

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
7 de Septiembre de 2007 (07.09.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/098716 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07K 7/06 (2006.01) **C07K 14/60** (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/CU2007/000007

(22) Fecha de presentación internacional:

28 de Febrero de 2007 (28.02.2007)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

2006-0050 28 de Febrero de 2006 (28.02.2006) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA [CU/CU]; Avenida 31 Entre 158 Y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 10 600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **RODRIGUEZ FERNANDEZ, Rolando, Eduardo** [CU/CU]; Avenida 31 Entre 182 Y 184, # 18207 Apto 41, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 10 600 (CU). **DE LA NUEZ VEULENS, Ania** [CU/CU]; Calle M Entre 11 Y 13, # 64 Apto 8d Bajos, Vedado, Ciudad De La Habana 10 400 (CU). **ESTRADA GARCÍA, Mario, Pablo** [CU/CU]; Calle: 186 Entre 31 Y 33, #3112, Apto.10, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 12 100 (CU). **MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, Rebeca** [CU/CU]; Calle: 186 Entre 31 Y 33, #3115, Apto.8b, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 12 100 (CU). **CHINEA SANTIAGO, Glay** [CU/CU]; Calle 186 #3115, Entre 31 Y 33, Apto 4c, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 12100 (CU). **REYES ACOSTA, Osvaldo** [CU/CU]; Avenida 31 #18207, Entre 182 Y 184, Apto 20, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 12100 (CU). **FERNÁNDEZ MASSÓ, Julio, Raúl** [CU/CU]; Calle 186 # 3115 Apto 8a Entre 31 Y 33, Cubanacán Playa, Ciudad De La Habana

12100 (CU). **GARCÍA DEL BARCO HERRERA, Diana** [CU/CU]; Calle: 37 #3614 Apto13 Entre 42 Y 36, Playa, Cuidad De La Habana 11600 (CU). **BERLANGA ACOSTA, Jorge, Amador** [CU/CU]; Avenida 31 # 18207 Apto 32, Entre 182 Y 184, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 11600 (CU). **MUSACCHIO LASA, Alexis** [CU/CU]; Calle 128, No. 7117 Entre 71 Y 73, Mariel, La Habana 32 100 (CU).

(74) Mandatario: **GONZÁLEZ BLANCO, Sonia**; Departamento de Patentes, Avenida 31 Entre 158 Y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 10 600 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: COMPOUNDS ANALOGOUS TO GROWTH HORMONE PEPTIDE SECRETAGOGUES AND PREPARATIONS CONTAINING THEM

(54) Título: COMPUESTOS ANALOGOS A LOS SECRETAGOGOS PEPTIDICOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO Y PREPARACIONES QUE LOS CONTIENEN

(57) Abstract: Chemical peptide compounds obtained by means of *in silico* molecular modelling whose structure enables them to perform the same functions as growth hormone peptide secretagogues. The invention also comprises the compositions that contain said compounds and use thereof in the preparation of medicinal products, nutritional supplements or other formulations for human or animal use.

(57) Resumen: Compuestos químicos peptídicos obtenidos por modelación molecular *in silico*, y cuya estructura les permite efectuar las mismas funciones que los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento. La invención comprende además las composiciones que contienen dichos compuestos y su uso en la preparación de medicamentos, suplementos nutricionales, u otras formulaciones de uso humano o animal.

WO 2007/098716 A1

COMPUESTOS ANALOGOS A LOS SECRETAGOGOS PEPTIDICOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO Y PREPARACIONES QUE LOS CONTIENEN.

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se encuadra dentro del campo del diseño racional de entidades moleculares biológicamente activas que regulan la actividad metabólica y de citoprotección del organismo. En particular de compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento cuya actividad incluye, aunque no se restringe a: la liberación controlada de hormona de crecimiento, la
- 10 cardioprotección y el aumento de las prestaciones funcionales del sistema cardiovascular, la neuroprotección, y el control y regulación del apetito, la asimilación de grasas y el metabolismo energético.

Estado de la técnica anterior

- 15 Los secretagogos sintéticos de la hormona de crecimiento (en inglés Growth Hormone, abreviado GH) son una familia de ligandos que incluyen moléculas peptídicas y no peptídicas. Las primeras moléculas sintetizadas fueron péptidos diseñados por Bowers y Momany, antes del aislamiento de la Hormona Liberadora de GH (en inglés Growth Hormone Releasing Hormone, abreviado GHRH). Se
- 20 desarrollaron péptidos sintéticos de 6 y 7 residuos de aminoácidos (en inglés Growth Hormone Releasing Peptides, abreviado GHRPs), que resultaron ser potentes liberadores de la GH; estos péptidos fueron descritos sin conocimiento de su función en el organismo, ni la vía por la cual estos actuaban. Estudios de mutaciones y experimentos *in vivo* e *in vitro* demostraron que el arreglo de dos
- 25 aminoácidos L-D y D-L separados por un aminoácido que sirviera de espaciador, sin perder la conformación original, era el considerado óptimo en la actividad liberadora de la GH, y así quedó conformado el péptido (His-D-Trp-Ala-D-Trp-Phe-NH₂) que libera la GH con una concentración de 10-30 ng/mL llegando al conocido como GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) donde el residuo de (Lys) es necesario
- 30 solo para mejorar la actividad *in vivo* puesto que *in vitro* no se ha descrito que cumpla función alguna (Momany F.A., Bowers C.Y., et. al. (1981) Design, synthesis and biological activity of peptides which release growth hormone, *in vitro*. *Endocrinology*, 108:31-39).

