



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0708366-1 A2**

(22) Data de Depósito: 28/02/2007  
(43) Data da Publicação: 24/05/2011  
(RPI 2107)



(51) *Int.Cl.:*  
C07K 7/06 2006.01  
C07K 7/08 2006.01  
C07K 14/60 2006.01  
A61K 38/00 2006.01

(54) Título: **COMPOSTOS QUÍMICOS DE NATUREZA PEPTÍDICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, COMPOSIÇÃO VETERINÁRIA E USO DE COMPOSTOS QUÍMICOS**

(30) Prioridade Unionista: 28/05/2006 CU 2006-0050

(73) Titular(es): Centro de Ingeniería Genética Y Biotecnología

(72) Inventor(es): Alexis Musacchio Lasa, Ania de La Nuez Veulens, Diana Garcia Del Barco Herrera, Glay Chinae Santiago, Jorge Amador Berlanga Acosta, Julio Raúl Fernández Massó, Mario Pablo Estrada Garcia, Osvaldo Reyes Acosta, Rebeca Martínez Rodríguez, Rolando Eduardo Rodríguez Fernandez

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT CU2007000007 de 28/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/098716 de 07/09/2007

(57) Resumo: COMPOSTOS QUÍMICOS DE NATUREZA PEPTÍDICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, COMPOSIÇÃO VETERINÁRIA E USO DE COMPOSTOS QUÍMICOS Compostos químicos peptídicos obtidos por modelagem molecular in silico, e cuja estrutura lhes permite efetuar as mesmas funções que os secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento. A invenção compreende, além disso, as composições que contêm os referidos compostos e seu uso na preparação de medicamentos, suplementos nutricionais, ou outras formulações de uso humano ou animal.



PI0708366-1

“COMPOSTOS QUÍMICOS DE NATUREZA PEPTÍDICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, COMPOSIÇÃO VETERINÁRIA E USO DE COMPOSTOS QUÍMICOS”

Campo da técnica

5                   A presente invenção se enquadra dentro do campo do desenho racional de entidades moleculares biologicamente ativas que regulam a atividade metabólica e de citoproteção do organismo. Em particular de compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento cuja atividade inclui, ainda que não se restringe: à liberação controlada de  
10   hormônio de crescimento, à cardioproteção e ao aumento das prestações funcionais do sistema cardiovascular, à neuroproteção, e ao controle e regulação do apetite, à assimilação de gorduras e o metabolismo energético.

Estado da técnica anterior

                  Os secretagogos sintéticos do hormônio de crescimento (em  
15   inglês Growth Hormone, abreviado GH) são uma família de ligandos que incluem moléculas peptídicas e não peptídicas. As primeiras moléculas sintetizadas foram peptídeos desenhados por Bowers e Momany, antes do isolamento do Hormônio Liberador de GH (em inglês Growth Hormone Releasing Hormone, abreviado GHRH). Desenvolveram-se peptídeos  
20   sintéticos de 6 e 7 resíduos de aminoácidos (em inglês Growth Hormone Releasing Peptides, abreviado GHRPs), que resultaram ser potentes liberadores do GH; estes peptídeos foram descritos sem conhecimento de sua função no organismo, nem a via pela qual estes atuavam. Estudos de mutações e experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o arranjo de  
25   dois aminoácidos L-D e D-L separados por um aminoácido que servisse de espaçador, sem perder a conformação original, era considerado ótimo na atividade liberadora do GH, e assim ficou conformado o peptídeo (His-D-Trp-Ala-D-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) que libera o GH com uma concentração de 10-30 ng/ML chegando ao conhecido como GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-

Lys-NH<sub>2</sub>) onde o resíduo de (Lys) é necessário somente para melhorar a atividade *in vivo* já que *in vitro* não foi descrito que cumpra função alguma (Momany FA, Bowers C.E., et. al. (1981) Design, synthesis and biological activity of peptides which release growth hormone, *in vitro*. *Endocrinology*, 108:31 -39).

Outros peptídeos análogos foram descobertos, em 1993 Bowers e colaboradores encontraram outros dois peptídeos análogos do GHRP-6, o GHRP-2 (D-Ala-D-β-Nal- Asa-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) e o GHRP-1 (Asa-His-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>). Estes três secretagogos mostram uma liberação maior de GH *in vitro* a partir de hipófises-hipotálamo incubada do que de hipófises sozinha, o que demonstrou que o impulso hipotalâmico era importante na dita ação, também se demonstrou, inclusive em humanos, que a ação sinérgica dos GHRP e os GHRH libera mais GH do que cada uma em separado (Bowers CY. (1993) GH-releasing peptides: structure and kinetics. *J Pediatr Endocrinol*, 6(1):21-31).

A partir do peptídeo conhecido como GHRP-2 se desenharam novos peptídeos cíclicos, os quais eram produto da troca do D-Ala do N-terminal por um aminoácido cuja cadeia lateral fica unida à de um amino que foi inserido entre o D-Phe e a Lys. Um destes peptídeos (D-Lys-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Glu-Lys-NH<sub>2</sub>) resultou ser mais 10 vezes ativo que GHRP-6 *in vitro* e uma eficácia comparável *in vivo* (McDowell R. S., et al. (1995) Growth hormone secretagogues: characterization, efficacy, and minimal bioactive conformation. *PNAS USA*, 92(24):11165-11169). Estes experimentos se complementaram com o estudo da estrutura em solução dos DL peptídeos cíclicos e se chegou à conclusão de que a introdução de resíduos de aminoácidos D nos compostos peptídicos era essencialmente necessária para a conservação da atividade desejada. Outras investigações se dirigiram a encontrar moléculas ativas com biodisponibilidade oral e tempos de vida média maiores e levaram à descoberta de outros GHRPs bem como a

descoberta das moléculas não peptídicas.

Em 1993, é descrito o primeiro secretagogo do GH (GHS) não peptídico (Smith R. G., et al. (1993) A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science*, 260:1640- 43), e referem mais tarde a síntese de um  
 5 GHS não peptídico, MK-0677, ainda mais potente, MK-0677 tem uma alta biodisponibilidade e pode estimular a secreção de 24-h GH depois de uma única administração oral (Patchett AA, Nargund R.P., et al. (1995) Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *PNAS USA*, 92:7001 -7005; Smith R.G., Van  
 10 der Ploeg L. H., et al. (1997) Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev*, 18:621-645). Mais recentemente desenhou-se outro GHS peptidomimético (EP1572) com uma potente e seletiva atividade de liberação de GH. EP1572 mostra uma potência de união ao receptor de secretagogos do hormônio de crescimento (GHS-R) em tecidos animais e  
 15 humanos similar a de ghrelina e GHS peptídicos e induz um incremento considerável de GH depois de administração subcutânea em ratas neonatais. (Broglio F., Boutignon F., et al. (2002) EP1572: a novel peptide-mimetic GH secretagogue with potent and selective GH-releasing activity in man. *J Endocrinol Invest*, 25:RC26-RC28).

20 Em 1999, descobriu-se a ghrelina, um peptídeo de 28 aminoácidos produzido fundamentalmente por estômago, ainda que também tenham encontrado seu RNAm em vários tecidos. É produzida no estômago pelas células X/A que representam a maior população de endocrina na mucosa oxintica. A ghrelina se encontra igualmente no núcleo arcuato do  
 25 hipotálamo onde seu RNA está presente nos neurônios NPY e nos neurônios AGRP, implicados no controle do apetite e do balanço energético (Kojima M., Hosoda H., et al. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402:656-60; Nakazato M., Murakami N., et al. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*,

409:194-198). Seu RNA foi localizado igualmente no intestino e o pâncreas. Circula no sangue, no homem adulto, sua concentração é de 100-120 fmol/ml, sugerindo que é segregado pelas células do estômago à circulação e que poderia atuar por via endocrina. Assim como a produção de ghrelina também  
 5 foi reportada em tecidos neoplásicos (Takaya K., Ariyasu H., et al. (2000) Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 85:4908-11; Papotti M., et al. (2001) Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endoc. Metab*, 86:4984-4990).

10                Outros estudos em animais mostram que a secreção de ghrelina é pulsátil e está mais associada ao apetite que aos pulsos de GH (Tolle V., Bassant M. H., et al. (2002) Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleepwake patterns in rats. *Endocrinology*, 143:1353-1361).

15                A ghrelina é o primeiro hormônio natural que foi identificado com um grupo hidroxila de uma de suas **serinas acilado** com um ácido octanóico. Esta modificação foi descrita como essencial para a união à GHS-R1a, para sua capacidade de liberação de GH, e muito provavelmente para suas outras ações endócrinas.

20                A ghrelina não acilada circula em quantidades maiores do que a acilada, embora ainda não se tenha descrito para ela uma ação diretamente endocrina, postula-se que pode exercer algumas ações não endócrinas incluindo efeitos cardiovasculares, cardioprotetores, antiproliferativos, e citoprotetores em general, provavelmente mediados pela união de outros  
 25 subtipos de GHS-R (Matsumoto M., Hosoda H., et al. (2001) Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 287:142-146; Hosoda H., Kojima M., et al. (2000) Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 279:909-913; Cassoni

P., Papotti M., et al. (2001) Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:1738-1745).

5                    Existe outro ligante endógeno para GHS-R1a que pode ser isolado da mucosa endocrina do estômago. A des-Gln14-ghrelina é o resultado de um processamento alternativo do gene da ghrelina onde se perde a Gln14 e do mesmo modo que a ghrelina, experimenta o mesmo processo de acilação na Ser3.

10                    Estudos realizados com vários análogos de ghrelina com o resíduo 3 modificado com vários grupos alifáticos ou aromáticos e vários peptídeos curtos derivados da ghrelina mostram que os grupos hidrofóbicos unidos à cadeia lateral do resíduo 3 são considerados essenciais para sua atividade. Também se observou que pequenos segmentos que contêm os cinco  
15 primeiros resíduos da ghrelina são capazes de ativar o receptor com tanta eficiência como a ghrelina completa. O tetrapeptídeo formado pelos quatro primeiros resíduos da ghrelina resultou menos potente e os fragmentos que não continham o N-terminal foram incapazes de ativar o receptor (Bednarek  
20 MA1 Feighner S. D., et al. (2000) Structure-Function Studies on the New Growth Hormone-Releasing Peptide, Ghrelin: Minimal Sequence of Ghrelin Necessary for Activation of Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *J Med Chem*, 43: 4370-4376; Silva Elipe M.V., Bednarek M.A., et al. (2001) 1  
H NMR structural analysis of human ghrelin and its six truncated analogs. *Biopolymers*, 59:489-501). Estes estudos sugerem que a sequência completa  
25 da ghrelina não é necessária para sua atividade e que Gly-Ser-Ser(n-octanoil)-Phe constitui o fragmento ativo requerido para sua atividade como agonista de GHS-R1a.

Antes e depois da descoberta da ghrelina se desenvolveu um grande trabalho para encontrar moléculas pequenas e seus derivados que

possam como ligantes do receptor de secretagogos do hormônio de crescimento, existindo um grande numero de patentes nesta área que descrevem moléculas deste tipo (Pats EEUU: US 3,239,345; 4,036,979; 4,411,890; 5,492,916; 5,494,919; 5,559,128; 5,663,171; 5,721,250; 5,721,251; 5,723,616; 5,726,319; 5,767,124; 5,798,337; 5,830,433; 5,919,777; 6,034,216; 6,548,501; 6,559,150; 6,576,686; 6,686,359; Pat Int: WO 89/071 10; 89/071 11; 92/07578; 93/04081; 94/11012; 94/13696; 94/19367; 95/11029; 95/13069; 95/14666; 95/17422; 95/17423; 95/34311; 96/02530; 96/15148; 96/22996; 96/22997; 96/24580; 96/24587; 96/32943; 96/33189; 96/35713; 96/38471; 97/00894; 97/06803; 97/071 17; 97/09060; 97/11697; 97/15191; 97/15573; 97/21730; 97/22004; 97/22367; 97/22620; 97/23508; 97/24369; 97/34604; 97/36873; 97/38709; 97/40023; 97/40071; 97/41878; 97/41879; 97/43278; 97/44042; 97/46252; 98/03473; 98/10653; 98/18815; 98/22124; 98/46569; 98/51687; 98/58947; 98/58948; 98/58949; 98/58950; 99/08697; 99/09991; 99/36431; 99/39730; 99/45029; 99/58501; 99/64456; 99/65486; 99/65488; 00/01726; 00/10975; 01/47558; 01/92292; 01/96300; 01/97831) (Carpino, P. (2002) Recent developments in ghrelin receptor (GHS-. R1a) agonists and antagonists *Exp. Opin. Ther. Patents* 12:1599-1618).

Depois desta revisão foram descritos outros compostos como antagonistas do receptor de secretagogos (US2005288316 e WO2005048916) e outros descritos que se unem também ao receptor e que são utilizados com propósitos variados. (WO2005046682; WO2005039625; JP2003335752; US2004009984; US2003130284; WO03004518).

Mais recentemente se incorporou uma nova série de compostos macrocíclicos a este conjunto com o propósito fundamental de serem agonistas do receptor sem ativar a liberação de GH (US2006025566).

O GHS-R é um receptor associado a proteína G de classe A e é expresso por um só gene que em humanos tem a localização cromossômica

3q26.2. Identificaram-se dois tipos de cDNA que são o resultado de um processamento alternativo do pre-mRNA (McKee K.K., Tan C. P., et al. (1997) Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics*, 46:426-434; McKee K.K., Palyha O.C., et al. (1997) Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol*, 11:415-423; US 6,242,199; WO 97/21730). O cDNA 1a codifica um receptor de 366 aminoácidos com sete segmentos transmembranários (GHS-R1a). O cDNA 1b codifica uma proteína mais curta (GHS-R1b) que tem 289 aminoácidos e cinco segmentos transmembranários. Embora não se conheça a importância de GHS-R1b, comprovou-se sua expressão em vários tecidos endócrinos e não endócrinos (Howard A. D., Feighner S. D., et al. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273:974-977; Gnanapavan S., Kola B., et al. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:2988; Smith R. G., Leonard R., et al. (2001) Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine*, 14:9-14).

