelina) en venas de la cola de ratas Wistar macho (de 7,5 semanas de edad) respectivamente. Diecisiete horas después de la administración, se administró ³H-timidina en las venas de la cola y una hora después se escindieron el duodeno, el yeyuno y la médula ósea. Se midió la incorporación de ³H-timidina a las fracciones de ADN de estos tejidos para examinar la acción de promoción del crecimiento celular de la grelina y de los derivados de grelina. Los tejidos se cortaron en secciones finas y se homogeneizaron usando un homogeneizador Polytron y, después de la centrifugación, el sobrenadante se precipitó con ácido tricloroacético para dar una fracción de ADN. La radiactividad de la fracción de ADN se midió por un contador de centelleo de líquidos.

ES 2 335 235 T3

Como se muestra en la Tabla 22, la incorporación de ^3H -timidina en estos tejidos u órganos aumentó por medio de la administración intravenosa de grelina de rata o grelina de rata de tipo tioéter, y de esta manera se confirmó que la grelina presenta una acción de promoción del crecimiento celular en el duodeno, yeyuno y médula ósea.

5 La evolución a lo largo del tiempo de la acción promotora del crecimiento de las células después de la administración intravenosa de grelina fue similar a la observada después de la administración de GHRH (hormona de liberación de la hormona del crecimiento), de forma que se consideró que la acción de promoción del crecimiento celular de la grelina se realiza a través de la GH (hormona del crecimiento) secretada principalmente por la pituitaria. Se consideró que la regulación de la secreción de GH por grelina como factor fisiológico es razonable para la regulación del organismo, y hay menos efectos adversos que se podrían producir por la administración de GH.

TABLA 22

	Ejemplo Comparativo	Grelina de rata	Grelina de tipo tioéter
15			
20	Médula ósea (en tejidos)	100,0 ± 17,8%	141,7 ± 30,1%
25	Duodeno (en fracción de ADN)	100,0 ± 14,2%	136,0 ± 17,8%
30	Yeyuno (en fracción de ADN)	100,0 ± 6,8%	159,0 ± 7,5%
			144,5 ± 16,5%
			114,0 ± 11,7%
			151,0 ± 23,6%

35 Los valores numéricos muestran la relación (%) de incorporación del radioisótopo con respecto a la media (por triplicado) del ejemplo comparativo (es decir, el grupo que recibió solución fisiológica salina).

40 Ejemplo 16

Cuantificación de grelina por anticuerpo anti-grelina

45 Usando anticuerpos inducidos contra péptidos de grelina de rata amino- y carboxilo-terminales como antígenos, se cuantificó la grelina en diversos tejidos vivos por radioinmunoensayo (RIA).

50 Se inmunizaron conejos con [C-Cys]-grelina de rata [1-11] (péptido de grelina de rata de aminoácidos 1 a 11 desde el extremo amino que tiene cisteína unida a su extremo carboxilo) y [C-Cys]-grelina de rata [13-28] (péptido de grelina de rata de los aminoácidos 13 a 28 desde el extremo amino que tiene cisterna unida a su extremo carboxilo) como antígenos, para formar el anticuerpo amino-terminal (anti-antígeno [C-Cys]-grelina de rata [1-11]) y el anticuerpo carboxilo-terminal (anti-antígeno [C-Cys]-grelina de rata [13-28]) respectivamente.

55 Como se muestra en la Fig. 9A, la CI_{50} (concentración inhibidora de 50%) de la grelina de rata fue de 3,1 fmol en la unión entre la grelina de rata marcada con radioisótopo y el anticuerpo amino-terminal. Este anticuerpo amino-terminal, aunque muestra una reactividad cruzada de 100% con la grelina de rata y la grelina humana sintetizada químicamente, mostró sólo una reactividad cruzada de 0,3% con n-hexanoil-grelina de rata donde la tercera serina se había modificado con un grupo n-hexanoilo y una reactividad cruzada de 20% con n-decanoil-grelina de rata donde la 3ª serina se había modificado con un grupo n-decanoilo. Además, el anticuerpo amino-terminal no reaccionaba con la grelina de la que se retiró el ácido graso.

60 El anticuerpo amino-terminal mostró una afinidad similar por grelina de rata (28 aminoácidos), grelina humana (28 aminoácidos), y grelina-27 (grelina consistente en 27 aminoácidos) encontrada en humano y rata. Por consiguiente, se confirmó que el anticuerpo amino-terminal reconoce específicamente la grelina natural en la que la 3ª serina se modificó con un grupo N-octanoilo.

65 Como se muestra en la Fig. 9b, la grelina de rata natural modificada con un grupo n-octanoilo y la grelina de rata modificada por eliminación del n-octanoilo de la grelina de rata natural, mostró un valor de CI_{50} similar de 44 fmol en la unión entre la grelina de rata marcada con radioisótopo y el anticuerpo carboxilo-terminal. Es decir, se confirmó

ES 2 335 235 T3

que el anticuerpo carboxilo-terminal tiene la misma afinidad por la grelina modificada con ácido graso y por la grelina de la que se retiró el ácido graso.

Estos resultados revelaron que, con respecto a las grelinas que se producen en diversos tejidos en un organismo vivo, la grelina en la que la tercera serina se había modificado con un grupo n-octanoílo puede cuantificarse por el anticuerpo amino-terminal, mientras que tanto la grelina modificada con ácido graso como la grelina de la que se retiró el ácido graso pueden cuantificarse por el anticuerpo carboxilo-terminal.

La Tabla 23 muestra el resultado del examen del contenido de la grelina modificada con ácido graso y el contenido de grelina modificada con ácido graso y grelina de la que se retiró el ácido graso en diversos tejidos en un organismo vivo.

TABLA 23

Tejidos	Cantidad de grelina de rata que reacciona con anticuerpo (fmol/mg de tejidos)	
	C-RIA	N-RIA
Hipotálamo	1,8 ± 0,3	<0,05
Pituitaria	8,5 + 3,1	<0,05
Tiroides	3,5 ± 2,0	<0,05
Glándula mandibular	8,8 ± 1,3	<0,05
Timo	3,5 ± 0,4	<0,05
Glándula suprarrenal	3,1 ± 0,4	<0,05
Aurícula	2,3 ± 0,2	0,07 ± 0,01
Ventrículo	2,1 ± 0,1	<0,05
Aorta	2,4 ± 0,7	0,14 ± 0,03
Pulmón	3,1 ± 0,4	<0,05
Hígado	2,8 ± 0,5	<0,05
Páncreas	2,6 ± 0,6	0,15 ± 0,05
Estómago	1779,8 + 533,9	377,31+-55,83
Duodeno	106,7 ± 7,3	20,57 ± 0,69
Yeyuno	60,2 ± 17,2	10,73 ± 5,44
Íleon	20,5 ± 5,1	0,16 ± 0,08
Ciego	15,1± 2,5	1,70 ± 5,44
Colon	10,4 ± 0,7	<0,05
Riñón	5,4 ± 0,3	<0,05
Esperma	2,8 ± 0,2	<0,05
Plasma (1 ml)	219,6 ± 71,8	4,02 ± 1,91

En la tabla, C-RIA indica el resultado de la cuantificación por radioinmunoensayo usando el anticuerpo carboxilo-terminal, mientras que N-RIA indica el resultado de la cuantificación por el anticuerpo amino-terminal.

Los valores numéricos de la tabla indican “media ± desviación típica”

Ejemplo 17

*Producción de grelina de rata (1-28) por un método de semisíntesis*5 *Esquema de síntesis*

En este ejemplo, se produjo rGrelina a partir de fragmentos de rGrelina (6-28) y Grelina (1-7) previamente preparados por un método de ingeniería genética y síntesis química respectivamente, como se indica a continuación.