Otros péptidos análogos fueron descubiertos, en 1993 Bowers y colaboradores encontraron otros dos péptidos análogos del GHRP-6, el GHRP-2 (D-Ala-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) y el GHRP-1 (Ala-His-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂). Estos tres secretagogos muestran una liberación mayor de GH *in vitro* a partir de hipófisis-hipotálamo incubada que de hipófisis sola, lo que demostró que el impulso hipotalámico era importante en dicha acción, también fue demostrado, incluso en humanos, que la acción sinérgica de los GHRP y los GHRH libera más GH que cada una por separado (Bowers C.Y. (1993) GH-releasing peptides: structure and kinetics. *J Pediatr Endocrinol*, 6(1):21-31).

A partir del péptido conocido como GHRP-2 se diseñaron nuevos péptidos cíclicos, los cuales eran producto del cambio de la D-Ala del N-terminal por un aminoácido cuya cadena lateral queda unida a la de un amino que fue insertado entre la D-Phe y la Lys. Uno de estos péptidos (D-Lys-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Glu-Lys-NH₂) resulto ser 10 veces más activo que GHRP-6 *in vitro* y una eficacia comparable *in vivo* (McDowell R.S., et al. (1995) Growth hormone secretagogues: characterization, efficacy, and minimal bioactive conformation. *PNAS USA*, 92(24):11165-11169). Estos experimentos se complementaron con el estudio de la estructura en solución de los DL peptidos cíclicos y se llegó a la conclusión que la introducción de residuos de aminoácidos D en los compuestos peptídicos era esencialmente necesaria para la conservación de la actividad deseada. Otras investigaciones se dirigieron a encontrar moléculas activas con biodisponibilidad oral y mayores tiempos de vida media y llevaron al descubrimiento de otros GHRPs así como el descubrimiento de las moléculas no peptídicas.

En 1993, es descrito el primer secretagogo de la GH (GHS) no peptídico (Smith R.G., et al. (1993) A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science*, 260:1640-43), y refieren más tarde la síntesis de un GHS no peptídico, MK-0677, aun más potente, MK-0677 tiene una alta biodisponibilidad y puede estimular la secreción de 24-h GH después de una sola administración oral (Patchett A.A., 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 der Ploeg L.H., et al. (1997) Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev*, 18:621-645). Mas recientemente fue diseñado otro GHS peptidomimético (EP1572) con una potente y selectiva actividad de liberación de GH. EP1572 muestra una potencia de unión al receptor de secretagogos de la

hormona de crecimiento (GHS-R) en tejidos animales y humanos similar a la de ghrelina y GHS peptídicos e induce un marcado incremento de GH después de administración subcutánea en ratas neonatales. (Broglia F., Boutignon F., et al. (2002) EP1572: a novel peptide-mimetic GH secretagogue with potent and selective

5 GH-releasing activity in man. *J Endocrinol Invest*, 25:RC26-RC28).

En 1999 fue descubierta la ghrelina, un péptido de 28 aminoácidos producido fundamentalmente por estomago, aunque también se ha encontrado su ARNm en varios tejidos. Es producida en el estomago por las células X/A que representan la mayor población de endocrina en la mucosa oxintica. La ghrelina se encuentra

10 igualmente en el núcleo arcuato del hipotálamo donde su ARN está presente en las neuronas NPY y en las neuronas AGRP, implicadas en el control del apetito y del balance 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.

15 *Nature*, 409:194-198). Su ARN se ha localizado igualmente en el intestino y el páncreas. Circula en sangre, en el hombre adulto, su concentración es de 100-120 fmol/ml, sugiriendo que es segregado por las células del estómago a la circulación y que podría actuar por vía endocrina. Así como que la producción de ghrelina también se ha reportado en tejidos 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).

20

Otros estudios en animales muestran que la secreción de ghrelina es pulsátil y está más asociada al apetito que a los 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).

25

La ghrelina es la primera hormona natural que ha sido identificada con un grupo hidroxilo de una de sus serinas acilado con un ácido octanoico. Esta modificación se ha descrito como esencial para la unión a GHS-R1a, para su capacidad de liberación de GH, y muy probablemente para sus otras acciones endocrinas.

30

La ghrelina no acilada circula en cantidades mayores que la acilada, aunque no se ha descrito para ella una acción directamente endocrina, se postula que puede ejercer algunas acciones no endocrinas incluyendo efectos cardiovasculares, cardioprotectores, antiproliferativos, y citoprotectores en general, probablemente