O GHS-R1a humano tem 96 e 93% de identidade com o de rata e porco, respectivamente, e se viu uma relação muito estreita entre a sequência do GHS-R1a humano e as que foram identificadas em peixes teleósteos. Estas observações sugerem que GHS-R1a está altamente conservado entre as espécies e provavelmente tenha uma função biológica essencial. (Palyha O. C., Feighner S. D., et al. (2000) Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from pufferfish to humans. *Mol Endocrinol.* 14:160-169).

A união de ghrelina e GHS sintéticos ao GHS-R1a ativa a via de sinalização da fosfolipasa C, provocando um incremento da concentração



de inositol-1,4,5 trisfosfato (IP3), e a ativação da proteína quinasa C (PKC), seguida da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares. A ativação de GHS-R também inibe os canais de  $\text{K}^{+}$ , permitindo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais dependentes de voltagem tipo L, mas não por canais tipo T. A

5 diferença de GHS-R1a, GHS-R1b não une nem responde aos GHS e sua função está ainda por definir. (Chen C., Wu D., et al. (1996) Signal transduction systems employed by synthetic GH- releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol.* 148:381-386; Casanueva F.F., Dieguez C. (1999) Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol,*

10 20:317-363; Howard A.D., Feighner S. D., et al. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273:974-977).

Os GHS sintéticos, a ghrelina e sua isoforma natural (des-GIn14-ghrelina) se unem com alta afinidade ao GHS-R1a, e sua eficiência

15 deslocando a [ $^{35}\text{S}$ ] MK-0677 ou [ $^{125}\text{I}$ ] [ $\text{Tyr}^4$ ]ghrelina unidos às membranas da hipófises se correlaciona com a concentração requerida para estimular a liberação de GH (Muccioli G., Papotti M., et al. (2001) Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest.* 24:RC7-RC9; Hosoda H., Kojima M., et al. (2000)

20 Purification and characterization of rat des-GIn14-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, 275:21995-22000).

Para determinar as características estruturais da ghrelina necessárias para a união e ativação de GHS-R1a, realizaram-se estudos com

25 peptídeos curtos de ghrelina em células HEK-293 que expressam GHS-R1a humano, observando-se que peptídeos de 4 e 5 aminoácidos que continham o N-terminal da ghrelina foram capazes de ativar este receptor. Baseados nestes resultados *in vitro* se postula que a sequência Gly-Ser-Ser(n-octanoil)-Phe é requerida de forma essencial para a ativação do receptor (Van Der Lely AJ.,

Tschop M., et al. (2004) Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *Endocrine Reviews*, 25(3):426-457). Os primeiros 7 aminoácidos da ghrelina estão conservados entre todas as espécies, no entanto a habilidade dos derivados de ghrelina de ativar GHS-R1a em células transfectadas não parece ser indicativo de sua capacidade de estimular a liberação de GH em células somatótropas, recentemente se demonstrou que ghrelina (1-4)octanilada e ghrelina (1-8) octanoilada não são capazes de estimular a liberação de GH em ratas, e nenhum destes peptídeos é efetivo deslocando [<sup>125</sup>I] [Tyr<sup>4</sup>]ghrelina de seus lugares de união em preparações de membrana de hipófises ou hipotálamo humano (Torsello A., Ghe C, et. al. (2002) Short ghrelin peptides neither displace ghrelin binding *in vitro* nor stimulate GH release *in vivo*. *Endocrinology*, 143:1968-1971). Outro estudo realizado nas mesmas células que expressam o GHS-R1a humano ou de porco se descobriu que a adenosina também ativa o receptor, mas, similar aos análogos curtos de ghrelina em cultivos de células de hipófises não podem estimular a secreção de GH, sugerindo que a adenosina é um agonista parcial de GHS-R1a e que se une a um lugar no receptor diferente do de MK-0677 e GHRP-6 (Smith R.G., Griffin P.R., et. al. (2000) Adenosine: a partial agonist of the growth hormone secretagogue receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 276:1306-1313).

Mais recentemente se reportou que GHS-R1a também pode unir cortistatina (CST), um neuropeptídeo homólogo da somatostatina (SS), o qual por si mesmo não pode reconhecer o GHS-R1a (Deghenghi R., Papotti M., et. al. (2001) Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest*, 24:RC1-RC3).

GHS-R1a se expressa nas células somatótropas da hipófises e no núcleo arcuato, zona crucial para as atividades neuroendócrinas e de estimulação do apetite da ghrelina e GHS sintéticos (Willesen M. G.,

Kristensen P., Romer J. (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, 70:306-316; Bluet-Pajot M. T., Tolle V., et. al. (2001) Growth hormone secretagogues and hypothalamic networks. *Endocrine*, 14:1-8; Shintani M., Ogawa E., et. al. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide E/E1 receptor pathway. *Diabetes*, 50:227-232). A ghrelina, assim como os GHS sintéticos, estimulam a expressão de alguns marcadores de atividade neuronal (*c-fos* e EGR-1) em neurônios do núcleo arcuato e se detectou mRNA de GHS-R1a em áreas extrahipotalâmicas como o giro dentado da formação hipocampal, regiões CA2 e CA3 do hipocampo, pars compacta da substância negra, área tegmental ventral, núcleos de Raphe dorsal e medial, núcleo de Edinger-Westphal, ponte e bulbo raquídeo, indicando possíveis ações extrahipotalâmicas. Também se demonstrou a presença de seu mRNA em vários órgãos periféricos entre os quais se encontram: estômago e intestino, pâncreas, rim, coração, aorta, diferentes adenomas humanos e vários neoplasmas endócrinos de pulmão estômago e pâncreas (Hewson A. K., Dickson S. L. (2000) Systemic administration of ghrelin induz Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol*, 12:1047-1049; Muccioli G., Ghe et. al. (1998) Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland. *J Endocrinol*, 157:99-106; Guan X.M., Yu H., et. al. (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*, 48:23-29;; Mori K., Yoshimoto et. al. (2000) Kidney produz a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett*, 486:213-216; Nagaya N., Miyatake K., et. al. (2001) Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusão in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:5854- 5859; Korbons M.,

Bustin S.A., et. al. (2001) The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:881-887; Papotti M., Cassoni P., et. al. (2001) Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:5052-5059).

A ghrelina e os GHS têm uma alta afinidade por GHS-R1a. No entanto, há evidências de que há lugares de união adicionais para os GHS. Lugares específicos para Tyr-Ala-hexarelin e outros GHS peptídicos com uma densidade de receptores ao menos igual à encontrada na hipófise foram encontrados no coração de rata e humano, assim como em uma grande quantidade de tecidos periféricos não endócrinos como: pulmões, artérias, músculo esquelético, rim e fígado (Muccioli G., Ghe C, et. al. (1998) Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland. *J Endocrinol*, 157:99-106; Muccioli G., Broglio F., et. al. (2000) Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. *Ann Endocrinol* (Paris), 61:27-31; Bodart V., Bouchard J. F., et. al. (1999) Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res*, 85:796-802; Katugampola S., Davenport A. (2003) Emerging roles for orphan G protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*, 24:30-35; Ghigo E., Arvat E., et. al. (2001) Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans. *Endocrine*, 14:87-93; Papotti M., Ghe C, Cassoni P., et. al. (2000) Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:3803-3807). Estes lugares de união provavelmente não são receptores de ghrelina, porque mostram uma baixa afinidade por ela, mas também de seus análogos peptídicos. O GHS-R cardíaco tem uma massa molecular maior (84 kDa) que GHS-R1a e não tem homologia com este. A sequência aminoácida referida anteriormente para o receptor presente no coração é similar à de CD36 (Papotti M., Ghe C, et. al. (2000) Growth

hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:3803-3807; Bodart V., Febbraio M., et. al. (2002) CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, 90:844-849). O significado funcional de

5 receptores para GHS peptídicos em tecidos periféricos e algumas descobertas no sistema cardiovascular sugerem que estes lugares de união mediam as atividades cardioprotetoras dos GHS peptídicos.

A ghrelina e os secretagogos sintéticos estimulam a liberação de GH pelas células somatótropas *in vitro* provavelmente por despolarização da membrana e pelo incremento da quantidade de GH secretada por célula e

10 também foi reportou um efeito estimulatório dos GHS sobre a síntese de GH. (Kojima M., Hosoda H., et. al. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402:656-660; Sartor O., Bowers C.E., Chang D. (1985).

Parallel studies of His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub> and human pancreatic growth hormonereleasing fator-44-NH<sub>2</sub> in rat primary pituitary cell monolayer culture. *Endocrinology*, 116:952-957; Bowers C.E., Sartor A.O., et. al. (1991) On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*, 128:2027- 2035; Wu D., Chen C1 et al.

15 (1994) The effect of GH-releasing peptide-2 (GHRP-2 or KP 102) on GH secretion from primary cultured ovine pituitary cells can be abolished by a specific GH-releasing fator (GRF) receptor antagonist. *J Endocrinol*, 140:R9-R13;).

20

Desde estudos recentes foi demonstrado que GHS estimulava a

25 secreção de GH por um receptor e uma via diferente que a de GHRH: Um antagonista do receptor de GHRH inibe a secreção de GH provocada por GHRH mas não a liberação de GHRH provocada pela estimulação de secretagogos e um suposto antagonista de GHS-R não afeta a liberação de GH em resposta o GHRH, GHRP-6 não compete com GHRH em ensaios de união

ao receptor para os lugares de união de GHRH, há um efeito aditivo sobre a liberação de GH quando GHRH e GHS são co-administrados a cultivo de somatótrofos e não há desensibilização cruzada entre GHRH e GHS em termos de liberação de GH, enquanto que ocorre desensibilização homóloga.

- 5 (Wu D., Chen C, et al. (1994) The effect of GH- releasing peptide-2 (GHRP-2 or KP102) on GH secretion from primary cultured ovine pituitary cells can be abolished by a specific GH-releasing factor (GRF) receptor antagonist. *J Endocrinol*, 140:R9-13; Thorner M.O., Hartman M. L., et al. (1994) Current status of therapy with growth hormone-releasing neuropeptides. In: Savage  
10 MO, Bourguignon J, Grossman AB (eds). *Frontiers in Paediatric Neuroendocrinology*, 161 - 167).

A atividade liberadora de GH dos GHS é maior em preparações hipotálamo-hipófise do que em preparações de hipófise de acordo com a evidência de que os efeitos estimulatórios sobre a secreção de GH são  
15 maiores *in vivo* do que *in vitro* (Mazza E., Ghigo E., et. al. (1989) Effect of the potentiation of cholinergic activity on the variability in individual GH response to GH-releasing hormone. *J Endocrinol Invest*, 12:795-798; Bowers C.E., Sartor A.O., et. al. (1991) On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*, 128:2027-2035; Clark R. G.,  
20 Carlsson M. S., et. al. (1989) The effects of a growth hormone-releasing peptide and growth hormone releasing factor in conscious and anaesthetized rats. *J Neuroendocrinol*, 1:249-255).

A nível hipotalâmico, a ghrelina e GHS atuam sobre os neurônios secretores de GHRH e se observou uma secreção incrementada de  
25 GHRH na circulação portal da hipófise depois da administração de GHS em ovelha (Conley L.K., Teik J.A., et. al. (1995) Mechanism of action of hexarelin and GHRP-6: analysis of the involvement of GHRH and somatostatin in the rat. *Neuroendocrinology*, 61:44- 50; Guillaume V., Magnan E., et. al. (1994) Growth hormone (GH)-releasing hormone secretion

is stimulated by a new GH-releasing hexapeptide in sheep. *Endocrinology*, 135: 1073-1076).

GHS requer GHRH para expressar completamente seu efeito liberador de GH. Em humanos, a resposta de GH é inibida por antagonistas do receptor de GHRH assim como por desconexão hipotálamo-hipofisária (Bluet-Pajot M.T., Tolle V., et al. (2001) Growth hormone secretagogues and hypothalamic networks. *Endocrine*, 14:1-8; 148:371-380; Popovic V., Miljic D., et al. (2003) Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:3450-3453). Pacientes com deficiência do receptor de GHRH não mostram incremento na secreção de GH em resposta à estimulação com GHS, mas mantêm a capacidade de incrementar a secreção de PRL, ACTH e cortisol depois da estimulação com GHS. (Maheshwari H. G., Pezzoli S. S., et al. (2002) Pulsatile growth hormone secretion persists in genetic growth hormone-releasing hormone resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282:E943-E951; Maheshwari H. G., Rahim A., et al. (1999) Selective lack of growth hormone (GH) response to the GH-releasing peptide hexarelin in patients with GH- releasing hormone receptor deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 84:956-959; Gondo R. G., Aguiar-Oliveira M. H., Hayashida C.E., et al. (2001) Growth hormone-releasing peptide-2 stimulates GH secretion in GH-deficient patients with mutated GH-releasing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:3279-3283).

Em humanos e animais há evidências de que GHS e GHRH induzem desensibilização homóloga, mas não heteróloga. A desensibilização homóloga à atividade de GHS se viu durante infusão de GHRH, mas não pela administração diária intermitente oral ou nasal do peptídeo por mais de 15 dias (Ghigo E., Arvat E., et al. (1994) Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 78:693-

698; Ghigo E., Arvat E., et al. (1996) Short-term administration of intranasal or oral hexarelin, a synthetic hexapeptide, does not desensitize the growth hormone responsiveness in human aging. *Eur J Endocrinol*, 135:407-412). Por outro lado a administração de GHS por via parenteral, intranasal ou oral realça o pulso espontâneo de GH durante 24 h e aumenta os níveis de IGF-I em adultos jovens normais, assim como em meninos e idosos (Chapman I. M., Bach M.A., et al. (1996) Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of o GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:4249-4257; Copinschi G., Van Onderbergen A., et al. (1996) Effects of a 7-day treatment with a novel, orally active, growth hormone (GH) secretagogue, MK-0677, on 24-hour GH profiles, insulin-like growth factor I, and adrenocortical function in normal young men. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:2776-2782; Laron Z., Frenkel J., et al. (1995) Intranasal administration of the GHRP hexarelin accelerates growth in short children. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 43:631-635).