10 Específicamente, se expresó en *E. coli* β -galactosidasa 97S-(QFE-SRHRR)-rGrelina (6-28), es decir, una proteína de fusión de β -galactosidasa 97S y -rGrelina (6-28) entre las cuales había una secuencia aminoacídica (-QFE-SRHRR-) que tiene un sitio escindido por la proteasa V8 y la proteasa KexII. Esta proteína de fusión se trató con la proteasa V8, para cortar la SRHRR rGrelina (6-28). Después, todos los grupos amino de la SRHRR rGrelina (6-28) se protegieron con grupos Boc, y el péptido resultante se trató con proteasa KexII para dar [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) a
15 partir de la cual se había aislado el grupo amino-terminal de Ser 6. Este fragmento protegido se condensó con [N^α-Boc]-rGrelina (1-5)-Osu obtenido por síntesis química y la [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina resultante se trató con un ácido, con lo que se produjo rGrelina.

20 En este ejemplo se describió la semisíntesis de rGrelina, pero también puede sintetizarse hGrelina por este método.

Además, en este ejemplo, el fragmento (1-5) se condensó con el fragmento (6-28), pero pueden condensarse respectivamente fragmentos amino-terminales sintetizados químicamente (1-2), (1-3) y (1-7) con fragmentos carboxilo-terminales (3-28), (4-28) y (8-28) de una longitud arbitraria consistente en los aminoácidos en la 28^a posición hasta la 3^a posición construidos por medios de ingeniería genética, para producir grelina como una proteína de fusión. Para
25 reducir el número de etapas de la síntesis química, es ventajosa la condensación (1-2) y (3-28) o entre (1-3) y (4-28). Desde el punto de vista de la prevención completa de la racemización producida por condensación, es particularmente preferida la condensación entre (1-7) y (8-28) usando Pro 7.

30 Construcción del vector de expresión pG97s rGR y expresión de grelina (6-28) como una proteína de fusión.

Basándose en la secuencia de nucleótidos del ADNc de grelina de rata, se obtuvo un fragmento de ADN para rGrelina (6-28) que tenía la secuencia aminoacídica QFE-SRHRR en la región prepro por templado usando un oligómero sintético total.

35 Para insertar este fragmento de ADN en pG97SnPPH34 (JP-A 9-296000), se trató pG97SnPPH34 con Sall y SmaI delecionando de este modo su gen precursor de hormona paratiroidea humana. El producto se trató con fosfatasa alcalina y se ligó por ligasa de T4 al fragmento génico derivado de rGrelina previamente tratado con Sall y quinasa. El plásmido ligado se utilizó para transformar la cepa DH5 α de *E. coli* para dar plásmido pG97s rGR.

40 El plásmido resultante pG97s rGR se utilizó para transformar *E. coli* M25 (*ompT*) y el transformante resultante se cultivó en tres placas que contenían cada una 200 ml de medio líquido de caldo Terrific (1,2% de triptona, 2,4% de extracto de levadura, 0,4% de glucosa) y se cultivó con agitación a 37°C. Cuando la concentración (DO₆₆₀) de la célula bacteriana alcanzó 0,8, se añadió isopropil 1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 2 mM, para expresar la proteína de fusión de rGrelina (6-28). Además, la célula bacteriana se cultivó durante 4 horas y
45 después se recogió por centrifugación. La estructura de la proteína de fusión rGrelina (6-28) es la siguiente: proteína de fusión de rGrelina 6-28: (β -galactosidasa-97S)-QFE-SRHRR rGrelina (6-28)

50 *Procesamiento de la proteína de fusión de rGrelina 6-28 y purificación de [SRHRR]-rGrelina (6-28)*

Se suspendieron 20 ml de la célula bacteriana resultante en tampón TE y la célula bacteriana se rompió por una prensa French. Posteriormente, se recogieron los cuerpos de inclusión por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos, se suspendieron de nuevo en 10 ml de tampón TE y agua desionizada y se centrifugaron, con lo que se lavaron los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se diluyeron con agua desionizada de tal forma que su
55 DO₆₆₀ se redujo a 50,0, y se añadió Tris-HCl (pH 8,2) a una concentración final de 50 mM, y los cuerpos de inclusión se disolvieron en urea (concentración final: 3,5 M). A esta solución mantenida a 30°C se le añadieron derivado de proteasa rV8 V8D5 (abreviado en lo sucesivo como V8D5) (documento JP-A9-47291) a una concentración final de 10 μ g/ml y la solución se trató con la enzima a 30°C durante 20 minutos. La reacción se terminó añadiendo ácido acético al 3% (AcOH):

60 Se añadió un exceso de 1,5 veces de agua desionizada a la solución terminada con reacción de enzima V8D5 que contenía [SRHRR]-rGrelina (6-28), y después esta solución se ajustó a pH 5,0 con NaOH 5 N, para precipitar el fragmento de derivado de β -galactosidasa que después se retiró por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos.

65 El sobrenadante que contenía [SRHRR]-rGrelina (6-28) se aplicó a una columna TSK-ODS 80Ts (diámetro de partículas de resina de 20 μ m, 50 mm de D.I. x 100 mm, TOSOH Co., Ltd.) previamente equilibrada con TFA al 0,1%. El péptido deseado se eluyó por un gradiente lineal de 100% de tampón A [0,8 ml/min., acetonitrilo al 1%, TFA al 0,1%] a 100% de tampón B [acetonitrilo al 50% TFA al 0,095%], que se programó para terminar en un volumen de 5

ES 2 335 235 T3

columnas. Se recogieron las fracciones que contenían el péptido deseado [SRHRR]-rGrelina (6-28) (aproximadamente 50 mg).

5 Purificación de [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28)

Se añadieron 6 equivalentes mol (19,2 mg, 6 x 15 μ mol) de bicarbonato de di-t-butilo a una solución acuosa de acetonitrilo al 50% que contenía aproximadamente 50 mg (15 μ mol) de [SRHRR]-rGrelina (6-28), y después se ajustó a pH 9 con trietilamina y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió ácido acético a una concentración final de 0,5% a la solución de reacción y después de evaporar el acetonitrilo, la solución se añadió a un cartucho EMPORE-Octil (C8) HD 4 mm/1 ml previamente equilibrado con acetonitrilo al 10% que contenía TFA al 0,1%, y después de lavar la columna con la solución de equilibrio [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28), se eluyó con acetonitrilo al 90% que contenía TFA al 0,095%. El acetonitrilo se evaporó y se obtuvieron 6 ml de solución que contenía aproximadamente 30 mg del péptido deseado.

La espectrometría de masas indicó principalmente dos péptidos cuyo peso molecular después de la modificación con Boc fue mayor en 500 (peso molecular determinado 3895) o en 600 (peso molecular determinado 3995), que el peso molecular (peso molecular determinado = 3396, peso molecular teórico = 3999) antes de la modificación con Boc.

20 Escisión de [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) por proteasa Kex2 y purificación de la misma

Se añadieron soluciones de cloruro cálcico y Tris-HCl, pH 8,2, a concentraciones finales de 0,3 mM y 20 mM respectivamente a la solución acuosa resultante de [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) (30 mg, 6 ml). Después se añadió a la misma una solución de proteasa Kex2 (documento JP-A-10-229884) a una concentración de 1 x 10⁵ unidades/ml, y la muestra se trató con la proteasa a 30°C durante 60 minutos.

En la HPLC, desapareció un pico de [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6, 28), se desplazó un pico de [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6, 28) hacia el lado de hidrofobia, y se observó un pico de un fragmento hidrófilo correspondiente a Boc-SRHRR.

Después de confirmar la desaparición del material de partida, la solución de reacción se ajustó a pH 3,5 con ácido acético acuoso y se aplicó a una columna de cromatografía de fase inversa ODS-80Ts (volumen de columna de 1,66 cc, diámetro de partículas de resina 20 μ m, TOSOH Co., Ltd.) previamente equilibrada con acetonitrilo al 1,0% que contenía ácido acético al 1%. Después de lavar la columna con la solución de equilibrio en un volumen de 5 columnas, se eluyó [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) por un gradiente lineal de acetonitrilo al 1,0 a acetonitrilo al 90,0%, conteniendo cada uno ácido acético al 1%, que se programó para terminar en un volumen de 5 columnas. Las fracciones principales se liofilizaron para dar 6,2 mg del péptido protegido deseado.