- mediados por la unión de otros 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 otro ligando endógeno para GHS-R1a que puede ser aislado de la mucosa endocrina del estomago. La des-Gln14-ghrelina es el resultado de un procesamiento alternativo del gen de la ghrelina donde se pierde la Gln14 y al igual que la ghrelina, experimenta el mismo proceso de acilación en la Ser3.
- Estudios realizados con varios análogos de ghrelina con el residuo 3 modificado con
- 15 varios grupos alifáticos o aromáticos y varios péptidos cortos derivados de la ghrelina muestran que los grupos hidrofóbicos unidos a la cadena lateral del residuo 3 son considerados esenciales para su actividad. También se ha observado que pequeños segmentos que contienen los cinco primeros residuos de la ghrelina son capaces de activar al receptor con tanta eficiencia como la ghrelina completa. El
- 20 tetrapéptido formado por los cuatro primeros residuos de la ghrelina resultó menos potente y los fragmentos que no contenían el N-terminal fueron incapaces de activar al receptor (Bednarek M.A., 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) ¹H NMR structural analysis of human ghrelin and its six truncated analogs. *Biopolymers*, 59:489-501). Estos estudios sugieren que la secuencia completa de de la ghrelina no es necesaria para su actividad y que Gly-Ser-Ser(n-octanoil)-Phe constituye el
- 25 fragmento activo requerido para su actividad como agonista de GHS-R1a.
- 30 Antes y después del descubrimiento de la ghrelina se ha desarrollado un gran trabajo para encontrar moléculas pequeñas y sus derivados que puedan como ligandos del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento, existiendo un gran numero de patentes en esta área que describen moléculas de este 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 89/07110; 89/07111; 92/07578; 93/04081; 94/11012; 94/13696; 94/19367; 95/11029; 95/13069; 95/14666; 95/17422; 95/17423; 95/34311; 5 96/02530; 96/15148; 96/22996; 96/22997; 96/24580; 96/24587; 96/32943; 96/33189; 96/35713; 96/38471; 97/00894; 97/06803; 97/07117; 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; 10 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)
- 15 Luego de esta revisión se han descrito otros compuestos como antagonistas del receptor de secretagogos (US2005288316 y WO2005048916) y otros que se describe que unen también al receptor y que son utilizados con propósitos variados. (WO2005046682; WO2005039625; JP2003335752; US2004009984; US2003130284; WO03004518)
- 20 Más recientemente se ha incorporado una nueva serie de compuestos macrocíclicos a este conjunto con el propósito fundamental de ser agonistas del receptor sin activar la liberación de GH (US2006025566)
- El GHS-R es un receptor asociado a proteína G de clase A y es expresado por un solo gen que en humanos tiene la localización cromosómica 3q26.2. Se han 25 identificado dos tipos de cDNA que son el resultado de un procesamiento alternativo del 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 30 hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol*, 11:415-423; US 6,242,199; WO 97/21730). El cDNA 1a codifica un receptor de 366 aminoácidos con siete segmentos transmembranarios (GHS-R1a). El cDNA 1b codifica una proteína más corta (GHS-R1b) que tiene 289 aminoácidos y cinco segmentos transmembranarios. Aunque no se conoce la importancia de GHS-R1b, se ha

comprobado su expresión en varios tejidos endocrinos y no endocrinos (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).

El GHS-R1a humano tiene un 96 y 93% de identidad con el de rata y puerco, respectivamente, y se ha visto una relación muy estrecha entre la secuencia del GHS-R1a humano y las que han sido identificadas en peces teleósteos. Estas observaciones sugieren que GHS-R1a está altamente conservado entre las especies y probablemente tenga una función biológica esencial. (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).

La unión de ghrelina y GHS sintéticos al GHS-R1a activa la vía de señalización de la fosfolipasa C, provocando un incremento de la concentración de inositol-1,4,5 trisfosfato (IP3), y la activación de la proteína quinasa C (PKC), seguida de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. La activación de GHS-R también inhibe los canales de K^+ , permitiendo la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje tipo L, pero no por canales tipo T. A diferencia de GHS-R1a, GHS-R1b no une ni responde a los GHS y su función está todavía 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*, 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),

Los GHS sintéticos, la ghrelina y su isoforma natural (des-Gln14-ghrelina) se unen con alta afinidad a GHS-R1a, y su eficiencia desplazando a [^{35}S] MK-0677 o [^{125}I] [Tyr^4]ghrelina unidos a la membrana de la hipófisis se correlaciona con la concentración requerida para estimular la liberación de GH (Muccioli G., Papotti M., et al. (2001) Binding of ^{125}I -labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest.* 24:RC7-RC9; Hosoda H.,

Kojima M., et al. (2000) Purification and characterization of rat des-Gln14-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, 275:21995–22000).

Para determinar las características estructurales de la ghrelina necesarias para la unión y activación de GHS-R1a, se realizaron estudios con péptidos cortos de ghrelina en células HEK-293 que expresan GHS-R1a humano, observándose que péptidos de 4 y 5 aminoácidos que contenían el N-terminal de la ghrelina fueron capaces de activar a este receptor. Basados en estos resultados *in vitro* se postula que la secuencia Gly-Ser-Ser(n-octanoil)-Phe es requerida de forma esencial para la

activación del receptor (Van Der Lely A.J., Tschöp M., et al. (2004) Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *Endocrine Reviews*, 25(3):426-457). Los primeros 7 aminoácidos de la ghrelina están conservados entre todas las especies, sin embargo la habilidad de los

derivados de ghrelina de activar GHS-R1a en células transfectadas no parece ser

indicativo de su capacidad de estimular la liberación de GH en células somatotrofas, recientemente se ha demostrado que ghrelina (1-4)octanilada y ghrelina (1-8) octanilada no son capaces de estimular la liberación de GH en ratas, y ninguno de estos péptidos es efectivo desplazando [125 I] [Tyr⁴]ghrelina de sus sitios de unión en preparaciones de membrana de hipófisis o 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). Otro estudio realizado en las mismas células que expresan el GHS-R1a humano o de cerdo se encontró que la adenosina también activa al receptor, pero, similar a los análogos cortos de ghrelina en cultivos de células de hipófisis no pueden estimular la secreción de GH,

sugiriendo que la adenosina es un agonista parcial de GHS-R1a y que se une a un sitio en el receptor distinto del de MK-0677 y 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).