A ghrelina é capaz de estimular o apetite nas ratas e esta propriedade estaria mediada pela via da síntese de NPY e de AGRP, dois peptídeos orexígenos. Se ghrelina é injetada por via intraventricular, é capaz de anular os efeitos anorexígenos da leptina. Postula-se que haja uma interação competitiva entre estes dois peptídeos no controle do apetite e da homeostasis energética. As concentrações circulantes de ghrelina na rata estão aumentadas durante o jejum e diminuem depois da re-alimentação ou depois de ingestão de glicose (Shintani M., Ogawa E., et al. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide E/E1 receptor pathway. *Diabetes*, 50:227-32; Nakazato M., Murakami N., et al. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409(6817):194-198; Tschöp M., Smiley D.L., Heiman M. L. (2000) Ghrelin



induces adiposity in rodents. *Nature*, 407:908-13).

Os GHS também estimulam o apetite e o ganho de peso. Tratamentos crônicos com GHRP-2 estimulam a acumulação de tecido adiposo em ratos deficientes de NPY e nos controles, paralelamente incrementam a expressão hipotalâmica do mRNA de AgRP (Torsello, A., Luoni, M., et al. (1998) Novel hexarelin analogs stimulate feeding in the rat through a mechanism not involving growth hormone release. *Eur. J. Pharmacol*, 360:123-129; Ghigo, E., Arvat, E., et al. (1999) Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans. *Horm. Res*, 51:9-15; Tschop, M., Statnick, et al. (2002) GH-releasing peptide-2 increases fat mass in mice lacking NPY: indication for a crucial mediating role of hypothalamic agouti-related protein. *Endocrinology*, 143:558-568).

A administração de ghrelina em rata provoca aumento do apetite junto com um incremento de peso devido a um incremento significativo no tecido adiposo sem se observarem mudanças na massa magra, tecido ósseo ou estimulação de crescimento. O efeito lipogênico da ghrelina é independente da ação de GH porque se encontra igualmente na rata geneticamente deficiente de GH. O GH provoca um incremento do gasto energético e causa uma diminuição na massa gordurosa, o que permite um balanço entre este e a ghrelina: a ghrelina aumenta a massa graxa do organismo, enquanto o GH não permite que diminua a massa magra. (Nakazato M., Murakami N., et al. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409(6817):194-198; Wren A.m., Small CJ., et al. (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141 (11):4325-4328; Tschop M., Smiley D.L., Heiman M.L. (2000) Ghrelin induzes adiposity in rodents. *Nature*, 407:980-913).

Em indivíduos obesos os níveis de ghrelina estão diminuídos e não diminuem depois de comer. Esta é uma condição reversível, depois da

perda de peso os níveis plasmáticos médios de ghrelina aumentam. Os níveis plasmático de ghrelina correlacionam negativamente com o índice de massa corporal, a massa corporal graxa, o tamanho do adipócito e os níveis plasmáticos de insulina, glicose e leptina (English P.J., Ghatei M.A., et. al. (2002) Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(6):2984; Tschop M., Weyer C, et. al. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 50(4):707-9).

A insuficiência de GH nos pacientes obesos foi reportada como reversível depois de uma dieta prolongada e uma marcada perda de peso. O aumento crônico dos níveis de ácidos graxos livres e o hiperinsulinismo associado aos baixos níveis de ghrelina provavelmente tenham um papel importante causando a insuficiência de GH na obesidade (Maccario M., Tassone F., Grottoli S., Rossetto R., Gauna C, Ghigo E. (2002) Neuroendocrine and metabolic determinants of the adaptation of GH/IGF-I axis to obesity. *Ann Endocrinol* (Paris), 63(2 Pt 1):140-144). Dado que a ghrelina é adipogênica e orexigênica pode ser lógico pensar que quando consideramos o papel da ghrelina no tratamento da obesidade seu efeito deve ser antagonizado. No entanto as conseqüências do antagonismo dos efeitos da ghrelina também diminuem a secreção de GH, o qual está associado a um incremento na massa graxa (Jorgensen J.O., Vahl N., (1996) Influence of growth hormone and androgens on body composition in adults. *Horm Res*, 45:94-98). A administração a longo prazo de agonistas e antagonistas de ghrelina revelaram qual dos dois efeitos, adipogênico ou somatotrófico, domina e determina a influência sobre o balanço energético.

No homem obeso as concentrações circulantes de ghrelina estão diminuídas e negativamente correlacionadas à porcentagem corporal de tecido adiposo bem como às taxas circulantes de insulina e leptina (Tschop M., Weyer C, et. al. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human

obesity. *Diabetes*, 50:707-9).

O eixo GH/IGF-I tem um papel importante durante o desenvolvimento cardíaco e para a manutenção da estrutura e função do coração e um dos sintomas da deficiência de GH é uma deterioração no funcionamento cardiovascular, o qual pode ser revertido depois de uma  
 5 terapia com GH (Sacca L, Cittadini A, Fazio S (1994) Growth hormone and the heart. *Endocr Rev* 15:555-573; Caidahl K, Edén S, Bengtsson BÅ 1994 Cardiovascular and renal effects of growth hormone. *Clin Endocrinol* (Oxf) 40:393- 400).

Existem dados experimentais que evidenciam uma melhora do funcionamento cardíaco devido ao GH, entre eles muitos estudos que utilizam um modelo de enfarte de miocárdio experimental em rata. Um tratamento com GH depois do enfarte de miocárdio, provoca um incremento do volume sistólico de ejeção, a saída cardíaca e outras variáveis sistólicas. Além de uma  
 10 pronunciada vasodilatação e uma diminuição da resistência total periférica por GH/IGF-I, provavelmente contribua para melhorar a contratilidade do miocárdio (Timsit J, Riou B, et al. 1990 Effects of chronic growth hormone hypersecretion on intrinsic contractility, energetics, isomyosin pattern and myosin adenosine triphosphate activity of rat left ventricle. *J Clin Invest*  
 15 86:507-515; Tajima M, et al. (1999) Treatment with growth hormone enhances contractile reserve and intracellular calcium transients in myocytes from rats with postinfarction heart failure. *Circulation* 99:127-134).

Por outro lado, modelos animais com excesso de GH têm uma mudança para uma isoforma de miosina com uma baixa atividade adenosin  
 25 trifosfatase, o que pode diminuir a demanda energética do processo de contração (Timsit J, Riou B, et al. (1990) Effects of chronic growth hormone hypersecretion on intrinsic contractility, energetics, isomyosin pattern and myosin adenosine triphosphate activity of rat left ventricle. *J Clin Invest* 86:507-515).

Há vários estudos dos efeitos cardíacos e periféricos de GH e/ou IGF-I, e dentre eles, dados clínicos promissores apontando para um futuro papel de GH/IGF-I na terapia cardiovascular (Fazio S., Sabatini D., et al. (1996) A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 334:809- 814).

Foi visto que os GHS sintéticos e a ghrelina têm propriedades cardioprotetoras em vários estudos *in vivo* e que podem melhorar variáveis da função cardíaca *in vivo*, e seu efeito é comparável com o do GH. As similitudes no perfil hemodinâmico de hexarelin com o de GH poderiam sugerir que a ação dos GHS pode estar mediada pelo GH. No entanto, estudos recentes suportam uma ação direta destes, GH-independente, sobre o miocárdio. (Locatelli V., Rossoni G., (1999) Growth Hormone independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology*, 140:4024-4031; Tivesten Å., Bollano E., (2000) The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology*, 141:60-66).

Foi demonstrado a presença do mRNA de GHS-R1a no coração e aorta, e em cultivos de cardiomiócitos se incrementa o mRNA de GHS-R1a depois de pré-incubação com hexarelin (Gnanapavan S., Kola B., et al. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2988-2991; Nagoya N., Kojima M., et al. (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280: R1483-R1487; Pang J.-J., Xu R.-K., et al. (2004) Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(3): H1063-1069).

Identificaram-se lugares de união específicos para ghrelina no coração de rata e artérias humanas, onde a densidade de receptores se encontra aumentada com a arterioesclerose e se detectaram união específica

de GHS peptídicos marcados radioativamente em células de miocárdio de rata e diferentes tecidos cardiovasculares de humano (ventrículo, aurículo, aorta, coronária, carótida, endocárdio e veia cava), em quantidades em ocasiões maiores do que as encontradas na hipófise. (Katugampola S. D. (2001) [125I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localising GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 134:143-149; Ong H., McNicoll N., et al. (1998) Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling. *Endocrinology*, 139:432- 435; Bodart V., McNicoll N., et al. (1999) Identification and characterization of a new GHRP receptor in the heart. *Circ Res*, 85:796-808; Papotti M., Ghe C, et al. (2000) Growth hormone secretagogue binding site in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 3803-3807).

Ainda que, a administração de doses farmacológicas altas de GHS peptídicos induz uma clara mas transiente vasoconstrição no coração pré-fundido de rata em ratas jovens com deficiência de GH induzida por imunização contra GHRH, pré-tratamento com hexarelin pode proteger contra o dano ao miocárdio induzido por isquemia e reperfusão. A atividade protetora foi associada à recuperação da liberação de prostaciclina e uma normalização da atividade vasopressora da angiotensina II. (Bodart V., Febbario M., et al. (2000) CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, 90:844-849; de Gennaro Colonna V., Rossoni G., et al. (1997) Hexarelin, a growth hormone-releasing peptide, discloses protetant activity against cardiovascular damage in rats with isolated growth hormone deficiency. *Cardiologia*, 42:1165-1172; de Gennaro Colonna V., et al. (1997) Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protetion by hexarelin. *Eur J Pharmacol*, 334:201-207).

Resultados similares foram obtidos em ratas envelhecidas nas

quais pré-tratamento com hexarelin se viu uma forte proteção contra o atordoamento miocárdico. A recuperação completa da função cardíaca esteve presente na reperfusão, e a simultânea redução dos níveis de creatina quinase corroborando a integridade das células das membranas do miocárdio e a preservação do debilitamento contrátil que segue à readmissão de oxigênio. O efeito **protetor** de hexarelin foi também demonstrado pela manutenção da produção de 6-ceto-PGF1 $\alpha$ , assim como a restauração da *reatividade vascular* coronária à angiotensina II (Rossoni G., de Gennaro Colonna V., et al. (1998) protectant activity of hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 32:260-265; Rossoni G., de Gennaro Colonna V., et al. (1998) Protectant activity of hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 32:260-265; Locatelli V., Rossoni G., et al. (1999) Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology*, 140:4024-4031).

Estudos realizados em ratas hipofisetomizadas mostram que os efeitos cardioprotetivos de GHS são independentes de GH e mediados pela ativação direta de receptores específicos do miocárdio (Locatelli V., Rossoni G., et al. (1999) Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology*, 140:4024-4031; Bodart V., McNicoll N., et al. (1999) Identification and characterization of a new GHRP receptor in the heart. *Circ Res*, 85:796-808).

Hexarelin incrementa o volume sistólico de ejeção e a saída cardíaca e diminui a resistência total periférica em um modelo de rata 4 semanas depois da indução de enfarte de miocárdio experimental. Embora o mecanismo pelo qual se produz a atividade inotrópica dos GHS sintéticos ainda não esteja claro, há evidências de que aumenta a contratilidade dos músculos papilares por ações nas células endoteliais e/ou nas terminações

nervosas (Tivesten A., Bollano et al. (2000) The growth hormone secretagogue Hexarelin improve cardiac function in rats after experimental myocardial infaction. *Endocrinology*, 141:60-66; Bedendi I., Gallo M. P., et al. (2001) Role of endothelial cells in modulation of contractility induced by hexarelin in rat ventricle. *Life Sci*, 69:2189-2201).

Foi visto que a ghrelina não compartilha todas as ações cardiovasculares dos GHS sintéticos. A ghrelina oferece uma proteção pobre ao coração contra isquemia em ratas sugerindo que os efeitos de GHS sintéticos se devem à união e ativação de lugares específicos para os GHS peptídicos os estudos realizados com [125I]Tyr-Ala-hexarelin revelam muitos lugares de união no miocárdio de rata e em tecidos cardiovasculares em humanos diferentes de GHSR-1a, isto sugere a existência de outro receptor (Este receptor tem um peso molecular maior (84 kDa) do que GHS-R1a e não apresenta homologia com este, e se prediz que sua seqüência aminoácida é similar a de CD36, o qual mediara as ações coronárias de GHS peptídicos (Torsello A., Bresciani E., et al. (2003) Ghrelin plays a minor role in the physiological controle of cardiac function in the rat. *Endocrinology*, 144:1787-1792; Muccioli G., Broglio F., et al. (2000) Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. *Ann Endocrinol (Paris)* 61:27-31; Bodart V., Febbraio M., et al. (2002) CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, 90:844-849).

Embora a ghrelina provavelmente seja inativa a nível coronário, possui outros efeitos cardiovasculares. Foi visto que a ghrelina tem um potente efeito vasodilatador em humanos tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta ação da ghrelina é diretamente sobre a musculatura lisa, com uma potência comparável com a dos peptídeos natriuréticos. Em humanos com arterioescleroses se encontra aumentada a expressão de receptores de ghrelina, o que sugere que esta tem um papel na compensação do incremento

da vasoconstrição observada nesta condição (Okumura H., Nagaya N., et al. (2002) Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39:779-783; Wiley K. E., Davenport AP. (2002) Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br. J. Pharmacol*, 136:1146-1152; Katugampola S.D. (2001) [125I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localising GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 134:143-149).