40 Condensación y desprotección del fragmento

Se añadieron respectivamente trietilamina (51,0 μ l, 0,366 mmol) y una solución de bicarbonato de di-t-butilo (78,0 mg, 0,0356 mmol) en TFE (4,00 ml) a una solución de Grelina (1-5) (190 mg, 0,0301 mmol, Compuesto 31) en trifluoroetanol (TFE) (6,00 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 13 horas. El disolvente se evaporó, y se añadió éter (20,0 ml) a los residuos resultantes, con lo que se obtuvieron 180,5 mg de [N^o-Boc]-rGrelina (1-5).

Después se añadió HOSu (5,20 mg, 0,0452 mmol) a una solución de [N^o-Boc]-rGrelina (1-5) (22,0 mg, 0,0301 mmol) en DMF (1,00 ml), y se añadió DIPCI (7,30 μ l, 0,0466 mmol) en un baño a -30°C. Después, la mezcla se agitó en el baño a -30°C durante 1 hora y posteriormente a temperatura ambiente durante 18 horas, se evaporó el disolvente y los residuos resultantes se convirtieron en un polvo con éter para dar 14,1 mg de [N^o-Boc]-rGrelina (1-5)-OSu como un éster de succinimida de [N^o-Boc]-rGrelina (1-5).

Después, se añadieron [N^o-Boc]-rGrelina (1-5)-OSu (3,3 mg, 3,96 μ mol) y trietilamina (2,5 μ l, 17,9 μ mol) a una solución en DMF (0,6 ml) de [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGrelina (6-28) (6,10 mg, 2,18 μ mol) preparada por el método recombinante y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evaporó y se añadió TFA (2,00 ml) directamente a los residuos resultantes con refrigeración en hielo y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El TFA se evaporó, y se añadió éter a los residuos, con lo que se obtuvieron 6,2 mg de péptido bruto que contenía Grelina (1-28).

Este producto se disolvió en 2 ml de ácido acético (AcOH) al 5% y se aplicó a YMC-Pack-ODS-A (5 μ m, 20 mm x 250 mm) y se eluyó por un gradiente lineal (caudal: 10 ml/min) de acetonitrilo al 0-95% en ácido trifluoroacético al 0,1% durante 60 minutos. Las fracciones deseadas se recogieron, se liofilizaron, se aplicaron a YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 10 mm x 250 mm) y se eluyeron por un gradiente lineal (caudal: 4,7 ml/min.) de acetonitrilo al 7,5-21,3% en ácido trifluoroacético al 0,1% durante 30 minutos.

ES 2 335 235 T3

Las fracciones deseadas se recogieron, liofilizaron y aplicaron a YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 10 mm x 250 mm) y se eluyeron por un gradiente lineal (caudal: 4,7 ml/min.) de acetonitrilo al 7,5-21,3% en ácido trifluoroacético al 0,1% durante 30 minutos. Las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para dar 2,1 mg de rGrelina (1-28). Este producto mostró un tiempo de retención de acuerdo con el de la rGrelina (1-28) convencional en HPLC analítica, y tuvo una actividad de liberación de Ca intracelular de $CE_{50} = 1,5$ nM que fue equivalente a la grelina natural.

ESI-MS 3315,0 (teórico: 3314,8), composición de 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)

10

Compuesto 87 [^Dleu⁵]-rGrelina (1-28)

15

Como subproducto en la esterificación con succinimida de [^{N^ε}-Boc]-rGrelina (1-5) o la condensación de los fragmentos, se obtuvieron 0,8 mg de [^Dleu⁵]-rGrelina (1-28). Su actividad de liberación de Ca intracelular fue $CE_{50} = 220$ nM.

ESI-MS 3315,0 (teórico: 3314,8), composición de 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)

20

Análisis por GC-MS de leucina después de la hidrólisis en D₂O/DCl: L-Leu; 1,17 (1), D-Leu; 0,83 (1)

Aplicabilidad industrial

25

Por medio de la administración del nuevo compuesto de tipo péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en seres humanos o animales, se demuestra un excelente efecto de trabajo como preparación farmacéutica para promover el crecimiento de niños y mejorar los defectos de funciones metabólicas producidas por deficiencia de GH, induciendo la secreción de GH sin producir efectos secundarios sustanciales, y su anticuerpo demuestra un excelente efecto de trabajo como agente para el diagnóstico de enfermedades atribuibles a una deficiencia de GH y como herramienta de investigación en el campo de la ciencia.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de tipo péptido,

- 5 (a) en el que el segundo o tercer resto aminoacídico del extremo amino es un aminoácido modificado seleccionado de serina, treonina, tirosina y oxiprolina, en el que un ácido graso que contiene de 2 a 35 átomos de carbono está unido al grupo hidroxilo de la cadena lateral vía un enlace éster,
- 10 (b) que comprende una secuencia aminoacídica indicada en SEQ ID N°: 31, en la que el segundo o tercer aminoácido del extremo amino se ha reemplazado por dicho aminoácido modificado, y
- (c) que tiene una actividad de aumentar la concentración de ion calcio intracelular como resultado de la unión a un receptor de secretagogo de la hormona del crecimiento,

15 o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un agente farmacéutico estimulador del apetito.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido graso se selecciona entre ácidos grasos que contienen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ó 18 átomos de carbono, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el ácido graso se selecciona entre ácido octanoico, un ácido graso monoinsaturado del mismo y un ácido graso poliinsaturado del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el ácido graso se selecciona entre ácido decanoico, un ácido graso monoinsaturado del mismo y un ácido graso poliinsaturado del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho compuesto de tipo péptido comprende una secuencia aminoacídica indicada en la SEQ ID N°: 31, en la que el grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina o treonina en la tercera posición desde el extremo amino en dicha secuencia aminoacídica se acila con un grupo acilo que contiene de 2 a 35 átomos de carbono o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto tiene además una actividad de inducir la secreción de hormona del crecimiento.

7. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el compuesto comprende un aminoácido básico unido al extremo carboxilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el extremo amino se modifica con un grupo alquilo saturado o insaturado o un grupo acilo que contiene uno o más átomos de carbono, y/o el grupo hidroxilo del grupo carboxilo en el extremo carboxilo es OZ o se reemplaza por NR₂R₃ donde Z es un catión farmacéuticamente aceptable o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado, y R₂ y R₃ son iguales o diferentes y representan H o un grupo alquilo inferior lineal o ramificado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho agente estimulador del apetito es un medicamento para el tratamiento de anorexia o sitofobia.