Más recientemente se ha reportado que GHS-R1a también puede unir cortistatina (CST), un neuropéptido homólogo de la somatostatina (SS), el cual por si mismo no puede reconocer a 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).

Más recientemente se ha reportado que GHS-R1a también puede unir cortistatina (CST), un neuropéptido homólogo de la somatostatina (SS), el cual por si mismo no puede reconocer a 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 expresa en las células somatotrofas de la hipófisis y en el núcleo arcuato, zona crucial para las actividades neuroendocrinas y de estimulación del apetito de la ghrelina y 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 Y., et. al. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*, 50:227–232). La ghrelina, así como los GHS sintéticos, estimulan la expresión de algunos marcadores de actividad neuronal (*c-fos* y *EGR-1*) en neuronas del núcleo arcuato y se ha detectado mRNA de GHS-R1a en áreas extrahipotalámicas como el giro dentado de la formación hipocampal, regiones CA2 y CA3 del hipocampo, pars compacta de la sustancia negra, área tegmental ventral, núcleos de Raphe dorsal y medial, núcleo de Edinger-Westphal, puente y bulbo raquídeo, indicando posibles acciones extrahipotalámicas. También se ha demostrado la presencia de su mRNA en varios órganos periféricos entre los cuales se encuentran: estomago e intestino, páncreas, riñón, corazón, aorta, diferentes adenomas humanos y varios neoplasmas endocrinos de pulmón estomago y páncreas (Hewson A.K., Dickson S.L. (2000) Systemic administration of ghrelin induces 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 produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett*, 486:213–216; Nagaya N., Miyatake K., et. al. (2001) Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:5854–5859;; Korbonits 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).

La ghrelina y los GHS tienen una alta afinidad por GHS-R1a. Sin embargo, hay evidencias de que hay sitios de unión adicionales para los GHS. Sitios específicos para Tyr-Ala-hexarelin y otros GHS peptídicos con una densidad de receptores al menos igual a la encontrada en la hipófisis se ha encontrado en el corazón de rata y humano, así como en una gran cantidad de tejidos periféricos no endocrinos como: pulmones, arterias, músculo esquelético, riñón e hígado (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). Estos sitios de unión probablemente no son receptores de ghrelina, porque muestran una baja afinidad por ella, pero si de sus análogos peptídicos. El GHS-R cardiaco tiene una masa molecular mayor (84 kDa) que GHS-R1a y no tiene homología con este. La secuencia aminoacídica predicha para el receptor presente en corazón es similar a la 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). El significado funcional de receptores para GHS peptídicos en tejidos periféricos y algunos descubrimientos en el sistema cardiovascular sugieren que estos sitios de unión median las actividades cardioprotectoras de los GHS peptídicos.

La ghrelina y los secretagogos sintéticos estimulan la liberación de GH por las células somatotrofas *in vitro* probablemente por despolarización de la membrana y por el incremento de la cantidad de GH secretada por célula y también se ha reportado un efecto estimulatorio de los GHS sobre la síntesis 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.Y., Chang D. (1985)

Parallel studies of His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ and human pancreatic growth hormone-releasing factor-44-NH₂ in rat primary pituitary cell monolayer culture. *Endocrinology*, 116:952–957; Bowers C.Y., Sartor A.O., et. al. (1991) On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*, 128:2027–2035; Wu D., Chen C., et al. (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 factor (GRF) receptor antagonist. *J Endocrinol*, 140:R9-R13;).

Desde estudios tempranos se demostró que GHS estimulaba la secreción de GH por un receptor y una vía distinta que la de GHRH: Un antagonista del receptor de GHRH inhibe la secreción de GH provocada por GHRH pero no la liberación de GHRH provocada por la estimulación de secretagogos y un supuesto antagonista de GHS-R no afecta la liberación de GH en respuesta a GHRH, GHRP-6 no compite con GHRH en ensayos de unión al receptor para los sitios de unión de GHRH, hay un efecto aditivo sobre la liberación de GH cuando GHRH y GHS son coadministrados a cultivo de somatotrofos y no hay desensibilización cruzada entre GHRH y GHS en términos de liberación de GH, mientras que sí ocurre desensibilización homóloga. (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 MO, Bourguignon J, Grossman AB (eds). *Frontiers in Paediatric Neuroendocrinology*, 161-167).

La actividad liberadora de GH de los GHS es mayor en preparaciones hipotálamo-hipófisis que en preparaciones de hipófisis de acuerdo con la evidencia de que los efectos estimulatorios sobre la secreción de GH son mayores *in vivo* 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.Y., Sartor A.O., et. al. (1991) On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*, 128:2027–2035; Clark R.G., 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 nivel hipotalámico, la ghrelina y GHS actúan sobre las neuronas secretoras de GHRH y se ha observado una secreción incrementada de GHRH en la circulación portal de la hipófisis después de la administración de GHS en oveja (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 requiere de GHRH para expresar completamente su efecto liberador de GH.

En humanos, la respuesta de GH es inhibida por antagonistas del receptor de GHRH así como por desconexión hipotálamohipofisaria (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 con deficiencia del receptor de GHRH no muestran incremento en la secreción de GH en respuesta a la estimulación con GHS, pero mantienen la capacidad de incrementar la secreción de PRL, ACTH y cortisol después de la estimulación con 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.Y., 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),

En humanos y animales hay evidencias de que GHS y GHRH induce desensibilización homologa, pero no heterologa La desensibilización homologa a la actividad de GHS se ha visto durante infusión de GHRH, pero no por la administracion diaria intermitente oral o nasal del peptido por mas 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 otra parte la administración de GHS por vía parenteral, intranasal u oral realza el pulso espontáneo de GH durante 24 h y aumenta los niveles de IGF-I en adultos jóvenes normales, así como en niños y sujetos mayores (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 a 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).