Estudos realizados mostram que hexarelin, ghrelina acilada e inclusive ghrelina não acilada podem provir a morte celular, induzida por doxorubicina, em cultivos de cardiomiócitos H9c2 e células endoteliais. Estas moléculas provavelmente estimulam vias de sinalização intracelulares que envolvem processos de sobrevivência em cultivos de cardiomiócitos, incluindo a fosforilação de proteínas intracelulares e a ativação de ERK1/2 e proteína quinase B/AKT (Baldanzi G., Filigheddu N., et. al. (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol*, 159:1029-1037; Filigheddu N., Fubini A., et al. (2001) Hexarelin protects H9c2 cardiomyocytes from doxorubicin-induced cell death. *Endocrine*, 14:113-119).

Estudos *in vivo* em cardiomiócitos e células endoteliais sugerem que os efeitos antiapoptóticos dos GHS estão mediados pela ativação das quinases Akt e ERK e pela inibição da ativação de caspase 3 e da expressão de bax e aumentando a expressão de bcl-2 (Pang J.J., Xu R.K., et al. (2004) Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286:H1063-H1069). Estes dados favorecem a hipótese da existência de outro subtipo de GHS-R, dado que a ghrelina não acilada não ativa o GHS-R1a.

Em humanos, a ghrelina e os GHS têm decididamente



atividades cardiovasculares, de fato, sua administração a sujeitos normais e a pacientes com falha cardíaca crônica diminuem significativamente a resistência vascular sistêmica e aumentam o índice cardíaco e o volume sistólico de ejeção, isto está acompanhado por uma redução concomitante da pressão arterial média, mas não por nenhuma mudança na velocidade do coração, pressão de artéria pulmonar média ou pressão capilar pulmonar de enclavamento. (Nagaya N., Kojima M., et al. (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280:R1483-R1487; Enomoto M., Nagaya N., et al. (2003) Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans. *Clin Sci (Lond)*, 105:431-435).

Observou-se que vários fatores tróficos, incluindo o GH e IGF-I, têm propriedades neuroprotetoras durante a segunda fase da isquemia-hipóxica (HI) *in vivo* embora os mecanismos subjacentes não sejam completamente conhecidos. No entanto, demonstrou-se que a ativação da via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) com a conseqüente fosforilação de Akt quinase media a sobrevivência neuronal induzida por fatores de crescimento *in vitro*. Akt fosforilada promove a sobrevivência celular e pode inibir apoptosis por inativação de vários alvos proapoptóticos incluindo Bad, glicogênio sintetase quinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ), caspase 9 ou por modificação de fatores de transcrição (Kulik G., Klippel A., Weber MJ. (1997). Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol*, 17:1595-1606). Outra via ativada pelos fatores de crescimento é a de MAPK p42/44 ERK. Foi visto que a ativação de ERK inibe a apoptosis induzida por hipoxia. Além disso, foi visto que a neuroproteção por BDNF em ratas neonatais mediada pela ativação da via, MAPK/ERK e tratamentos com IGF-I a ratas neonatais depois de HI ativa as vias Akt e EKR (Buckley S., Driscoll B., et al. (1999) ERK activation protets

against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *Am J Physiol*, 277:159-166; Han B.H., Holtzman D.M. (2000) BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury *in vivo* via the ERK pathway. *J Neurosci*, 20:5775- 5781).

5                   Em estudos realizados se observou que hexarelin (secretagogo peptídico) reduz o dano cerebral em um modelo *in vivo* de HI. Esta proteção está acompanhada da fosforilação de Akt e GSK3 $\beta$  indicando a possibilidade de que a via PI3K esteja envolvida observando-se seu efeito protetor em

10 proteção correlaciona com a localização do receptor de GH e de GHBP (Brywe K.G., Leverin A.-L., et al. (2005) Ghrowth Hormone Releasing Peptide Hexarelin reduz neonatal brain injury and alters Akt/Glycogen Synthase Kinase-3B phosphorylation. *Endocrinology*, 146: 4665-4672; Lobie P. E., García-Aragón J., et al. (1993) Localization and ontogeny of growth

15 hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Dev Brain Res*, 74:225-233; Scheepens A., Sirimanne E.S., et al. (2001) Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience*, 104:677-687).

20                   Isto sugere que o efeito protetor de hexarelin pudesse estar mediado pelo GH ou que hexarelin e GH compartilhem vias comuns para a proteção celular, já que se encontraram o mRNA de GHS-R em várias estruturas do cérebro. A administração de GHRP-6 em ratas adultas sob condições fisiológicas mostrou um incremento nos níveis de mRNA de IGF-I no hipotálamo, cerebelo e hipocampo mas não no córtex embora este possa se

25 dever ao aumento da expressão de IGF-I, mas não se detectaram incrementos significativos do mesmo em ratas tratadas com hexarelin 24 horas depois da HI. Por outro lado, se IGF-I fosse um importante mediador dos efeitos de Hexarelin, poderia se esperar uma redução do dano cerebral no estriato, já que os receptores de IGF-I estão presentes neste (Frago L. M., Paneda C1 Dickson

S.L., et al. (2002) Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology*, 143:4113-4122; Guan J., Williams C, et al. (1993) The effects of IGF-1 treatment after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13:609-616).

Hexarelin ativa, além disso, a via PI3K no CNS depois de HI, mas não afeta a fosforilação de ERK, enquanto que IGF-I demonstrou que ativa tanto a via PI3K como a via ERK.

Foi visto que Hexarelin aumenta a fosforilação do receptor IGF-I, na ausência de uma óbvia indução de IGF-I, poderia ser que o aumento da fosforilação se deva a uma transativação do receptor de IGF-I por Hexarelin ou um ligante endógeno. Previamente foi visto que agonistas de receptores associados à proteína G como a angiotensina-II, trombina e endotelina podem estimular a fosforilação do receptor de IGF-I e/ou Akt (Sumitomo M., Milowsky M. L, et al. (2001)).

Neutral endopeptidase inhibits neuropeptide-mediated transactivation of the insulin-like growth factor receptor-Akt cell survival pathway. *Cancer Res*, 61:3294-3298; Zahradka P., Litchie B., et al. (2004) Transactivation of the insulin-like growth factor-I receptor by angiotensin II mediates downstream signaling from the angiotensin II type 1 receptor to phosphatidylinositol 3-kinase. *Endocrinology*, 145:2978-2987).

O efeito neuroprotetor de Hexarelin não parece estar mediado primariamente por uma indução do eixo GH/IGF-I, embora uma sinalização incrementada através do receptor de IGF-I possa contribuir para a redução do dano cerebral.

Explicação da invenção.

Apesar do abundante trabalho neste campo encontrado no estado da técnica, no mesmo se evidencia que os compostos miméticos da ghrelina e de natureza não peptídica não são capazes de todas as funções

possíveis a ser atribuídas à ghrelina no organismo, sendo preferida a utilização de compostos com natureza peptídica, cuja similitude estrutural seja muito maior, a descrição destes peptídicos análogos no entanto está limitada ao uso de aminoácidos não naturais de estereoquímica D, como parte das composições.

Levando-se em conta a importância dos secretagogos peptídicos nas funções anteriormente descritas e a capacidade dos mesmos para as funções endócrinas e não endócrinas em uma variedade grande de organismos, sistemas e células, a presente invenção descreve, com efeito, pela primeira vez, moléculas químicas de natureza peptídica, com ciclos internos e compostas somente de aminoácidos com estereoquímica L no carbono quiral, que são capazes de realizar, devido a sua estrutura química, funções similares às atribuídas à ghrelina, des-acil ghrelina, e outros GHS peptídicos, que inclui mas não está restringido à capacidade de liberação de GH, a Cardioproteção e em general a melhoria das funções do músculo cardíaco e o sistema reticuloendotelial, a neuroproteção que não só inclui o cérebro e cerebelo mas também todas as células do sistema nervoso, e o controle e regulação do apetite, incluindo a regulação do metabolismo das gorduras e a energia.

Os compostos químicos peptídicos da invenção têm uma estrutura que lhes permite cumprir com os requerimentos para se unirem aos receptores específicos da ghrelina e ao mesmo tempo aos receptores descritos para a união de outros secretagogos que realizam as outras funções descritas.

Em uma realização particular, a invenção se refere a moléculas químicas as quais apresentam a estrutura química seguinte:



Onde **Aa** são L-aminoácidos selecionados do conjunto de [Cys, Gly, Ser, His, Ala, Leu, Met ou Thr], variando em combinações desde 1 até 4 resíduos, **Ab** são L-aminoácidos, selecionados do conjunto de [Pro, Ile, Ala, Phe, Trp, Lys, Asp, Asn, Glu, Gln, Gly, Leu, Met, Tyr ou Thr], variando

em combinações de 1 até 4 resíduos, **Ac** são L-aminoácidos selecionados do conjunto [Arg, Leu, Pro, Val, Thr, Glu, His, Gln, Asn, Asp, Trp, Tyr, Phe, Ser, Ala, Gly ou Ile], variando em combinações de 1 até 5 e **Ad** são L-aminoácidos, naturais ou não, sem limite de número,  $X_1$  e  $X_2$  são L-aminoácidos, naturais ou não, com as cadeias laterais enlaçadas covalentemente formando um ciclo interno, utilizando qualquer reação química para a união de forma direta ou utilizando um composto de enlaçamento como ponte.

Compostos pertencentes a estas classes estruturais se mostram

10 a seguir:

	A221	GSK <u>F</u> <u>D</u> SPEHQ	(SEC ID NO: 1)
	A222	HGSK <u>F</u> <u>D</u> LEFG	(SEC. ID NO: 2)
	A223	HCK <u>F</u> <u>D</u> LDWH	(SEC. ID NO: 3)
	A224	SS <u>D</u> <u>F</u> <u>K</u> LYWG	(SEC. ID NO: 4)
15	A225	AL <u>D</u> <u>F</u> <u>K</u> PNIP	(SEC. ID NO: 5)
	A226	ST <u>D</u> <u>F</u> <u>K</u> PF <del>AI</del>	(SEC. ID NO: 6)
	A227	HSK <u>G</u> <u>Y</u> <u>D</u> LDH	(SEC. ID NO: 7)
	A228	GK <u>F</u> <u>G</u> <u>D</u> LSPEHQ	(SEC. ID NO: 8)
	A229	HA <u>K</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>G</u> IDPEQ	(SEC. ID NO: 9)
20	A230	GK <u>F</u> <u>D</u> SPEHQ	(SEC ID NO: 10)
	A231	GGGK <u>F</u> <u>W</u> <u>D</u> IPHH	(SEC. ID NO: 11)
	A232	HK <u>G</u> IDSP <u>E</u> QH	(SEC ID NO: 12)
	A233	GK <u>F</u> <u>D</u> LSPEHQ	(SEC ID NO: 13)
	A234	G <u>D</u> AGAK <u>L</u> SSR	(SEC ID NO: 14)
25	A235	GMEAGIK <u>L</u> CH <u>R</u> Q	(SEC. ID NO: 15)
	A236	G <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>K</u> LD <u>E</u> RSQ	(SEC ID NO: 16)
	A237	GGEAGK <u>L</u> CP <u>P</u> RY	(SEC ID NO: 17)
	A238	GL <u>E</u> <u>F</u> <u>K</u> LLH <u>Q</u>	(SEC. ID NO: 18)

Onde os aminoácidos sublinhados estão enlaçados por suas

cadeias laterais. Estas moléculas foram descritas para esta função mediante o modelado molecular exaustivo do receptor da ghrelina humana utilizando técnicas combinadas de modelação por homologia, dinâmica molecular e buscas exaustivas no espaço conformacional. Uma vez modelado o receptor, 5 construíram modelos de união baseados na também modelação exaustiva da ghrelina e outros secretagogos, a partir do modelo das interações se construiu uma biblioteca virtual com vários milhares de estruturas de peptídeos que cumpriram com estas características para realizar uma análise conformacional, e se realizou um acoplamento molecular em massa no 10 modelo do receptor. Partindo desta análise, propôs-se uma série de compostos para várias famílias estruturais que se sintetizaram quimicamente e provaram com vários sistemas *in vivo* e *in vitro*. Depois dos ensaios biológicos se reotimizaram os compostos e geraram novas bibliotecas virtuais sobre as quais se repetiu a análise para procurar uma maior ação sobre o sistema 15 biológico mediante regularidades estruturais mais específicas.

A invenção também inclui qualquer variante homóloga dos compostos anteriores. Entende-se por “variante homóloga” qualquer molécula de natureza química similar em 70% ou mais à seqüência de aminoácidos aqui descritos (na página 30), incluindo aminoácidos não naturais, cuja estrutura 20 permita realizar o mesmo efeito dos compostos aqui descritos.

Em outra realização preferida da invenção, a composição farmacêutica contém um ou mais dos compostos químicos ou de seus sais aceitáveis, assim como excipientes ou veículos aceitáveis segundo o propósito a qual se aplica. Também faz parte da presente invenção o uso dos compostos, 25 para a manufatura de medicamentos, suplementos nutricionais, ou outras formulações de uso humano, veterinário, em aquacultura, ou outras atividades de criação ou melhoria de animais, *in vitro*, *in vivo* ou em dispositivos associados ao corpo ou de dosificação controlada ao meio, que se associem a sua ação similar a outros GHS, diretamente ou não vinculadas a sua ação

endócrina.

As moléculas químicas descritas foram definidas por sua capacidade de interatuar com o receptor da ghrelina humana, mas não se descartam outras proteínas, que não possuem uma seqüência de aminoácidos ou estrutura similar mas que unem este tipo de compostos e afetam de algum modo sua ação biológica, que seja, por ativação, por potenciação, por repressão, por concorrência ou sinergismo com outros substratos ou por algum outro mecanismo descrito ou ainda não descrito, mas evidenciado experimentalmente.