Fig. 1

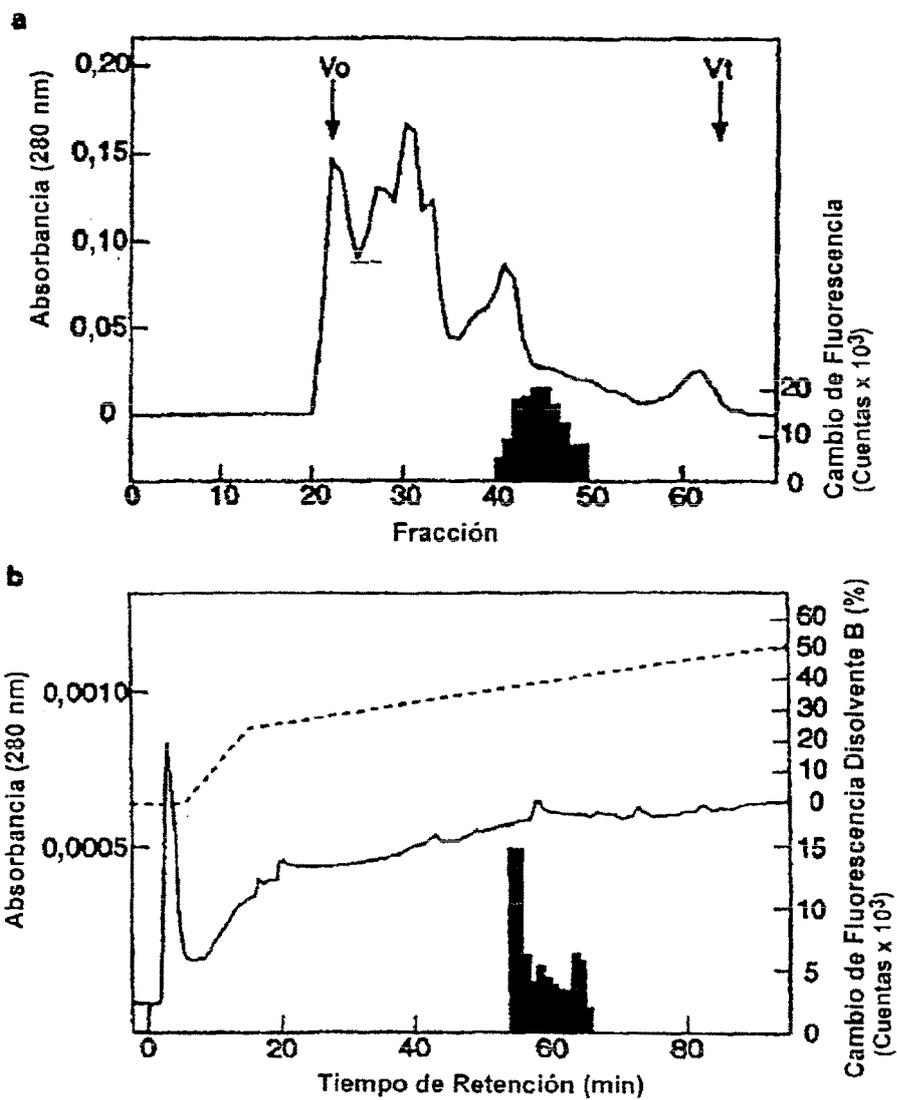
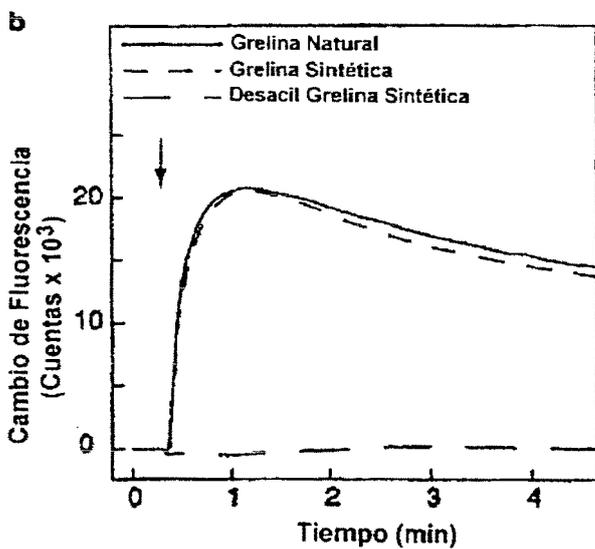
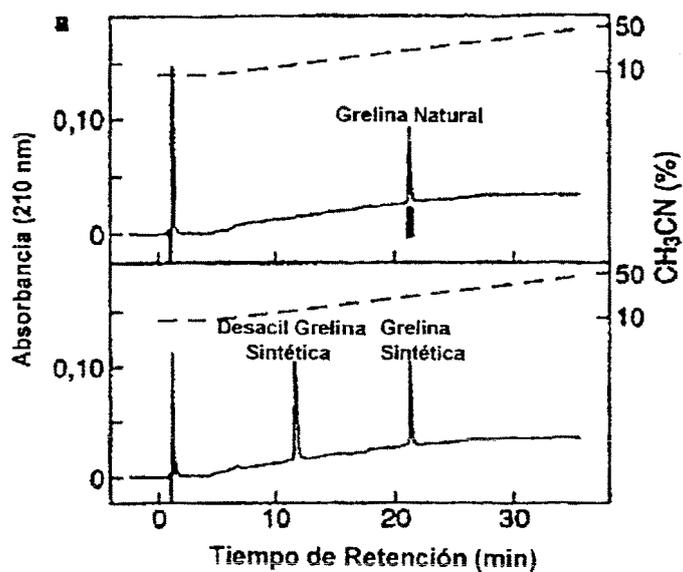


Fig. 2



c



Fig. 3

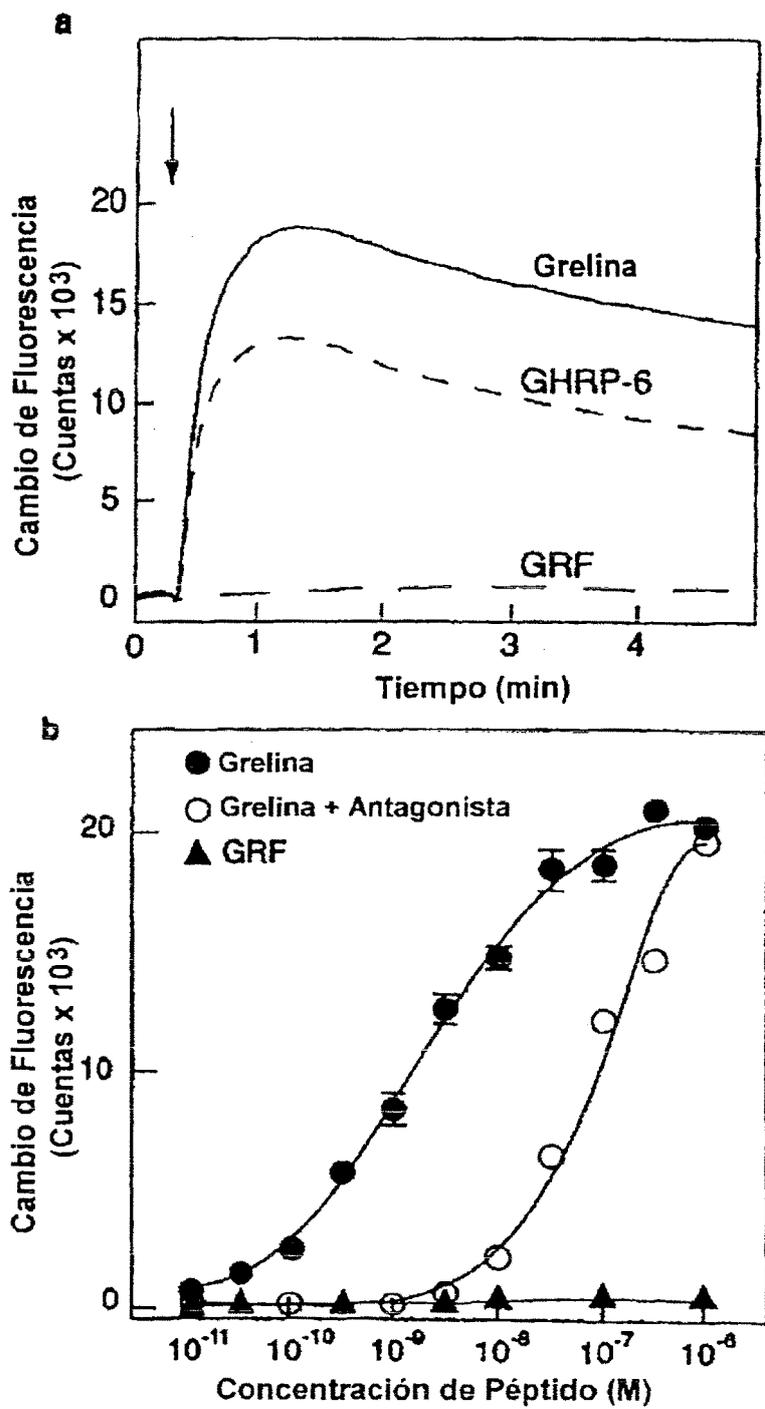


Fig. 4

a

Humano	1	MPSPGTVCSLLLLGMLWLDL	MAGSSFLSP	30
Rata	1	MVSSATICSLLLLSMLWMDM	MAGSSFLSP	30
Humano	31	EHQRVQQRKESKKPPAKLOP	RALAGWLRPE	60
Rata	31	EHQKAQQRKESKKPPAKLOP	RALEGWLHPE	60
Humano	61	DGGQAEGAEDELEVRFNAPFD	VGIKLSGVQ	90
Rata	61	DRGQAEEAEELEIRFNAPFD	VGIKLSGAQ	90
Humano	91	YQQHSQALGKFLQDILWEEAKE	APADK	117
Rata	91	YQQHGRALGKFLQDILWEEVKE	APANK	117