La ghrelina es capaz de estimular el apetito en las ratas y esta propiedad estaría mediada por la vía de la síntesis de NPY y de AGRP, dos péptidos orexígenos Si se inyecta ghrelina por vía intraventricular, es capaz de anular los efectos anorexígenos de la leptina. Se postula que hay una interacción competitiva entre estos dos péptidos en el control del apetito y de la homeostasis energética. Las concentraciones circulantes de ghrelina en la rata están aumentadas durante el ayuno y disminuyen tras la re-alimentación o tras ingestión de glucosa (Shintani M., Ogawa Y., et al. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 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).

Los GHS también estimulan el apetito y la ganancia de peso. Tratamientos crónicos con GHRP-2 estimulan la acumulación de tejido adiposo en ratones deficientes de NPY y en los controles, paralelamente incrementan la expresión hipotalámica del 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).

La administración de ghrelina en rata provoca aumento del apetito junto con un incremento de peso debido a un incremento significativo en el tejido graso sin

- 5 observarse cambios en la masa magra, tejido óseo o estimulación de crecimiento. El efecto lipogénico de la ghrelina es independiente de la acción de GH porque se encuentra igualmente en la rata genéticamente deficiente de GH. La GH provoca un incremento del gasto energético y causa una disminución en la masa grasa, lo cual permite un balance entre esta y la ghrelina: la ghrelina aumenta la masa grasa del
- 10 organismo, mientras que la GH no permite que disminuya la masa 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 C.J., 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)
- 15 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407:980-913).

En individuos obesos los niveles de ghrelina están disminuidos y no disminuyen después de comer. Esta es una condición reversible, después de la pérdida de peso los niveles plasmáticos medios de ghrelina se incrementan. Los niveles plasmático de ghrelina correlacionan negativamente con el índice de masa corporal, la masa

20 corporal grasa, el tamaño del adipocito y los niveles plasmáticos de insulina, glucosa y 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).

- 25 La insuficiencia de GH en los pacientes obesos han sido reportada como reversible después de una dieta prolongada y una marcada pérdida de peso. El aumento crónico de los niveles de ácidos grasos libres y el hiperinsulinismo asociado con los bajos niveles de ghrelina probablemente tengan un papel importante causando la insuficiencia de GH en la obesidad (Maccario M., Tassone F., Grottoli S., Rossetto
- 30 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 la ghrelina es adipogénica y orexigénica puede ser lógico pensar que cuando consideramos el papel de la ghrelina en el tratamiento de la obesidad su efecto debe ser antagonizado. Sin embargo las consecuencias del antagonismo de

los efectos de la ghrelina también disminuyen la secreción de GH, lo cual esta asociado con un incremento en la masa grasa (Jorgensen J.O., Vahl N., (1996) Influence of growth hormone and androgens on body composition in adults. *Horm Res*, 45:94-98). La administración a largo plazo de agonistas y antagonistas de ghrelina revelaran cual de los dos efectos, adipogénico o somatotrófico, domina y determina la influencia sobre el balance energético.

En el hombre obeso las concentraciones circulantes de ghrelina están disminuidas y negativamente correlacionadas al porcentaje corporal de tejido graso así como a las tasas circulantes de insulina y leptina (Tschöp M., Weyer C., et. al. (2001)

Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 50:707-9).

El eje GH/IGF-I tiene un papel importante durante el desarrollo cardiaco y para el mantenimiento de la estructura y función del corazón y uno de los síntomas de la deficiencia de GH es un deterioro en el funcionamiento cardiovascular, el cual puede ser revertido después de una terapia con GH (Sacca L, Cittadini A, Fazio S (1994) Growth hormone and the heart. *Endocr Rev* 15:555–573; Caidahl K, Eden S, Bengtsson BÅ 1994 Cardiovascular and renal effects of growth hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40:393– 400).

Existen datos experimentales que evidencian una mejora del funcionamiento cardiaco debido a la GH, entre ellos muchos estudios que utilizan un modelo de infarto de miocardio experimental en rata. Un tratamiento con GH después del infarto de miocardio, provoca un incremento del volumen sistólico de eyección, la salida cardiaca y otras variables sistólicas. Además de una pronunciada vasodilatación y una disminución de la resistencia total periférica por GH/IGF-I, probablemente contribuya a mejorar la contractilidad del miocardio (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; 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 otra parte, modelos animales con exceso de GH tienen un cambio hacia una isoforma de miosina con una baja actividad adenosin trifosfatasa, lo cual puede disminuir la demanda energética del proceso de contracción (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).

Hay varios estudios de los efectos cardiacos y periféricos de GH y/o IGF-I, y entre ellos, datos clínicos prometedores apuntando a un futuro papel de GH/IGF-I en la
5 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).

Se ha visto que los GHS sintéticos y la ghrelina tienen propiedades cardioprotectoras en varios estudios *in vivo* y que pueden mejorar variables de la
10 función cardiaca *in vivo*, y su efecto es comparable con el de la GH. Las similitudes en el perfil hemodinámico de hexarelin con el de GH podrían sugerir que la acción de los GHS puede estar mediada por la GH. Sin embargo, estudios recientes soportan una acción directa de estos, GH-independiente, sobre el miocardio. (Locatelli V., Rossoni G., (1999) Growth Hormone independent cardioprotective
15 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).