Para a definição dos compostos químicos descritos na invenção se realizou o modelado molecular exaustivo do receptor da ghrelina humana utilizando técnicas combinadas de modelação por homologia, dinâmica molecular e buscas exaustivas no espaço conformacional. Uma vez modelado o receptor se construíram modelos de união baseados na também modelação exaustiva da ghrelina e de outros secretagogos, a partir do modelo das interações se construiu uma biblioteca virtual com vários milhares de estruturas de peptídeos que cumpriram com estas características para realizar uma análise conformacional, e se realizou um acoplamento molecular massivo no modelo do receptor.

Partindo desta análise, propôs-se uma série de compostos para várias famílias estruturais que foram sintetizadas quimicamente e provadas com vários sistemas *in vivo* e *in vitro*. Depois dos ensaios biológicos preliminares, os compostos foram reotimizados e foram geradas novas bibliotecas virtuais sobre as quais se repetiu a análise aplicando-lhes uma segunda rodada de acoplamento com valores mais restritivos e foram analisados novamente para extrair as regularidades estruturais, a estrutura química dos compostos selecionados no segundo ciclo foi otimizada para obter valores maiores de energia de união calculada, entre -58 e -32 KJ/mol e para buscar uma maior ação sobre o sistema biológico mediante regularidades

estruturais mais específicas. Uma seleção representativa de 18 destes compostos, com energias de união superiores a -40 KJ/mol, foi sintetizada, purificada utilizando Cromatografia Líquida, depois analisados por Espectrometria de Massas e finalmente avaliados quanto a sua efetividade *in vitro* e *in vivo*.

#### Descrição das figuras

Figura 1: Efeito do tratamento com os compostos A221(a), A228(b) e A233(c) na prevenção da falha do miocárdico induzido por Doxorubicina (Dx).

Figura 2: Efeito protetor do composto A221(a), A228(b) e A233(c) em ratas tratadas com Dx ante estresse forçado.

Figura 3: Efeito do tratamento com os compostos A221 (a), A228(b) e A233(c) no tempo e reversão da Cardiomiopatia Dilatada induzida por Doxorubicina nos grupos tratados com doses entre 500 µg/kg e 100 µg/kg.

Figura 4: Efeito do tratamento com o composto A221 (a), A228(b) e A233(c) na sobrevida dos animais com Cardiomiopatia Dilatada induzida por Doxorubicina(Dx).

#### Exposição detalhada de modos de realização / Exemplos

A presente invenção se explica através dos seguintes exemplos de realização:

Exemplo 1: Seleção dos compostos mediante modelação molecular *in silício*.

Os compostos resultantes do segundo ciclo de avaliação computacional foram otimizados obtendo-se valores superiores de energias de união e regularidades estruturais mais específicas em sua união ao receptor. Deles foram selecionados 18 compostos representativos com energias anteriormente referidas maiores de -40 KJ/mol as quais se mostram na tabela 1.



Tabela 1. Energia calculada da interação com o modelo do Receptor de Secretagogos do Hormônio de Crescimento, depois do acoplamento molecular.

Composto	Energia (KJ/mol)	Composto	Energia (KJ/mol)
A221	-52,54	A230	-56,27
A222	-49,80	A231	-42,32
A223	-43,76	A232	-50,30
A224	-42,93	A233	-58,06
A225	-54,99	A234	-53,14
A226	-40,00	A235	-45,94
A227	-41,01	A236	-45,20
A228	-40,93	A237	-50,01
A229	-52,25	A238	-51,11

Exemplo 2: Prevenção da morte das células PC12 por  
5 deprivação de NGF.

As células PC12 foram mantidas em frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> em DMEM contendo 5% de soro fetal bovino e 10% de soro eqüino, em presença de gentamicina 50 µg/ml. As células foram incubadas em 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Para induzir a diferenciação, as células foram semeadas a uma  
10 densidade de 1x10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços recobertas com polilisina em meio DMEM suplementado com NGF por 7 dias, com mudança de meio a cada 2-3 dias. Depois da diferenciação, as células foram incubadas com os compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento, com diferentes concentrações por 72 horas. A viabilidade celular foi  
15 determinada utilizando o ensaio de proliferação citotoxidad Cell Titer 96 não-radioativo (Promega), que se baseia na conversão de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolio (MTT) em um produto que se detecta espectrofotometricamente. Depois da deprivação do NGF e do soro, o meio é aspirado e se adicionam 15 µl do corante dissolvido em DMEM. Depois de 4  
20 h de encubação a 37°C, 100 µl da solução de paragem é adicionada e a absorção do produto solubilizado é medido a 570 nm.

Os compostos produzem um efeito de neuroproteção

dependente da concentração. Na tabela 2 se representa a IC50 de cada um dos peptídeos. Tabela 2. Valores de IC50 de cada composto durante os experimentos de proteção da morte neuronal induzida por deprivação de NGF.

<b>Composto</b>	<b>IC50 uM</b>	<b>Composto</b>	<b>IC50 uM</b>
A221	2,02	A230	4,06
A222	2,03	A231	4,00
A223	3,12	A232	4,89
A224	2,37	A233	5,00
A225	4,07	A234	5,86
A226	4,87	A235	2,05
A227	3,06	A236	3,00
A228	3,99	A237	3,33
A229	3,41	A238	2,04

5                      Exemplo 3: Prevenção do dano neuronal induzido pela adição de Peróxido de Hidrogênio em um cultivo primário de neurônios.

Cultivos primários de células granulares do cerebelo foram obtidos a partir dos cerebelos de ratas Wistar de 7-9 dias. Posterior a uma dissecação rápida, os cerebelos foram submergidos em uma solução fria de meio e as meninges foram eliminadas da superfície do cerebelo. Cada cerebelo foi colocado em uma solução de 2-3 ml de meio fresco e cortado finamente. As células foram dissociadas por trituração utilizando uma pipeta Pasteur. As células dissociadas foram filtradas por uma membrana de nylon de 40  $\mu$ M (Falcon, Franklin Lakes, NJ.). O número de células viáveis foi determinado em um hematocítômetro por contagem de células que excluem o corante vital tripan azul. As células foram semearam em placas de 96 poços recobertas com polilisina a uma densidade de 6250 células em um volume final de 200  $\mu$ l. Os cultivos foram mantidos em uma incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% e 37°C. Depois de 24 horas de cultivo, adicionou-se 10  $\mu$ M de citosina arabinofuranosa (AraC; Sigma) para inibir a proliferação das células não neuronais.

A capacidade de prevenir o dano neuronal induzido pela

adição ao meio de cultivo de 500  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio em concentrações crescentes de cada um dos compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento, foi avaliado às 24 horas utilizando o ensaio de proliferação/citotoxicidade Cell Titer 96 não-radioativo (Promega).

Os compostos produzem um efeito de neuroproteção dependente da concentração. Na tabela 3 se representa a IC<sub>50</sub> de cada um dos peptídeos. Tabela 3. Valores de IC<sub>50</sub> de cada composto durante os experimentos de prevenção do dano neuronal induzido por adição de Peróxido de Hidrogênio ao cultivo primário de neurônios.

<b>Composto</b>	<b>IC<sub>50</sub> uM</b>	<b>Composto</b>	<b>IC<sub>50</sub> uM</b>
A221	1,80	A230	3,81
A222	1,30	A231	3,46
A223	2,47	A232	3,28
A224	3,20	A233	3,56
A225	3,99	A234	3,72
A226	3,58	A235	1,01
A227	2,26	A236	3,33
A228	1,77	A237	2,51
A229	1,33	A238	1,00

Exemplo 4: Demonstração da atividade biológica dos compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento, em peixes.

Determinaram-se os níveis de RNA mensageiro do IGF-I em fígado de tilapias injetadas intraperitonealmente, assim como se monitorou os níveis de GH nos mesmos animais no tempo, demonstrando-se que os compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento eram capazes de estimular, em peixes, a presença de GH circulante em sangue e como resposta a isto de incrementar os níveis do RNA mensageiro do IGF-I depois da injeção dos compostos, como se mostra na tabela 4.

Tabela 4. Níveis de RNA mensageiro de IGF1 normalizados contra um grupo controle onde se utiliza um peptídeo sintético não

relacionado.

<b>Composto</b>	<b>IGF1</b>	<b>Composto</b>	<b>IGF1</b>
A221	1,32	A230	1,48
A222	1,115	A231	1,39
A223	1,40	A232	1,23
A224	1,41	A233	1,69
A225	1,38	A234	1,17
A226	1,13	A235	0,9
A227	1,28	A236	1,13
A228	1,18	A237	1,201
A229	1,09	A238	1,24

Exemplo 5: Experimento de crescimento em tilapias jovens tratadas com compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento:

5 5.1 Aceleração do crescimento em tilapias tratadas com compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento por via intraperitoneal (ip)

Os compostos foram diluídos em solução tampão de fosfato de sódio (PBS) e injetados duas vezes na semana durante três semanas a 0.1 µg/g de peso úmido de cada peixe (gbw). Os compostos foram aplicados de forma individual a um grupo de 10 tilapias machos com peso médio de  $60.41 \pm 10.36$  g e se utilizou um grupo controle de 10 tilapias machos com peso médio de  $60.58 \pm 19.67$  g o qual recebeu PBS. Mediu-se o peso médio em cada semana. Todos os animais do experimento foram marcados com microchips (Stoelting Co. Wood Dale, E.U.). Obtendo-se um incremento de peso, cujo máximo foi de 165% nos peixes injetados em relação aos que receberam PBS como se observa na tabela 5.

Tabela 5. Incremento de peso em % para os animais tratados tomando 100% como o crescimento do grupo controle.

<b>Composto</b>	<b>Incremento de peso em (%)</b>	<b>Composto</b>	<b>Incremento de peso em (%)</b>
A221	98,0	A230	158,0
A222	96,2	A231	150,2
A223	105,0	A232	160,1

A224	132,7	A233	165,0
A225	120,0	A234	110,6
A226	122,4	A235	89,9
A227	139,9	A236	99,0
A228	130,6	A237	100,0
A229	126,5	A238	129,4

Neste mesmo experimento se estudou a presença de Trichodínicos e helmintos monogênicos nos animais utilizados no ensaio, para observar e comparar a intensidade e a extensão da invasão destes agentes patogênicos nos grupos tratados, cujo exame comparado com os controles que exibiram seis cruces como média, mostra-se na tabela 6.

Tabela 6. Intensidade da infecção com patogênicos (Trichodínicos e helmintos) vista em animais tratados com os compostos ensaiados.

Composto	patogênicos	Composto	patogênicos
A221	+++++	A230	++
A222	++++	A231	++
A223	++++	A232	++
A224	++++	A233	++
A225	++++	A234	+++
A226	+++	A235	+++
A227	++++	A236	++++
A228	+++	A237	+++
A229	+++	A238	+++

5.2 Estimulação do crescimento em larvas de tilapias (*Oreochromis sp*) mediante os compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento, via imersão.

Se realizou a avaliação do crescimento em larvas de tilapia *Oreochromis sp.*, 100 larvas por grupo, de 0.01 g utilizando os compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento, em dose de 100 µg/L de água, duas vezes por semana com uma hora de duração, ao cabo de três semanas se conseguiu uma estimulação do crescimento de 155 % no peso médio dos animais tratados em relação aos tratados com PBS como se mostra na tabela 7.

Tabela 7. Incremento de peso em % para os animais tratados tomando 100% como o crescimento do grupo controle.

Neste experimento se mediram também os níveis de lisozima e se obteve um incremento da presença deste marcador da imunidade nos

<b>Composto</b>	<b>Incremento de peso em (%)</b>	<b>Composto</b>	<b>Incremento de peso em (%)</b>
A221	97,0	A230	150,0
A222	96,0	A231	151,0
A223	102,0	A232	148,3
A224	130,0	A233	155,0
A225	98,0	A234	120,6
A226	120,4	A235	90,0
A227	140,6	A236	105,0
A228	132,0	A237	109,9
A229	125,0	A238	112,6

5 animais tratados, como se mostra na tabela 8.

Tabela 8. Níveis de Lisozima nos animais tratados com relação ao grupo controle.

<b>Composto</b>	<b>Lisozima</b>	<b>Composto</b>	<b>Lisozima</b>
A221	1,01	A230	1,33
A222	1,43	A231	1,89
A223	1,52	A232	2,41
A224	1,37	A233	2,68
A225	1,43	A234	2,77
A226	1,17	A235	1,90
A227	1,52	A236	1,42
A228	1,08	A237	1,01
A229	1,15	A238	1,33

Exemplo 6: Experimento de crescimento em camarões v  
*Litopenaeus vanamei* por banhos de imersão com os compostos análogos aos  
 10 secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento.

Tomaram-se grupos de larvas de camarões, lhes aplicaram quatro banhos de imersão, um a cada três dias de uma hora de duração com diferentes concentrações dos compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento. A concentração utilizada foi 0.1mg/L, ao grupo

controle foi dado a mesma frequência de banhos de imersão com BSA a 1 mg/L.

Como resultado, observou-se que o grupo tratado melhorava a qualidade das larvas dos camarões *Litopenaeus vanamei*. Isto foi evidenciado por um incremento de peso de 120-150%, de 10-25% de incremento no tamanho, como se mostra na tabela 9, exibindo, além disso, um maior número de pares de ramificações branquiais e modificações rostrais. Além disso, descobriu-se que de maneira geral os animais tratados apresentavam menor conteúdo de água no músculo e maiores valores das relações RNA/DNA, Proteína/DNA, evidenciando a ativação do metabolismo do músculo destas larvas.

Tabela 9. Incremento de peso e tamanho em % para os animais tratados tomando 100% como os valores do grupo controle do grupo controle.