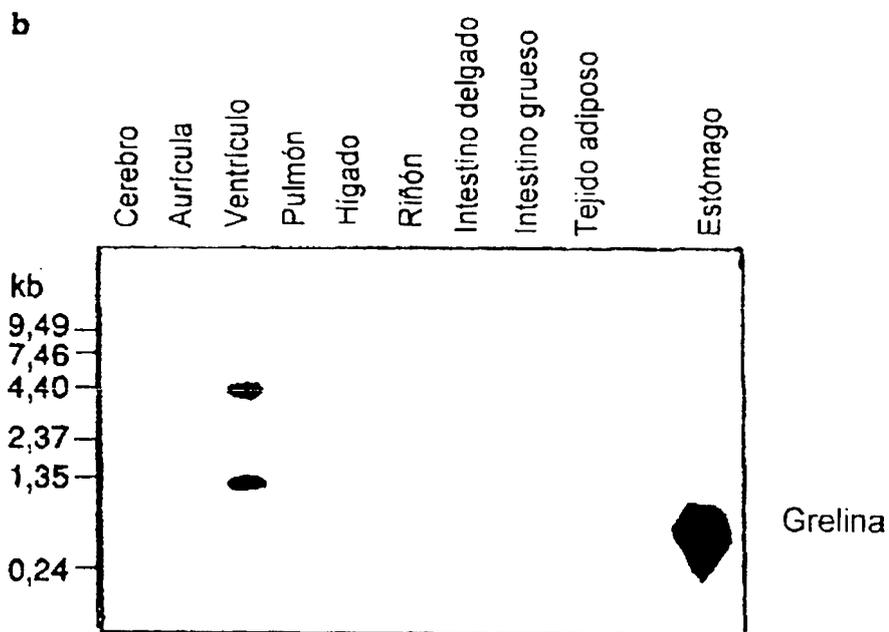


Fig. 5

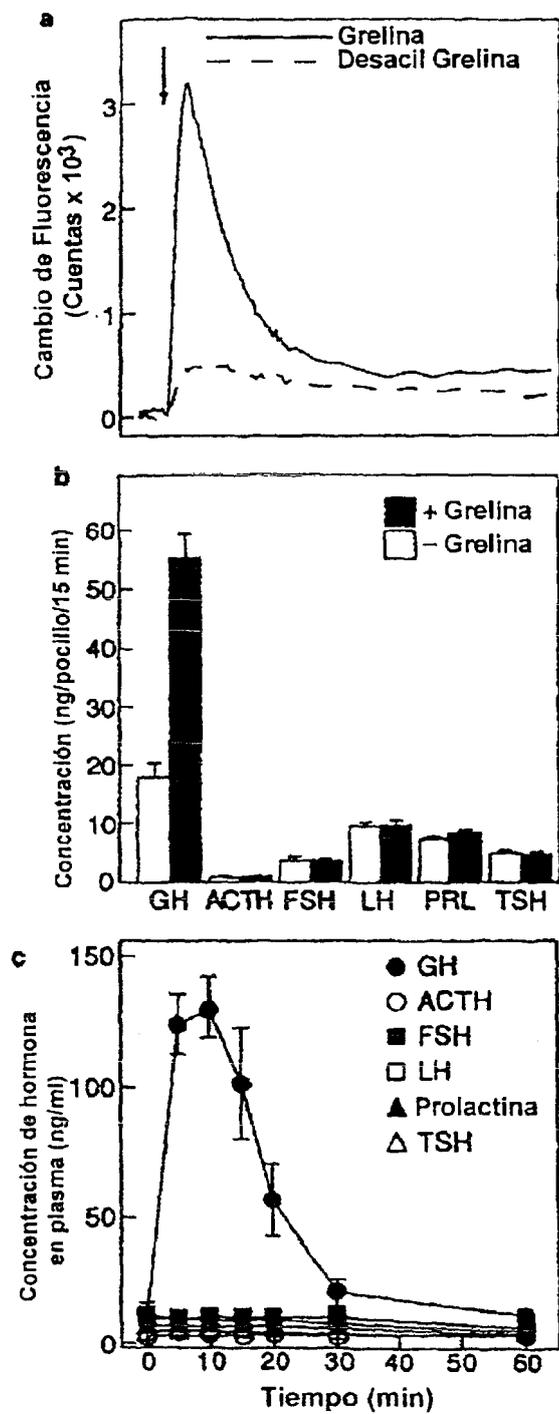


Fig. 6

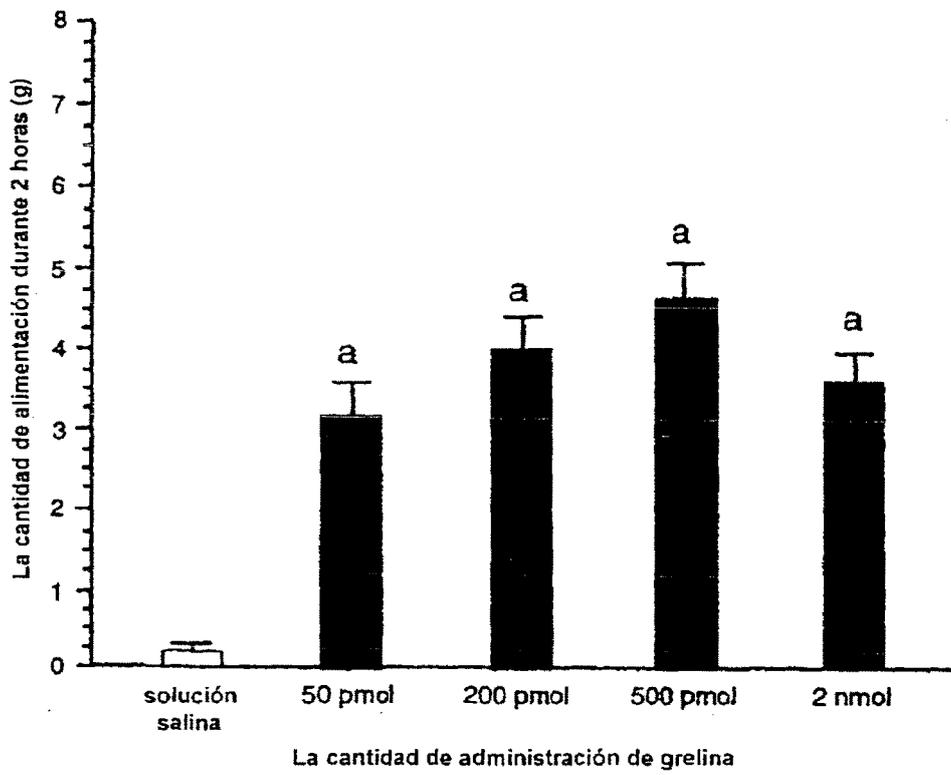
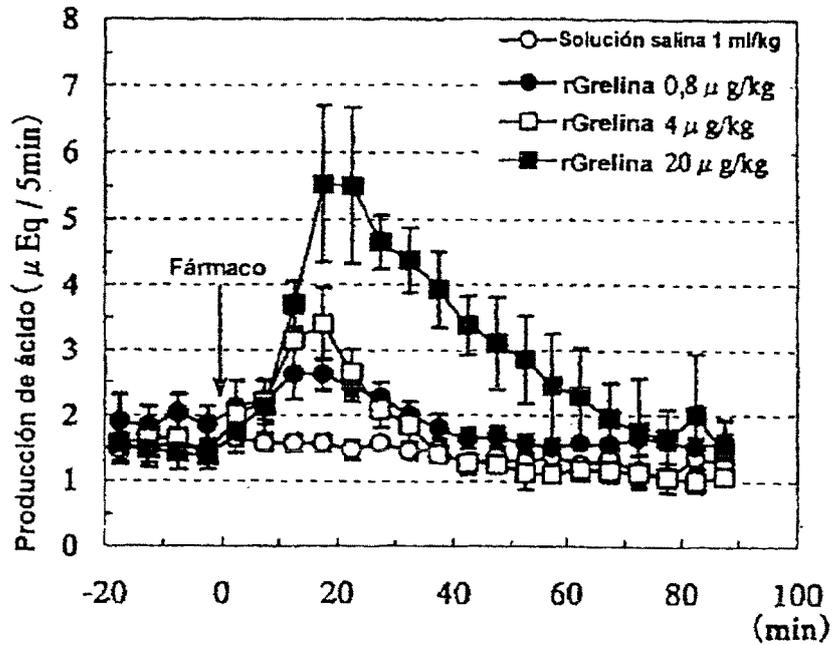