Se ha demostrado la presencia del mRNA de GHS-R1a en corazón y aorta, y en cultivos de cardiomiocitos se incrementa el mRNA de GHS-R1a después de
20 preincubación con 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.
25 (2004) Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(3): H1063-1069).

Se han identificado sitios de unión específicos para ghrelina en el corazón de rata y arterias humanas, donde la densidad de receptores se encuentra aumentada con la aterosclerosis y se han detectado union especifica de GHS peptídicos marcados
30 radioactivamente en celulas de miocardio de rata y diferentes tejidos cardiovasculares de humano (ventrículo, aurícula, aorta, coronaria, carótida, endocardio y vena cava), en cantidades en ocasiones mayores que las encontradas en la hipófisis. (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).

Aunque, la administración de dosis farmacológicas altas de GHS peptídicos induce una clara pero transiente vasoconstricción en corazón prefundido de rata en ratas jóvenes con deficiencia de GH inducida por inmunización contra GHRH, pretratamiento con hexarelin puede proteger contra el daño al miocardio inducido por isquemia y reperfusión. La actividad protectora fue asociada con la recuperación de la liberación de prostaciclina y una normalización de la actividad vasopresora de la 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 protectant activity against cardiovascular damage in rats with isolated growth hormone deficiency. *Cardiología*, 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: protection by hexarelin. *Eur J Pharmacol*, 334:201-207).

Resultados similares se obtuvieron en ratas envejecidas en las cuales pretratamiento con hexarelin se vio una fuerte protección contra el atontamiento miocárdico. La recuperación completa de la función cardíaca estuvo presente en la reperfusión, y la simultánea reducción de los niveles de creatina quinasa corroborando la integridad de las células de las membranas del miocardio y la preservación del debilitamiento contráctil que sigue a la readmisión de oxígeno. El efecto protector de hexarelin fue también demostrado por el mantenimiento de la producción de 6-ceto-PGF_{1a}, así como la restauración de la *reactividad vascular coronaria* a la 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).

- Estudios realizados en ratas hipofisectomizadas muestran que los efectos cardioprotectores de GHS son independiente de GH y mediados por la activación directa de receptores específicos del miocardio (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).
- 5 Hexarelin incrementa el volumen sistólico de eyección y la salida cardiaca y disminuye la resistencia total periférica en un modelo de rata 4 semanas después de la inducción de infarto de miocardio experimental. Aunque el mecanismo por el cual se produce la actividad inotrópica de los GHS sintéticos aun no está claro, hay evidencias de que aumenta la contractilidad de los músculos papilares por acciones en las células endoteliales y/o en las terminaciones nerviosas (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)
- 15 Se ha visto que la ghrelina no comparte todas las acciones cardiovasculares de los GHS sintéticos. La ghrelina brinda una pobre protección al corazón contra isquemia en ratas sugiriendo que los efectos de GHS sintéticos se deben a la unión y activación de de sitios específicos para los GHS peptídicos los estudios realizados con [125I]Tyr-Ala-hexarelin revelan muchos sitios de unión en el miocardio de rata y en tejidos cardiovasculares en humanos distintos de GHSR-1a, esto sugiere la existencia de otro receptor (Este receptor tiene un peso molecular mayor (84 kDa) que GHS-R1a y no presenta homología con este, y se predice que su secuencia aminoacídica es similar a de CD36, el cual mediara las acciones coronarias de GHS peptídicos (Torsello A., Bresciani E., et al. (2003) Ghrelin plays a minor role in the physiological control 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).
- 20
- 25
- 30

Aunque la ghrelina probablemente sea inactiva a nivel coronario, posee otros efectos cardiovasculares. Se ha visto que la ghrelina tiene un potente efecto vasodilatador en humanos tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta acción de la ghrelina es directamente sobre la musculatura lisa, con una potencia comparable con la de los péptidos natriureticos. En humanos con aterosclerosis se encuentra aumentada la expresión de receptores de ghrelina, lo cual sugiere que esta juega un papel en la compensación del incremento de la vasoconstricción observada en esta condición (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 A.P. (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).

Estudios realizados muestran que hexarelin, ghrelina acilada e incluso ghrelina no acilada pueden provenir la muerte celular, inducida por doxorubicina, en cultivos de cardiomiocitos H9c2 y células endoteliales. Estas moléculas probablemente estimulan vías de señalización intracelulares que involucran procesos de supervivencia en cultivos de cardiomiocitos, incluyendo la fosforilación de proteínas intracelulares y la activación de ERK1/2 y proteína quinasa 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).

Estudios *in vivo* en cardiomiocitos y células endoteliales sugieren que los efectos antiapoptóticos de los GHS están mediados por la activación de las quinasas Akt y ERK y por la inhibición de la activación de caspasa 3 y de la expresión de bax y aumentando la expresión 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). Estos datos favorecen la hipótesis de la existencia de otro subtipo de GHS-R, dado que la ghrelina no acilada no activa a GHS-R1a.