Composto	Incremento de peso em (%)/ Incremento tamanho em (%)	Composto	Incremento de peso em (%)/ Incremento tamanho em (%)
A221	120,1/112,0	A230	150,0/123,6
A222	121,0/112,2	A231	130,0/123,0
A223	120,0/110,9	A232	132,8/123,0
A224	127,0/116,0	A233	143,0/124,9
A225	121,0/112,6	A234	123,6/114,2
A226	120,1/112,2	A235	121,0/112,5
A227	128,6/118,5	A236	121,0/112,0
A228	128,2/118,9	A237	127,0/116,2
A229	126,1/115,9	A238	129,2/117,9

O experimento anterior foi corroborado em condições de produção para os compostos A221, A228 e A233, com um aumento da sobrevivência de 20% nos animais tratados comparado com seus irmãos controles, além disso, mantendo-se uma estimulação média de 110% no peso e de 30% no tamanho, mostrando os animais tratados maior homogeneidade no tamanho do que seus irmãos não tratados refletindo-se no coeficiente de

variação de somente 30% e 8% no peso e no tamanho respectivamente em animais tratados com o peptídeo a diferença do 77% e 30% que se observa no peso e no tamanho nos animais irmãos.

Exemplo 7: Estimulação do crescimento em camarões mediante a inclusão na dieta dos compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento.

Os compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento foram incluídos em uma dieta para pós-larvas de crustáceos a 1%. Posteriormente se alimentaram pós-larvas de *Litopenaeus vanamei* com a dieta mencionada, assim como um controle com BSA incluso na ração. O efeito foi estimado medindo o comprimento do carapaça das larvas e pós-larvas com um micrômetro ótico e pesadas em uma balança de 0.1 mg de erro.

Os compostos incluídos na dieta incrementaram o crescimento dos camarões entre 30-40% em relação ao controle, como se mostra na tabela 10.

Tabela 10. Incremento de tamanho em % para os animais tratados tomando 100% como o crescimento do grupo controle.

Composto	Incremento de tamanho em (%)	Composto	Incremento de tamanho em (%)
A221	130,0	A230	140,0
A222	131,0	A231	140,1
A223	131,6	A232	139,7
A224	131,2	A233	140,1
A225	130,0	A234	138,6
A226	130,4	A235	137,0
A227	139,0	A236	137,0
A228	140,0	A237	132,0
A229	140,0	A238	130,1

#### 7.1: Encapsulação em *Artemia salina*

Os compostos análogos aos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento foram bioencapsulados em *Artemia* com as quais



foram alimentadas as pós-larvas de *Litopenaeus vanamei*. Para bioencapsular cada um na *Artemia salina*, foram adicionados a uma concentração de 10 mg/L durante 1 hora e foram colhidos e lavados. Posteriormente se alimentaram as pós-larvas de *Litopenaeus vanamei* com esta *Artemia* quatro vezes ao dia durante um mês de experimentação. O grupo controle foi alimentado com *Artemia salina* com BSA bioencapsulada. O efeito dos compostos foi estimado medindo o comprimento da carapaça das larvas e pós-larvas com um micrômetro ótico e pesadas em uma balança de 0.01 mg de erro.

Os compostos bioencapsulados em *Artemia salina* incrementaram o crescimento dos indivíduos entre 30% e 40% em relação ao controle. Com diferenças altamente significativas ( $p < 0.001$ ) como se mostra na tabela 11.

Tabela 11. Incremento de tamanho em % para os animais tratados tomando 100% como o crescimento do grupo controle.

Composto	Incremento de tamanho em (%)	Composto	Incremento de tamanho em (%)
A221	130,2	A230	140,0
A222	130,3	A231	140,2
A223	132,0	A232	139,6
A224	130,0	A233	140,0
A225	130,0	A234	135,0
A226	132,0	A235	134,2
A227	140,0	A236	138,0
A228	140,0	A237	136,0
A229	140,0	A238	140,0

Exemplo 8: Efeito cardioprotetor dos compostos análogos dos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento em ratas.

Para reproduzir a fisiopatogenia da Cardiomiopatia Dilatada (CMD) ratas Wistar fêmeas de 160 g foram tratadas com Doxorubicina (Dx) a 2mg/kg durante 8 semanas. Um grupo destas ratas foi tratado concomitantemente com os compostos A221, A228 e A233 a 500µg/Kg que

foram administrados diariamente por via intraperitoneal durante 8 semanas do tratamento com Dx. O outro grupo dos animais tratados com Dx recebeu solução salina a modo de placebo. Como controle são deste experimento se utilizou um grupo de ratas Wistar da mesma idade sem tratar com Dx.

5                   Ao finalizar o período de tratamento foi realizado um ecocardiograma em todas as ratas, para comprovar o estado funcional do ventrículo em termos de fração de ejeção ventricular (FEV). Como se pode apreciar na Fig. 1, as ratas que recebem o tratamento concomitante Dx-composto A221(1a), A228(1b) e A233(1c) mal modificam a FEV ( $p>0.05$ )  
10 em relação ao controle etário são, em troca o grupo que recebe solução salina a modo de placebo sofre uma queda da FEV em torno de 40% ( $p<0.01$ ), em relação ao controle são.

Para demonstrar desde o ponto de vista funcional o que implica a queda da FEV, aos efeitos da CMD e da repercussão que tem isto na  
15 resposta ante o estresse, as ratas foram submetidas a natação forçada durante 30 minutos em água a 4°C. Como se aprecia na Fig.2, os animais que receberam o tratamento concomitante Dx-composto A221(2a), A228(2b) e A233(2c) têm uma sobrevida de um 100% e dos do grupo Dx-solução salina somente sobreviveu 45 % ( $p=0.0043$ ). Estes resultados sugerem que a  
20 proteção conferida pelos compostos A221, A228 e A233, não só garante a manutenção da FEV mas como, além disso, em condições de estresse forçado o miocárdio resiste sem claudicação.

Exemplo 9: Efeito cardioprotetor e de reversão da CMD dos compostos análogos dos secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento  
25 em ratas.

Para demonstrar se existe um efeito dose-resposta e de reversão da CMD foi realizado um experimento de indução de CMD em ratas Wistar, com Dx a 2mg/kg durante 8 semanas. Posteriormente lhes é realizado ecocardiograma e seleccionam todas as ratas nas quais a FEV tenha caído

abaixo de 40%. Estas ratas foram divididas em grupos (n=8) e começaram a tratar com diferentes doses dos compostos A221, A228 e A233:

- 500 µg/kg,
- 250 µg/kg,
- 100 µg/kg,
- 50 µg/kg,
- 25 µg/kg,
- 10 µg/kg
- Solução Salina.

5

10

Definindo-se os grupos de base com dose do Peptídeo A221 com que foram tratados.

15

20

Como se aprecia na Fig. 3, duas semanas de tratamento com o Efeito cardioprotetor dos compostos A221 (3a), A228(3b) e A233(3c) reverte a CMD parcialmente no ranking de dose compreendido entre 500 µg/kg e 50 µg/kg, mas em 4 semanas de tratamento a reversão da CMD é total somente nos grupos que recebem os compostos A221, A228 e A233 no ranking compreendido entre 500 µg/kg e 100 µg/kg. A dose de 50 µg/kg, embora não seja efetiva na recuperação total da FEV, é medianamente efetiva em reduzir a mortalidade dos animais tratados em relação ao placebo e aos grupos tratados com doses inferiores, estes animais não recuperam a FEV e inclusive têm uma menor sobrevida dias depois de finalizado o tratamento (Fig. 4, a A221, b A228 e c A233).

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

<120> COMPOSTOS ANÁLOGOS AOS SECRETAGOGOS PEPETÍDICOS DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E PREPARAÇÕES QUE OS CONTÊM, .

<130> ACUABIO5

<140>

<141>

<150> CU 2006- 0050

<151> 2006-02-28

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys3 e Asp5.

<400> 1

Gly	Ser	Lys	Phe	Asp	Ser	Pro	Glu	His	Gln
1				5					10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys4 e Asp6.

<400> 2

His	Gly	Ser	Lys	Phe	Asp	Leu	Glu	Phe	Gly
1				5					10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys3 e Asp5.

<400> 3

His	Cys	Lys	Phe	Asp	Leu	Asp	Trp	His
1				5				

<210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Asp3 e Lys5.

<400> 4  
 Ser Ser Asp Phe Lys Leu Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Asp3 e Lys5.

<400> 5  
 Ala Leu Asp Phe Lys Pro Asn Ile Pro  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Asp3 e Lys5.

<400> 6  
 Ala Leu Asp Phe Lys Pro Asn Ile Pro  
 1 5

<210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys3 e Asp6.

<400> 7  
 His Ser Lys Gly Tyr Asp Leu Asp His  
 1 5

<210> 8

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys2 e Asp5.

<400> 8  
 Gly Lys Phe Gly Asp Leu Ser Pro Glu His Gln  
           1                                  5                                  10

<210> 9  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys3 e Asp8

<400> 9  
 His Ala Lys Pro Gly Gly Ile Asp Pro Glu Gln  
           1                                  5                                  10

<210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys2 e Asp4.

<400> 10  
 Gly Lys Phe Asp Ser Pro Glu His Gln  
           1                                  5

<210> 11  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys4 e Asp7.

<400> 11  
 Gly Gly Gly Lys Phe Trp Asp Ile Pro His His  
           1                                  5                                  10

<210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys2 e Asp5.

<400> 12

His Lys Gly Ile Asp Ser Pro Glu Gln His  
1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Lys2 e Asp4.

<400> 13

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

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Asp2 e Lys6.

<400> 14

Gly Asp Ala Gly Ala Lys Leu Leu Ser Ser Arg  
1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Glu3 e Lys7.

<400> 15

Gly Met Glu Ala Gly Ile Lys Leu Cys His Arg Gln  
1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo

interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente.  
Ciclo nas cadeias laterais de Glu2 e Lys5.

<400> 16

Gly Glu Gly Tyr Lys Leu Asp Glu Arg Ser Gln  
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Glu3 e Lys6.

<400> 17

Gly Gly Glu Ala Gly Lys Leu Cys Pro Pro Arg Tyr  
1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência : Exemplo sequência de peptídeo com ciclo interno realizando as regularidades estruturais descritas na patente. Ciclo nas cadeias laterais de Glu3 e Lys5.

<400> 18

Gly Leu Glu Phe Lys Leu Leu His Gln  
1 5



## REIVINDICAÇÕES

1. Compostos químicos de natureza peptídica, com ciclos internos e constituídos de aminoácidos com estereoquímica L, e suas variantes homólogas, que são capazes de realizar funções similares às atribuídas à ghrelina, des-acil ghrelina, e outros Secretagogos do Hormônio de crescimento peptídicos, e caracterizados pelo fato de que têm uma estrutura química definida pela seqüência aminoácida seguinte que inclui uma deleção por suas cadeias laterais ou empregando qualquer agente químico, e que são selecionados cumprindo com as seguintes regularidades estruturais

$$10 \quad [Aa_1...Aa_n] X_1 [Ab_1...Ab_n] X_2 [Ac_1... Ac_n]Ad_n$$

onde **Aa** são L-aminoácidos selecionados do conjunto de [Cys, Gly, Ser, His, Ala, Leu, Met ou Thr], variando em combinações desde 1 até 4 resíduos, **Ab** são L-aminoácidos, selecionados do conjunto de [Pro, Ile, Ala, Phe, Trp, Lys, Asp, Asn, Glu, Gln, Gly, Leu, Met, Tyr ou Thr], variando em combinações de 1 até 4 resíduos, **Ac** são L-aminoácidos selecionados do conjunto [Arg, Leu, Pro, Val, Thr, Glu, His, Gln, Asn, Asp, Trp, Tyr, Phe, Ser, Ala, Gly ou Ile], variando em combinações de 1 até 5 e **Ad** são L-aminoácidos, naturais ou não, sem limite de número, **X<sub>1</sub>** e **X<sub>2</sub>** são L-aminoácidos, naturais ou não, com as cadeias laterais enlaçadas covalentemente formando um ciclo interno, utilizando qualquer reação química para a união de forma direta ou utilizando um composto de ligação como ponte.

2. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais compostos químicos de acordo com a reivindicação 1, ou seus sais; e excipientes ou veículos farmacologicamente aceitáveis.

3. Composição farmacêutica, de acordo à reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que os compostos químicos de natureza peptídica se encontram em uma classificação entre 2 e 100 µg/ml quando são preparados em forma de solução ou como sal liofilizado.

4. Composição veterinária, para a aquacultura ou outras

atividades de criação ou melhoria de animais, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais compostos químicos de acordo com a reivindicação 1, ou seus sais; e excipientes ou veículos aceitáveis para uso veterinário.

5        5. Composição veterinária, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que é administrada como **ração**, suplemento nutricional, injeções periódicas ou banhos de imersão, para a estimulação do crescimento e do aumento da resistência a doenças em peixes e crustáceos.

10       6. Método para induzir a liberação de hormônio de crescimento em um paciente que o requer, caracterizado pelo fato de que se faz pela administração de um ou mais compostos químicos de acordo com a reivindicação 1, ou seus sais.

15       7. Método para induzir cardioproteção, neuroproteção, controle e regulação do apetite, incluindo a regulação do metabolismo das gorduras e a energia em um paciente que o requer, caracterizado pelo fato de que se faz pela administração de um ou mais compostos químicos de acordo com a reivindicação 1, ou seus sais.

      8. Método para estimular o crescimento e resistência a doenças em organismos aquáticos, caracterizado pelo fato de que se emprega um ou mais compostos químicos de acordo com a reivindicação 1, ou seus sais.