Fig. 7

A



B

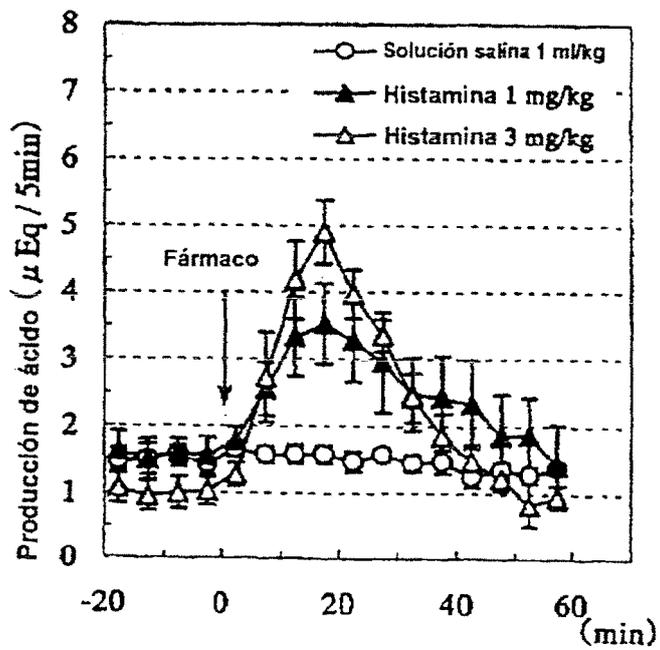


Fig. 8

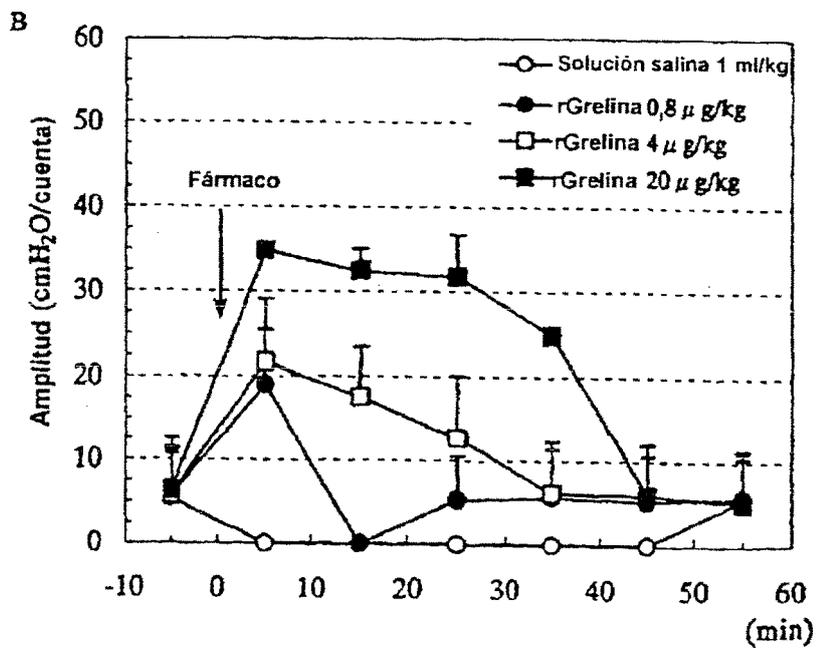
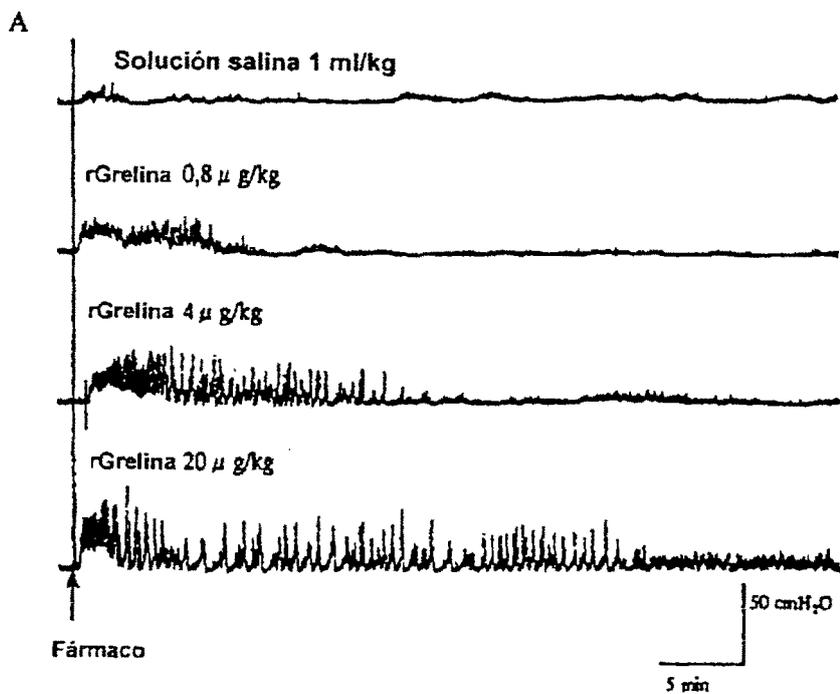
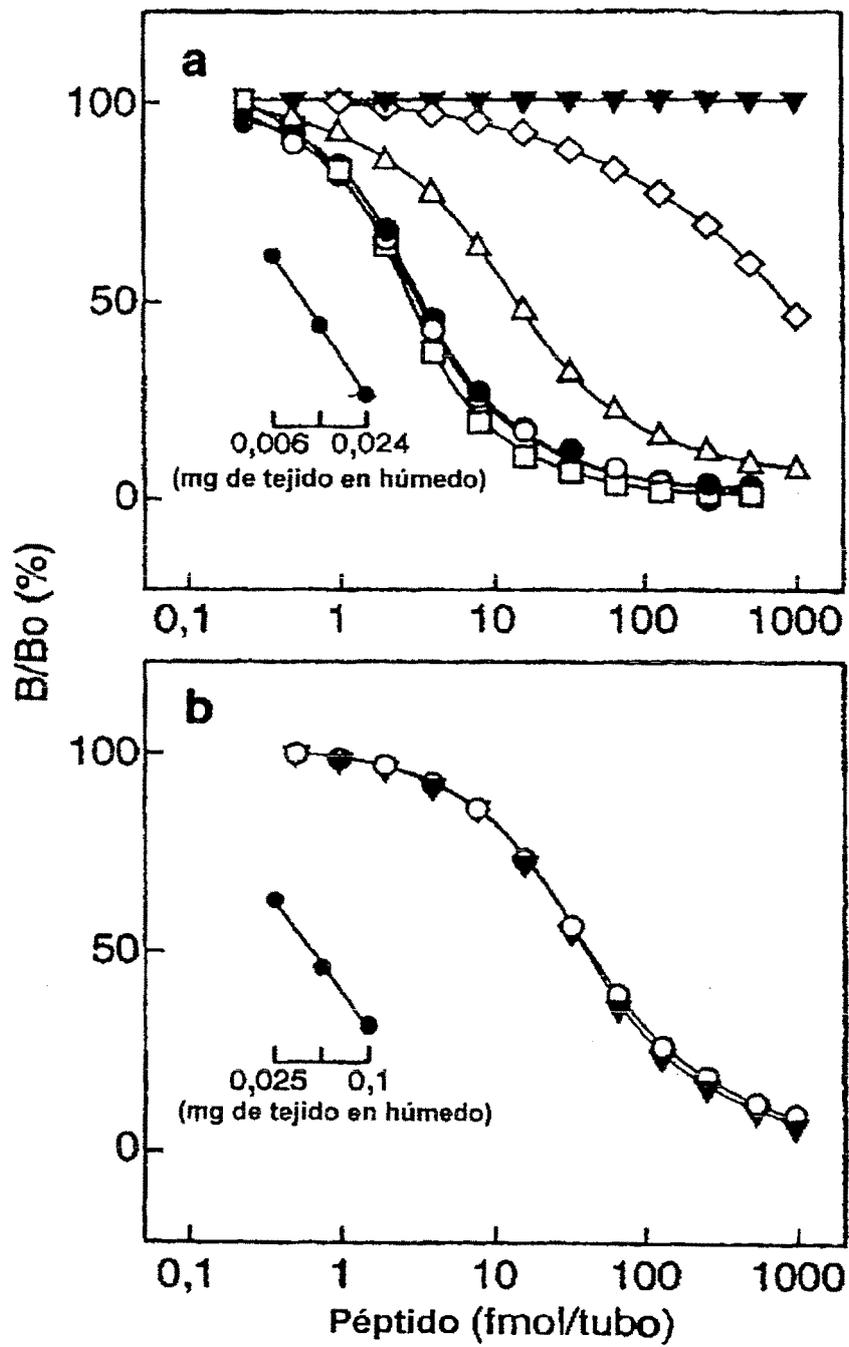