En humanos, la ghrelina y los GHS tienen decididamente actividades cardiovasculares, de hecho, su administración a sujetos normales y a pacientes con

fallo cardíaco crónico disminuyen significativamente la resistencia vascular sistémica y aumentan el índice cardíaco y el volumen sistólico de eyección, esto esta acompañado por una reducción concomitante de la presión arterial media, pero no por ningún cambio en la velocidad del corazón, presión de arteria pulmonar media o presión capilar pulmonar de enclavamiento. (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)

Se ha observado que varios factores tróficos, incluyendo la GH e IGF-I, tienen propiedades neuroprotectoras durante la segunda fase de la isquemia-hipoxica (HI) *in vivo* aunque los mecanismos subyacentes no se conozcan completamente. Sin embargo, se ha demostrado que la activación de la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) con la consecuente fosforilación de Akt quinasa media la supervivencia neuronal inducida por factores de crecimiento *in vitro*. Akt fosforilada promueve la supervivencia celular y puede inhibir apoptosis por inactivación de varios blancos proapoptóticos incluyendo Bad, glicógeno sintetasa quinasa 3 beta (GSK3 β), caspasa 9 o por modificación de factores de transcripción (Kulik G., Klippel A., Weber M.J. (1997). Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol*, 17:1595-1606) Otra vía activada por los factores de crecimiento es la de MAPK p42/44 ERK. La activación de ERK se ha visto que inhibe la apoptosis inducida por hipoxia. Además, la neuroprotección por BDNF en ratas neonatales se ha visto que esta mediada por la activación de la vía, MAPK/ERK y tratamientos con IGF-I a ratas neonatales después de HI activa las vías Akt y EKR (Buckley S., Driscoll B., et al. (1999) ERK activation protects 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 vía the ERK pathway. *J Neurosci*, 20:5775-5781)

En estudios realizados se ha observado que hexarelin (secretagogo peptídico) reduce el daño cerebral en un modelo *in vivo* de HI. Esta protección esta acompañada de la fosforilación de Akt y GSK3 β indicando la posibilidad de que la vía PI3K este involucrada observándose su efecto protector en corteza, hipocampo,

tálamo pero no en el estriato La distribución espacial de la protección correlaciona con la localización del receptor de GH y de GHBP (Brywe K.G., Leverin A.-L., et al. (2005) Ghrowth Hormone Releasing Peptide Hexarelin reduces neonatal brain injury and alters Akt/Glycogen Synthase Kinase-3 β phosphorylation. *Endocrinology*, 146: 4665-4672; Lobie P.E., García-Aragón J., et al. (1993) Localization and ontogeny of growth 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).

Esto sugiere que el efecto protector de hexarelin pudiera estar mediado por la GH o que hexarelin y GH compartan vías comunes para la protección celular, ya que se han encontrado el mRNA de GHS-R en varias estructuras del cerebro. La administración de GHRP-6 a ratas adultas bajo condiciones fisiológicas han mostrado un incremento en los niveles de mRNA de IGF-I en hipotálamo, cerebelo e hipocampo pero no en corteza Aunque este pudiera deberse al aumento de la expresión de IGF-I, pero no se han detectado incrementos significativos del mismo en ratas tratadas con hexarelin 24 horas después de la HI Por otra parte, si IGF-I fuera un importante mediador de los efectos de Hexarelin, se pudiera esperar una reducción del daño cerebral en el estriato, ya que los receptores de IGF-I están presentes este (Frago L.M., Paneda C., 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 activa además la vía PI3K en el CNS después de HI pero no afecta la fosforilación de ERK, mientras que IGF-I se ha demostrado que activa tanto la vía PI3K como la vía ERK.

Se ha visto que Hexarelin aumenta la fosforilación del receptor IGF-I, en ausencia de una obvia inducción de IGF-I, pudiera ser que el aumento de la fosforilación se deba a una transactivación del receptor de IGF-I por Hexarelin o un ligando endógeno. Previamente se ha visto que agonistas de receptores asociados a proteína G como la angiotensina-II, trombina y endotelina pueden estimular la fosforilación del receptor de IGF-I y/o Akt (Sumitomo M., Milowsky M.I., 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).

El efecto neuroprotector de Hexarelin no parece estar mediado primariamente por una inducción del eje GH/IGF-I, aunque una señalización incrementada a través del receptor de IGF-I puede contribuir a la reducción del daño cerebral.

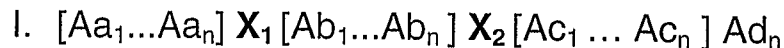
10 Explicación de la invención.

A pesar del abundante trabajo en este campo encontrado en el estado del arte, en el mismo se evidencia que los compuestos mimeticos de la ghrelina y de naturaleza no peptídica no son capaces de todas las funciones posibles a ser atribuidas a la ghrelina en el organismo, siendo preferida la utilización de compuestos con naturaleza peptídica, cuya similitud estructural sea mucho mayor, la descripción de estos analogos peptídicos sin embargo está limitada al uso de aminoácidos no naturales de estereoquímica D, como parte de las composiciones.

Teniendo en cuenta la importancia de los secretagogos peptídicos en las funciones anteriormente descritas y la capacidad de los mismos para las funciones endocrinas y no endocrinas en una variedad grande de organismos, sistemas y células, la presente invención describe, en efecto por primera vez moléculas químicas de naturaleza peptídica, con ciclos internos y compuestas solamente de aminoácidos con estereoquímica L en el carbono quiral, que son capaces de realizar, debido a su estructura química, funciones similares a las atribuidas a la ghrelina, des-acil ghrelina, y otros GHS peptídicos, que incluye pero no esta restringido a la capacidad de liberación de GH, la Cardioprotección y en general el mejoramiento de las funciones del músculo cardiaco y el sistema reticuloendotelial, la neuroprotección que no solo incluye el cerebro y cerebelo sino todas las células del sistema nervioso, y el control y regulación del apetito, incluyendo la regulación del metabolismo de las grasas y la energía.