20       9. Método para estimular o crescimento e resistência a doenças em organismos aquáticos, de acordo a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que os compostos químicos de natureza peptídica se encontram no ranking de 0,01-1% se são administrados como ração para a alimentação; no ranking de 0,05-10 µg de composto por grama de peso úmido do animal se são  
25       administrados como injeções periódicas; ou no ranking entre 10-500 µg de composto por litro se são administrados por banhos de imersão.

Figura 1a

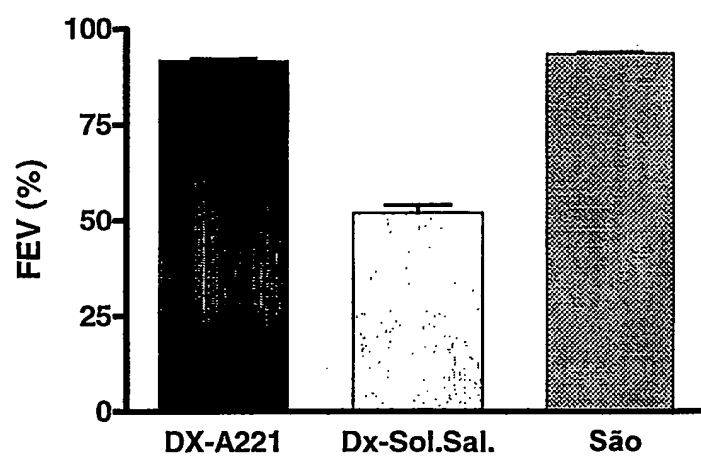


Figura 1b

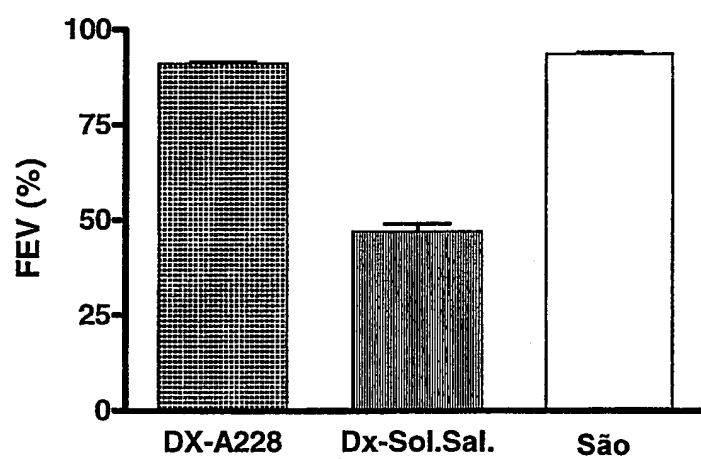


Figura 1c

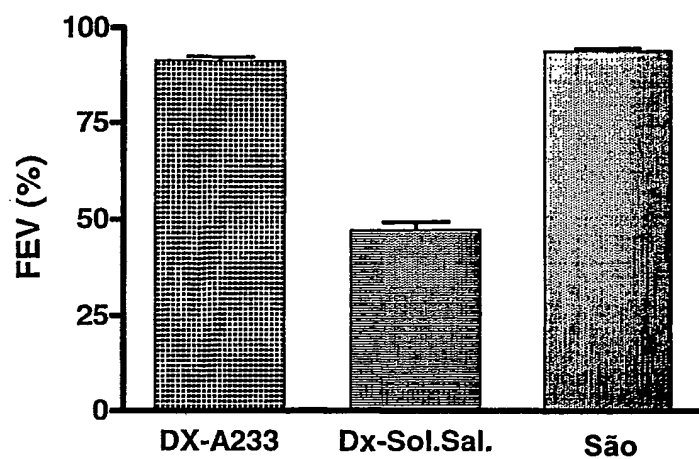


Figura 2a

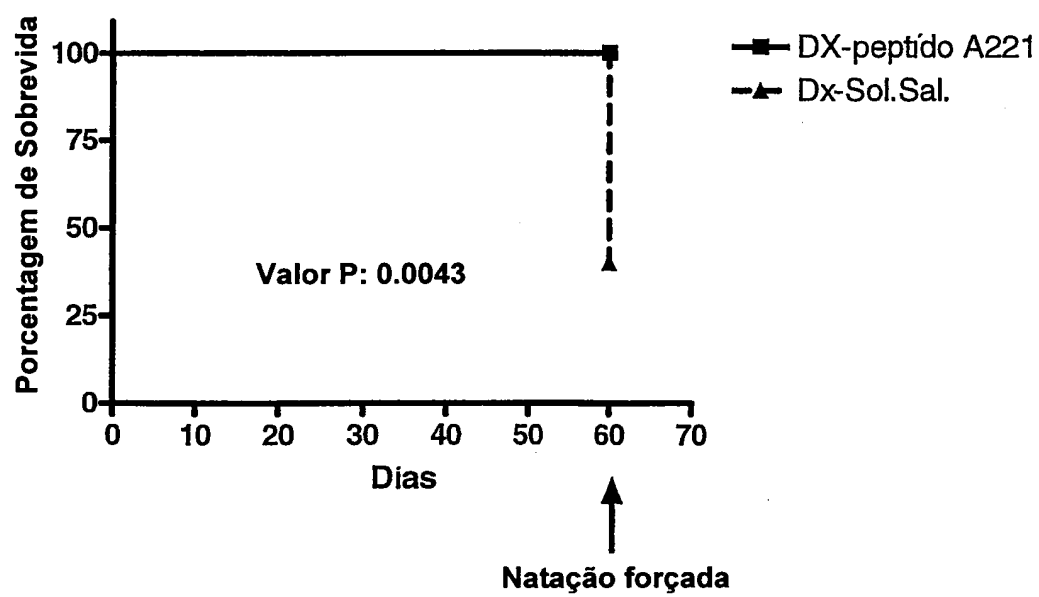


Figura 2b

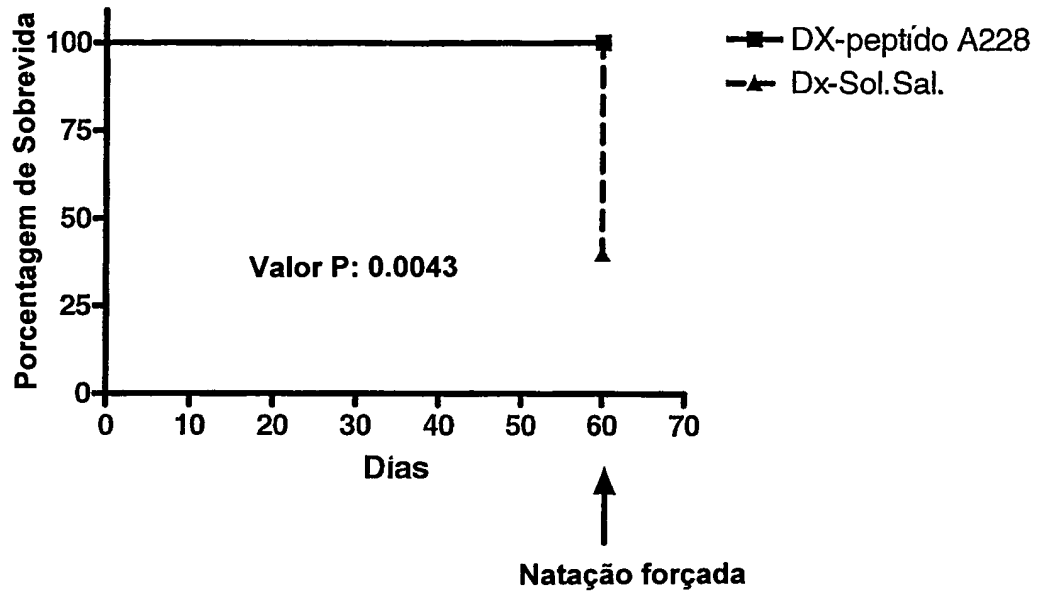


Figura 2c

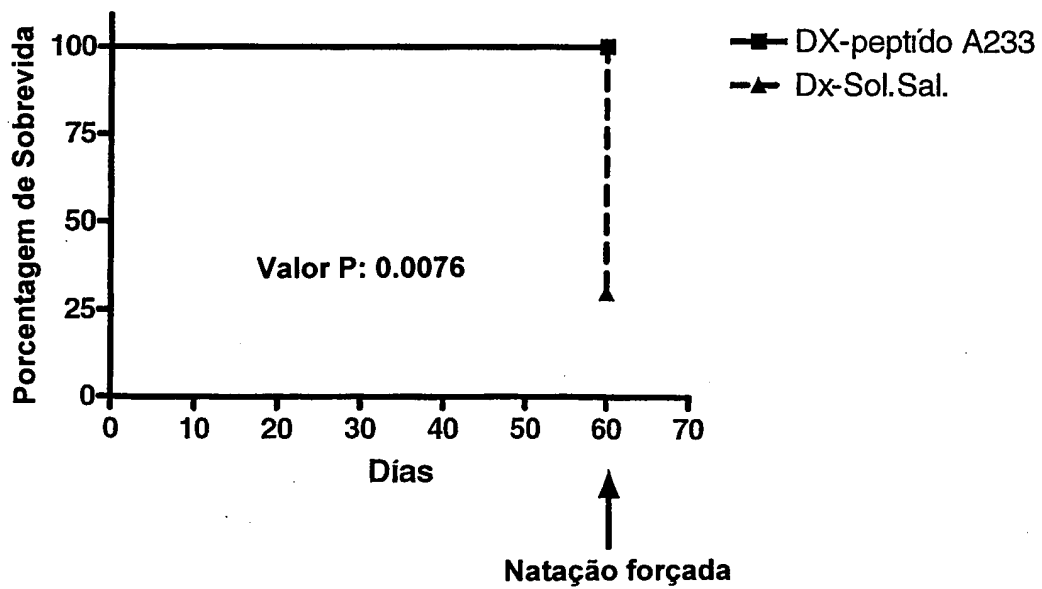


Figura 3a

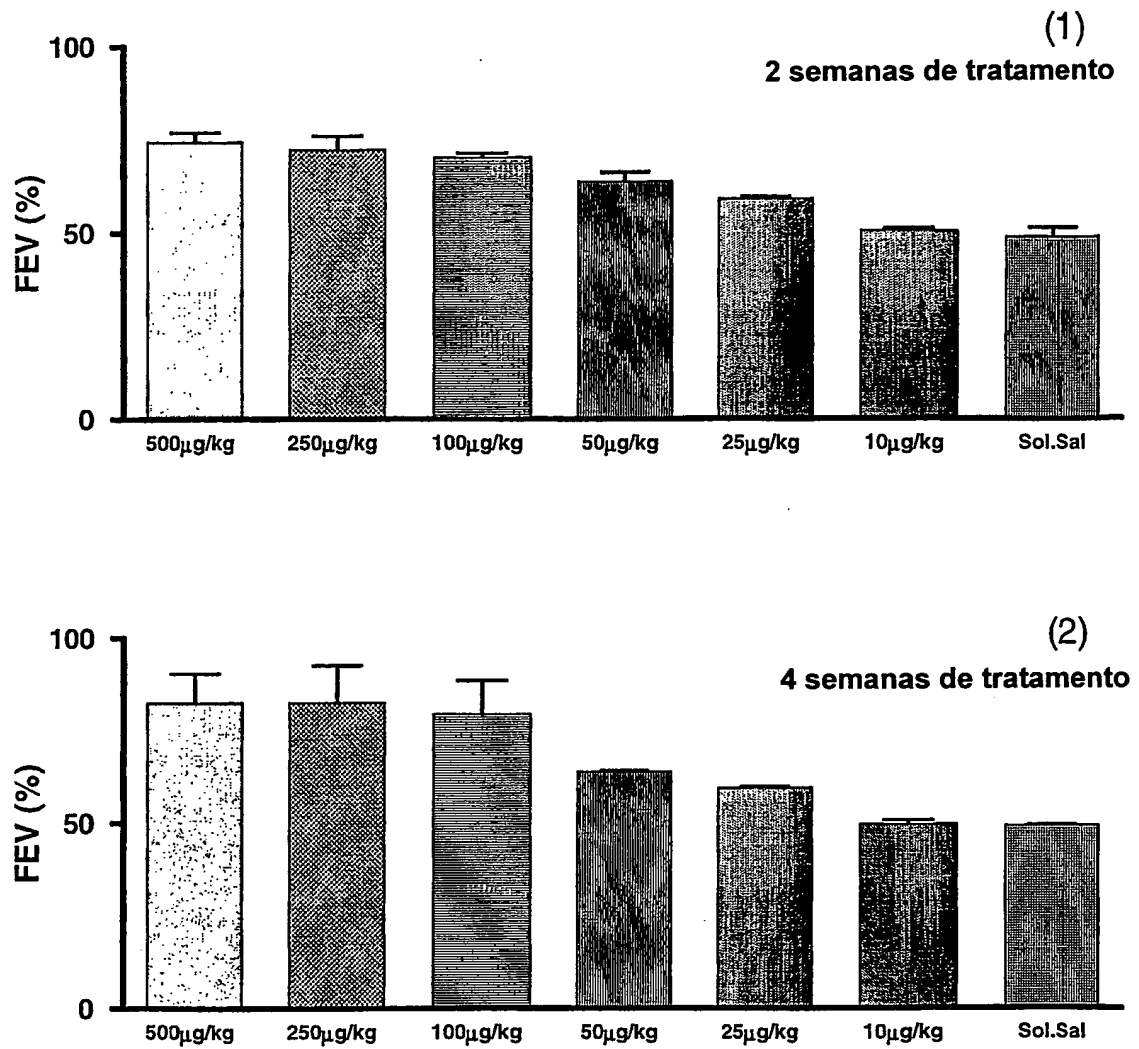