Fig. 9



ES 2 335 235 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> KANGAWA, kenji
- 5 <120> Nuevos Péptidos
- <130> DS03F216 (EP)
- 10 <150> JP 1999/210002
<151> 23-7-1999
- <150> JP 1999/338841
- 15 <151> 29-11-1999
- <150> JP 2000/126623
- 20 <151> 26-4-2000
- <160> 39
- <210> 1
- 25 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 30 <223> Secuencia aminoacídica para una región central de péptidos endógenos de secretagogo de hormona del crecimiento
- <400> 1
- 35
- Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro**
- 1 5**
- 40 <210> 2
<211> 28
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*
- 45 <223> Secuencia aminoacídica para péptidos endógenos de rata de secretagogo de hormona del crecimiento
- <400> 2
- 50
- Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys**
- 1 5 10 15**
- 55
- Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg**
- 20 25**
- 60 <210> 3
<211> 28
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 65 <223> Secuencia aminoacídica para péptidos endógenos humanos de secretagogo de hormona del crecimiento

ES 2 335 235 T3

<400> 5

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
 10 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
 20 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

30

<210> 6

<211> 501

35 <212> ADNc

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<221> CDS

40 <222> (31)...(381)

<223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos de rata de secretagogo de hormona del crecimiento

45

50

55

60

65

ES 2 335 235 T3

<400> 6

```

5      tccagatcat ctgtctctcac caccaaggcc atg gtg tot tca gcg act      48
          Met Val Ser Ser Ala Thr
          1              5
10     atc tgc agt ttg cta ctc ctc agc atg ctc tgg atg gac atg gcc atg      96
Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu Trp Met Asp Met Ala Met
          10              15              20
15     gca ggt tcc agc ttc ttg agc cca gag cac cag aaa gcc cag cag aga      144
Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg
          25              30              35
20     aag gaa tcc aag aag cca cca gct aaa ctg cag cca cga gct ctg gaa      192
Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu
          40              45              50
25     ggc tgg ctc cac cca gag gac aga gga caa gca gaa gag gca gag gag      240
Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu
          55              60              65              70
30     gag ctg gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg      288
Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu
          75              80              85
35     tca gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt      336
Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu
          90              95              100
40     cag gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag      381
Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys
          105              110              115
45     taaccactga caggactggt cctgtactt tcctcctaag caagaactca catccagctt      441
ctgctctctc tgcaactccc agcactctcc tgotgactta caaataaatg ttcaagctgt      501

```

<210> 7

<211> 511

50 <212> ADN

<220>

<221> CDS

55 <222> (34)...(384)

<213> *Homo sapiens*

<223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos humanos de secretagogo de hormona del crecimiento

60

65

ES 2 335 235 T3

<400> 7

```

gcaggcccaac 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
cag aga aag gag tgg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct 189
Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala
    40                45                50
cta gca ggc tgg ctc cgc cgg 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 ctaagttag aagcgtcat      434
Lys

ctggccttttc gottgcttct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga 494
ataaatgttc aaactgt      511

```

<210> 8

50 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 <223> Secuencia aminoacídica para una región central de péptidos endógenos de secretagogo de hormona del crecimiento

<400> 8

60 Gly Ser Ser Phe

1

<210> 9

65 <211> 10

<212> PRT

ES 2 335 235 T3

<400> 12

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu
 1 5 10 15
 5 Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30
 10 Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln
 35 40 45
 15 Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala
 50 55 60
 20 Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp
 65 70 75 80
 25 Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala
 85 90 95
 Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala
 100 105 110
 25 Pro Ala Asn Lys
 115

30 <210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <223> Secuencia aminoacídica para una prepro-forma de péptidos endógenos humanos (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona del crecimiento

40 <400> 13

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
 1 5 10 15
 45 Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30
 50 Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln
 35 40 45
 55 Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala
 50 55 60
 60 Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp
 65 70 75 80
 65 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
 65 Pro Ala Asp Lys
 115

ES 2 335 235 T3

<210> 14
 <211> 498
 <212> ADNc
 5 <213> *Rattus norvegicus*
 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (31)...(378)
 <223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos de rata (27 aminoácidos)
 de secretagogo de hormona del crecimiento
 15 <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 ctc tgg atg gac atg gcc atg 96
Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu Trp Met Asp Met Ala Met
    25           10           15           20
gca ggt tcc agc ttc ttg agc cca gag cac cag aaa gcc cag aga aag 144
Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys
    30           25           30           35
gaa tcc aag aag cca cca gct aaa ctg cag cca cga gct ctg gaa ggc 192
Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly
    35           40           45           50
tgg ctc cac cca gag gac aga gga caa gca gaa gag gca gag gag gag 240
Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu Glu
    40           55           60           65           70
ctg gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg tca 288
Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser
    45           75           80           85
gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt cag 336
Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln
    50           90           95           100
gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg coa gct aac aag          378
Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys
    55           105           110           115
taaccaactga caggactggt cctgtactt tectcctaag caagaactca catocagctt 438
ctgcctcctc tgcaactccc agcactctcc tgctgactta caaataaatg ttcagactgt 498
  
```

60 <210> 15
 <211> 508
 <212> ADN
 65 <220>
 <221> CDS
 <222> (34)...(381)

ES 2 335 235 T3

<213> *Homo sapiens*

<223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos humanos (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona del crecimiento

5

<400> 15

```

10      gcaggcccaac ctgtctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca      45
           Met Pro Ser Pro
           1
15      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
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
25      aga aag gag tgc 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
30      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
35      gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc 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
40      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
45      ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc oca gcc gac aag  381
      Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp Lys
           105           110           115
50      tgatgccca caagoccttac tcacctctct ctaagtttag aagcgctcat      431

55      ctggcttttc gottgettct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct oaggaggcga  491
      ataaatgttc aaactgt      508

```

55

<210> 16

<211> 28

<212> PRT

60

<213> *Sus scrofa* (cerdo)

<223> Secuencia aminoacídica para péptidos endógenos porcinos de secretagogo de hormona del crecimiento

65

ES 2 335 235 T3

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

5 <213> *Sus scrofa* (cerdo)

<223> Secuencia aminoacídica para la prepro-forma de péptidos endógenos porcinos (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona del crecimiento.

10 <400> 19

```

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu 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 Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys
           35           40           45
Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly
 25           50           55           60
Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro
 65           70           75           80
Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly
           85           90           95
Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr
 35           100           105           110
Glu Ala Pro Ala Asp Lys
           115

```

40 <210> 20

<211> 494

<212> ADN

45 <220>

<221> CDS

<222> (9)..(362)

50 <213> *Sus scrofa* (cerdo)

<223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos porcinos de secretagogo de hormona del crecimiento

55 <400> 20