Figura 3b

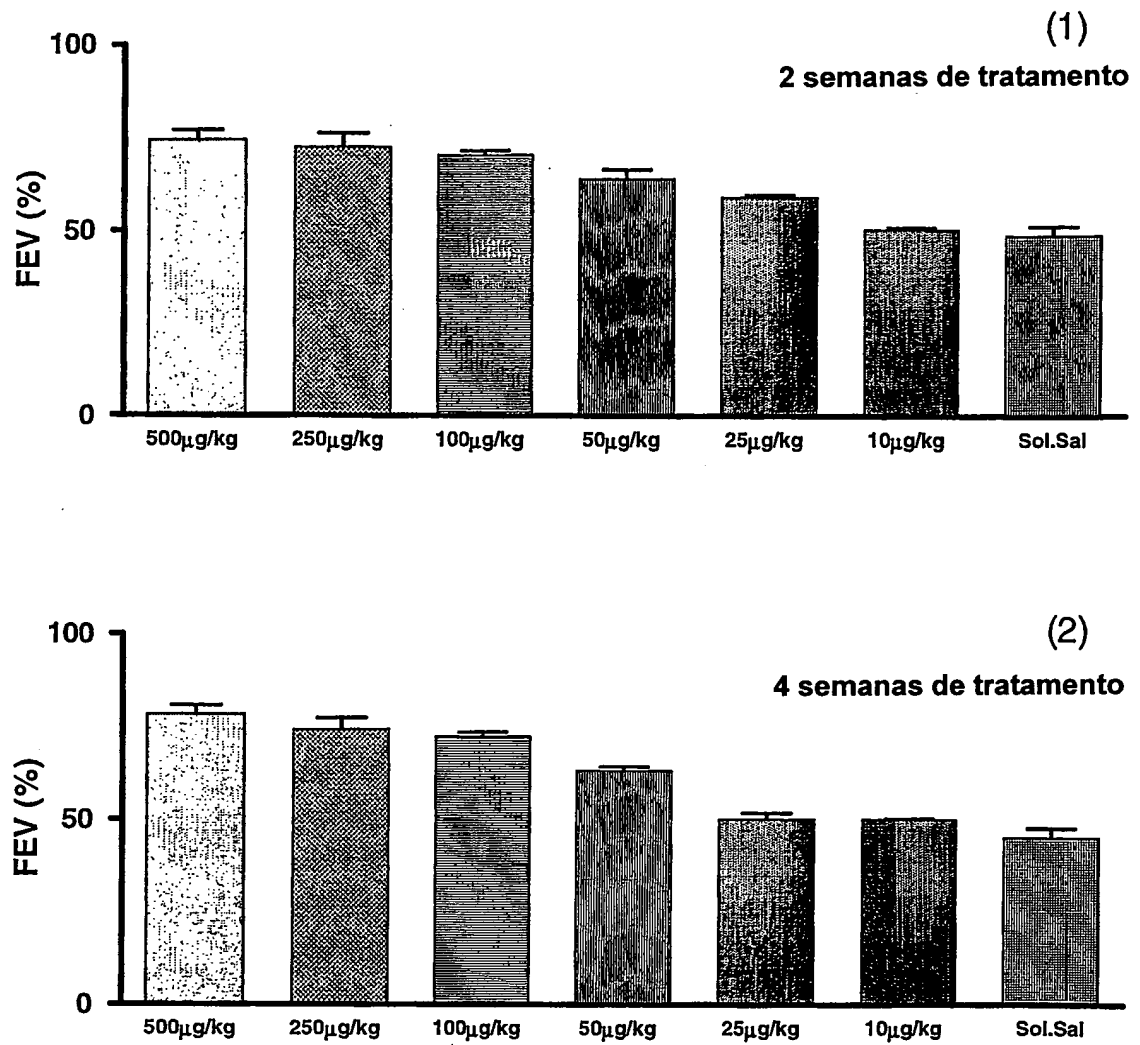


Figura 3c

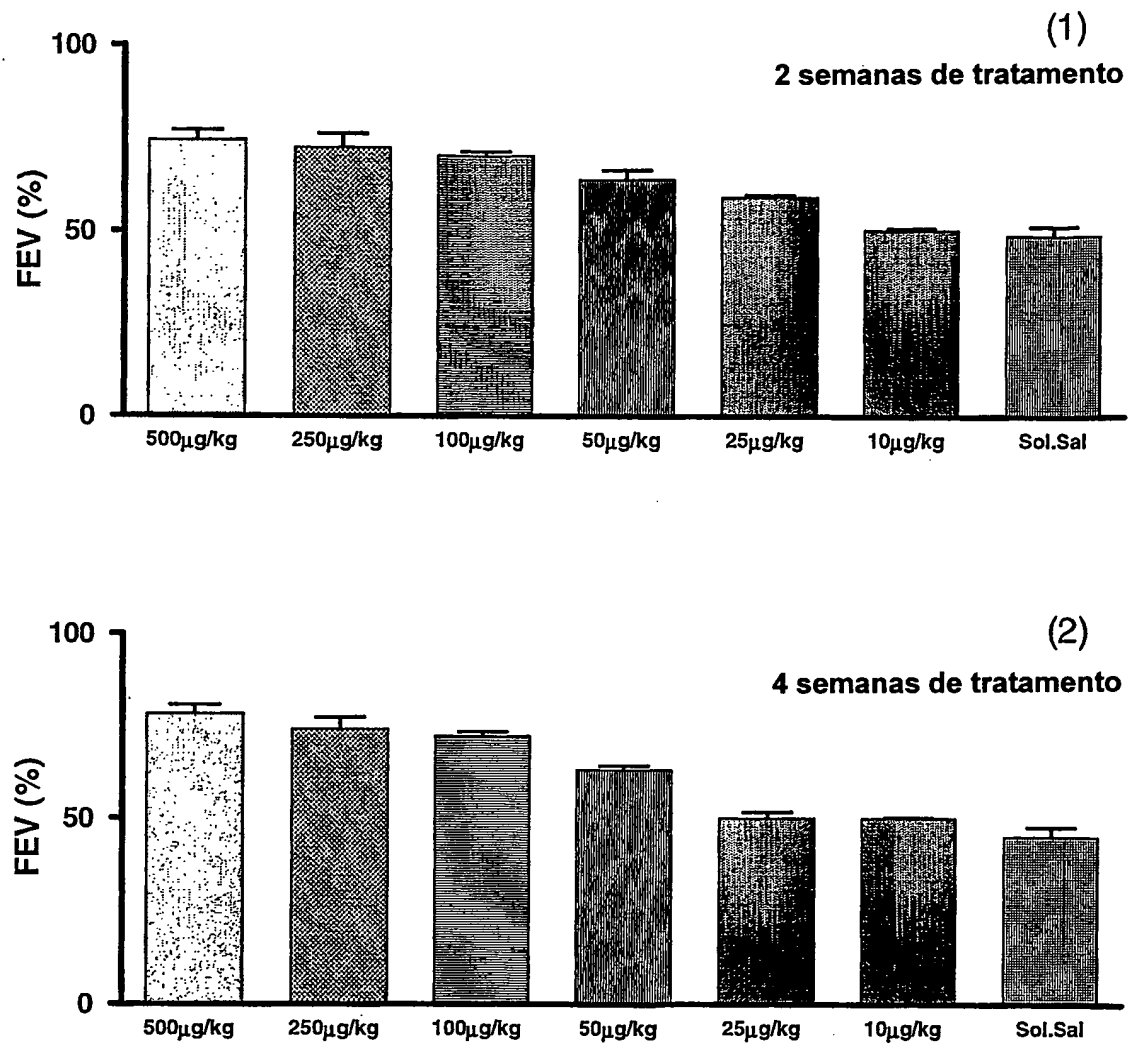




Figura 4a

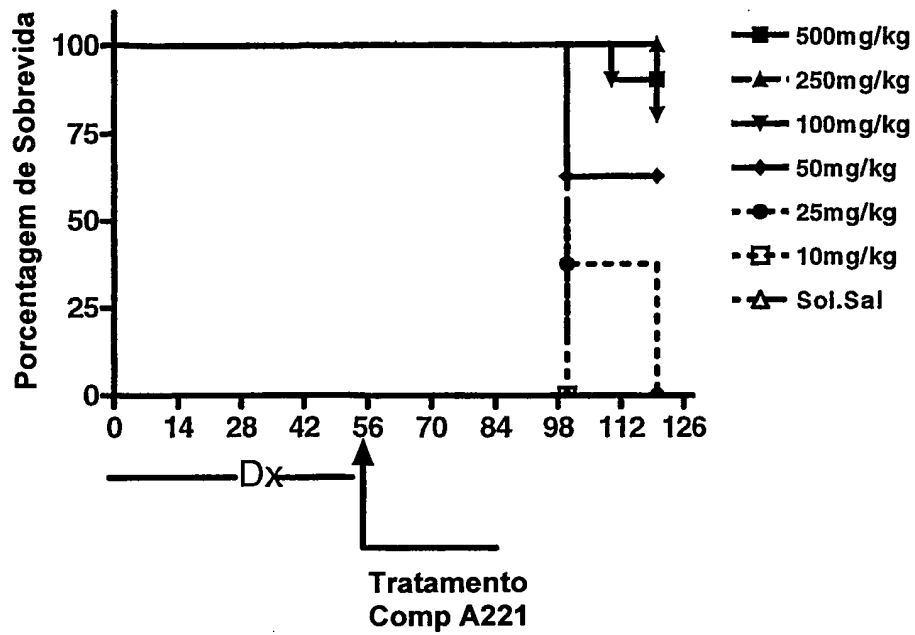


Figura 4b

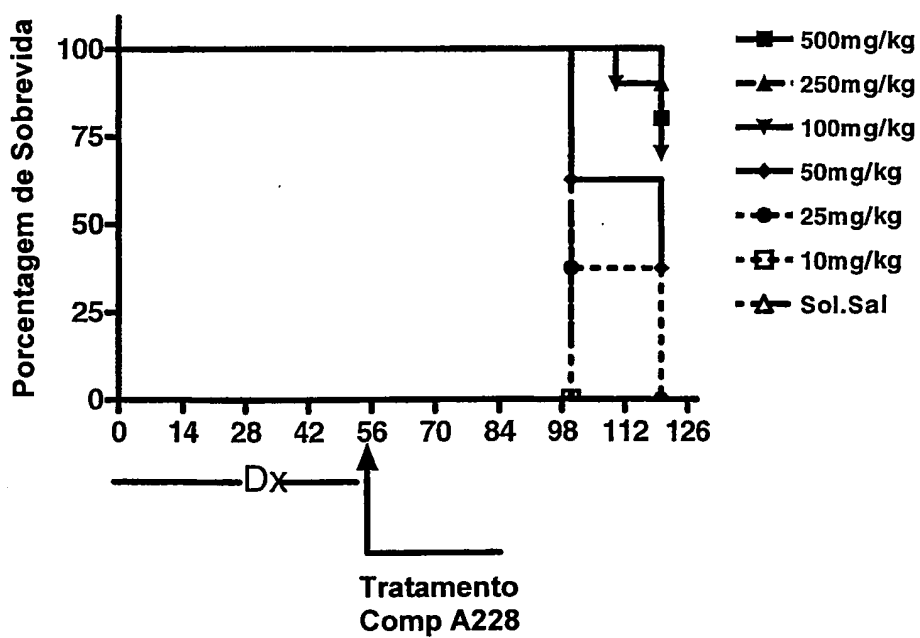
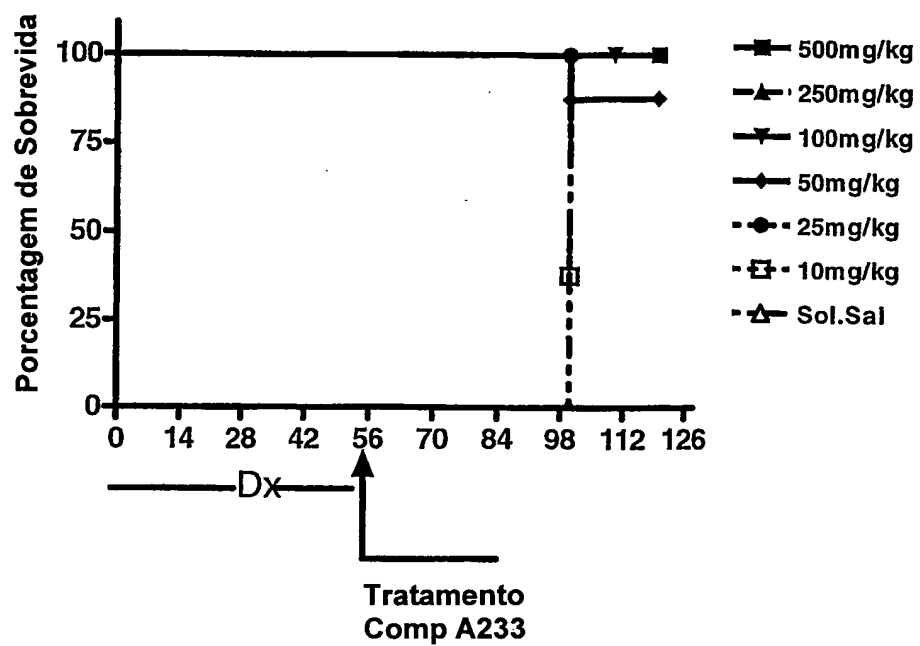


Figura 4c



PI 0403366-1  
PET / 202057 / 000007 1

### RESUMO

“COMPOSTOS QUÍMICOS DE NATUREZA PEPTÍDICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, COMPOSIÇÃO VETERINÁRIA E USO DE COMPOSTOS QUÍMICOS”

5 Compostos químicos peptídicos obtidos por modelação molecular in silico, e cuja estrutura lhes permite efetuar as mesmas funções que os secretagogos peptídicos do hormônio de crescimento. A invenção compreende, além disso, as composições que contêm os referidos compostos e seu uso na preparação de medicamentos, suplementos nutricionais, ou outras  
10 formulações de uso humano ou animal.