```

ctgaggcc atg ccc tcc acg ggg acc att tgc ago ctg ctg ctc ctc      47
      Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu
 60           1           5           10
agc gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg    95

```

65

ES 2 335 235 T3

```

Ser Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu
   15                               20                               25
5  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
10 gca gcc aaa ctg aag ccc cgg 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
15 gag agt ggt gag gtg gaa ggc acg gag gac aag ctg gaa atc ogg ttc 239
Asp Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe
                               65                               70                               75
20 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
25 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
30 gag gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccagc 382
Glu Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys
110                               115

35 cacctctggt ctcccagcct cctaagggct caoctggcct ccaggacgct tcoactatca 442
caccagctc tgagggatgc tagcctggga ggtgaataaa cattcagact gg 494

```

<210> 21

40 <211> 491

<212> ADN

<220>

45 <221> CDS

<222> (9)...(359)

<213> *Sus scrofa* (cerdo)

50 <223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos porcinos (27 aminoácidos)
de secretagogo de hormona del crecimiento

55

60

65

ES 2 335 235 T3

<400> 21

```

5      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
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
15     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
20     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
25     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
30     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
35     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
40     gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccagc      379
      Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys
      110          115

45     cacctctgtt ctccoagcct cctaagggtt cacctggctt ccaggacgct tccactatca      439
      caoccagctc tgagggatgo tagcctggga ggtgaataaa cattcagact gg      491

```

<210> 22

<211> 27

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

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

<400> 22

```

60     Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu Leu Gln Arg Lys Glu
      1          5          10          15
      Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
65          20          25

```

<210> 23

ES 2 335 235 T3

<211> 89

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

5 <223> Secuencia aminoacídica parcial para una prepro-forma de péptidos endógenos bovinos (27 aminoácidos)
de secretagogo de hormona del crecimiento

<400> 23

10

```

Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu
  1                5                10                15
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
20                 35                40                45
Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Phe Phe Asn Ile Gly
  50                55                60
25 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
30                 85

```

<210> 24

<211> 267

35

<212> ADN

<220>

<221> CDS

40

<222> (1)...(267)

<213> *Bos taurus*

<223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos bovinos (27 aminoácidos)
de secretagogo de hormona del crecimiento

45

<400> 24

```

50 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

```

55

60

65

ES 2 335 235 T3

<222> 20

<223> Secuencia aminoacídica para péptidos endógenos de trucha arco iris (20 aminoácidos) de secretagogo de hormona del crecimiento

5

<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
  
```

15 <210> 31

<211> 28

<212> PRT

20 <213> *Canis familiaris*

<223> Secuencia aminoacídica para péptidos endógenos de perro de secretagogo de hormona del crecimiento

<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
  
```

35 <210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> *Anguilla japonica*

40 <223> Secuencia aminoacídica para la prepro-forma de péptidos endógenos de anguila de secretagogo de hormona del crecimiento

<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
 55           50           55           60
Asp Ile Arg His Ile Thr Phe Asn Thr Pro Phe Glu Ile Gly Ile Thr
 60           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
 65           100           105
  
```

ES 2 335 235 T3

<210> 33

<211> 114

<212> PRT

5 <213> *Xenopus laevis*

<223> Secuencia aminoacídica de péptidos endógenos de rana (*Xenopus laevis*) de secretagogo de hormona del crecimiento

10 <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
20 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
25          50          55          60
Ile Gly Val Thr Phe Pro Leu Asp Met Lys Met Thr Gln Glu Gln Phe
30          65          70          75          80
Gln Lys Gln Arg Ala Ala Val Gln Asp Phe Leu Tyr Ser Ser Leu Leu
          85          90          95
35 Ser Leu Gly Ser Val Gln Asp Thr Glu Asp Lys Asn Glu Asn Pro Gln
          100          105          110
Ser Gln

```

40

<210> 34

<211> 82

<212> PRT

45 <213> *Oncorhynchus mykiss*

<223> Secuencia aminoacídica para la prepro-forma de péptidos endógenos de trucha arco iris (23 aminoácidos) de secretagogo de hormona del crecimiento

50

55

60

65

ES 2 335 235 T3

<400> 34

```

    Mat Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser
    1           5           10           15
5   Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Val Arg Gln
           20           25           30
10  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
15  Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe
    65           70           75           80
20  Gln Glu

```

<210> 35

<211> 99

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<223> Secuencia aminoacídica para la prepro-forma de péptidos endógenos de trucha arco iris (20 aminoácidos) de secretagogo de hormona del crecimiento

30

<400> 35

```

    Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser
    1           5           10           15
35  Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly
           20           25           30
40  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
45  Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe Gln Glu Tyr
    65           70           75           80
50  Gly Ala Val Leu Gln Lys Ile Leu Gln Asp Val Leu Gly Asp Thr Ala
           85           90           95
    Thr Ala Glu

```

55 <210> 36

<211> 503

<212> ADN

<220>

60 <221> CDS

<222> (66)...(389)

<213> *Anguilla japonica*

65 <223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos de anguila de secretagogo de hormona del crecimiento

ES 2 335 235 T3

<400> 36

5 tccaagagggc actgggtttc ctcttaaagt 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
 10 1 5 10

gcg ctg tgg atg gac tot 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 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
 20 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
 25 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 Ash Thr Pro Phe Glu Ile Gly
 30 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
 35 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
 40 95 100 105

tgacaagagt ggatagatc tggacttcac aaaaccctgc gtcccatata ttctgcatt 449
 attgcatgca taattcaacc aattgttaaa catttaataa aattttgcaa acgc 503

45 <210> 37

<211> 484

<212> ADN

50 <220>

<221> CDS

<222> (47)...(388)

<213> *Xenopus laevis*

55 <223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos de rana (*Xenopus laevis*) de secretagogo de hormona del crecimiento

60

65

ES 2 335 235 T3

<400> 37

```

5      tttcactttt atctcgcagg cggcaccggt 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
10      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
15      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
20      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
25      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
30      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
35      85          90          95
      tot 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
40      100          105          110
      agc caa tgagaatgat gaaatccgc tcgtctctga tgccctccc cgatctgtgt   438
      Ser Gln

45      gtctttatta tctctgtgta acccagaaat aaatcttatt tatggc          484

```

50 <210> 38

<211> 462

<212> ADN

<220>

55 <221> CDS

<222> (12)...(257)

<213> *Oncorhynchus mykiss*

60 <223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos de trucha arco iris (23 aminoácidos) de secretagogo de hormona del crecimiento

65

ES 2 335 235 T3

<400> 38

```

tcacaggtct 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
5          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
10
      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
15      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
20      45          50          55          60
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
25          65          70          75
gag gag gag ttc cag gag tatggtgccc tgctgcagaa gatcctgcag      287
Glu Glu Glu Phe Gln Glu
30          80
gacgtcctgg gagacactgc cactgcagaa tgatcacaac ttggcataga cacggaatac 347
aaagaacctc cattccctgt tctccaactt tcctttctca acttgtotta tacccaatgt 407
35 actgtgtgaa catcgtttga attgtaaaag atgaataaaa taaccgcggc cgcta      462

```

<210> 39

<211> 453

40 <212> ADN

<220>

<221> CDS

45 <222> (12)...(308)

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<223> Secuencia de bases de ADNc que codifica la prepro-forma de péptidos endógenos de trucha arco iris (20 aminoácidos) de secretagogo de hormona del crecimiento

50

<400> 39

```

tcacaggtct 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
55          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
60          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
65

```

ES 2 335 235 T3

	30		35		40		
	ttt gct gag ctg ttt gag ggt ccc ctt cac cag gaa gac aaa cac aat	191					
5	Phe Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn						
	45		50		55		60
	acg atc aag gct cct ttt gag atg ggc atc acc atg agt gag gag gag	239					
10	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					
15	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					
20	Gly Asp Thr Ala Thr Ala Glu						
		95					
	aaagaacctc cattcctgt tctccaactt tcttttctca acttgtctta tacccaatgt	398					
25	actgtgtgaa catogtttga attgtaaag atgaataaaa taacactgct tctt	453					
30							
35							
40							
45							
50							
55							
60							
65							