Los compuestos químicos peptídicos de la invención tienen una estructura que les permite cumplir con los requerimientos para unirse a los receptores específicos de la ghrelina y al mismo tiempo a los receptores descritos para la unión de otros secretagogos que realizan las otras funciones descritas.

En una realización particular, la invención se refiere a moléculas químicas las cuales presentan la estructura química siguiente:



- Donde **Aa** son L-aminoácidos seleccionados del conjunto de [Cys, Gly, Ser, His, Ala, Leu, Met o Thr], variando en combinaciones desde 1 hasta 4 residuos, **Ab** son L-aminoácidos, seleccionados del conjunto de [Pro, Ile, Ala, Phe, Trp, Lys, Asp, Asn, Glu, Gln, Gly, Leu, Met, Tyr o Thr], variando en combinaciones de 1 hasta 4 residuos, **Ac** son L-aminoácidos seleccionados del conjunto [Arg, Leu, Pro, Val, Thr, Glu, His, Gln, Asn, Asp, Trp, Tyr, Phe, Ser, Ala, Gly o Ile], variando en combinaciones de 1 hasta 5 y **Ad** son L-aminoácidos, naturales o no, sin limite de numero, **X₁** y **X₂** son L-aminoácidos, naturales o no, con las cadenas laterales enlazadas covalentemente formando un ciclo interno, utilizando cualquier reaccion quimica para la union de forma directa o utilizando un compuesto de enlazamiento como puente.
- Compuestos pertenecientes a estas clases estructurales se muestran a continuación:

	A221	GSKFD <u>S</u> PEHQ	(SEC. ID NO: 1)
	A222	HGSKFD <u>L</u> EFG	(SEC. ID NO: 2)
	A223	HCKFD <u>L</u> DWH	(SEC. ID NO: 3)
20	A224	SSDFKLYWG	(SEC. ID NO: 4)
	A225	ALDFKPNIP	(SEC. ID NO: 5)
	A226	STDFKPF <u>A</u> I	(SEC. ID NO: 6)
	A227	HSKGYD <u>L</u> DH	(SEC. ID NO: 7)
	A228	GKFGD <u>L</u> SPEHQ	(SEC. ID NO: 8)
25	A229	HAKPGGID <u>P</u> EQ	(SEC. ID NO: 9)
	A230	GKFD <u>S</u> PEHQ	(SEC. ID NO: 10)
	A231	GGGKFW <u>D</u> IPHH	(SEC. ID NO: 11)
	A232	HKGID <u>S</u> PEQH	(SEC. ID NO: 12)
	A233	GKFD <u>L</u> SPEHQ	(SEC. ID NO: 13)
30	A234	GDAGAKLLSSR	(SEC. ID NO: 14)
	A235	GMEAGIK <u>L</u> CHRQ	(SEC. ID NO: 15)
	A236	GEGYK <u>L</u> DERSQ	(SEC. ID NO: 16)
	A237	GGEAGK <u>L</u> CPPRY	(SEC. ID NO: 17)

A238

GLEFKLLHQ

(SEC. ID NO: 18)

Donde los aminoácidos subrayados estan enlazados por sus cadenas laterales.

Estas moléculas fueron descritas para esta función mediante el modelado molecular exhaustivo del receptor de la ghrelina humana utilizando técnicas combinadas de modelación por homología, dinámica molecular y búsquedas exhaustivas en el espacio conformacional. Una vez modelado el receptor se construyeron modelos de unión basados en la también modelación exhaustiva de la ghrelina y otros secretagogos, a partir del modelo de las interacciones se construyo una biblioteca virtual con varios miles de estructuras de peptidos que cumplieran con estas características para realizar un análisis conformacional, y se realizo un acoplamiento molecular masivo en el modelo del receptor. Partiendo de este análisis, se propuso una serie de compuestos para varias familias estructurales que se sintetizaron químicamente y probaron con varios sistemas in vivo e in vitro. Luego de los ensayos biológicos se reoptimizaron los compuestos y se generaron nuevas bibliotecas virtuales sobre las cuales se repitió el análisis para buscar una mayor acción sobre el sistema biológico mediante regularidades estructurales mas específicas.

La invención también incluye cualquier variante homóloga de los compuestos anteriores. Se entiende por "variante homóloga" a cualquier molécula de naturaleza química similar en un 70% o más a la secuencia de aminoácidos a los aquí descritos (en la página 23), incluyendo aminoácidos no naturales, cuya estructura permita realizar el mismo efecto de los compuestos aquí descritos.

En otra realización preferida de la invención, la composición farmacéutica contiene uno o más de los compuestos químicos o sus sales aceptables, así como excipientes o vehículos aceptables según el propósito que se aplique. También es parte de la presente invención el uso de los compuestos, para la manufactura de medicamentos, suplementos nutricionales, u otras formulaciones de uso humano, veterinario, en acuicultura, u otras actividades de cría o mejoramiento de animales, in vitro, in vivo o en dispositivos asociados al cuerpo o de dosificación controlada al medio, que se asocien a su acción similar a otros GHS, directamente o no vinculadas a su acción endocrina.

Las moléculas químicas descritas se definieron por su capacidad de interactuar con el receptor de la ghrelina humana, pero no se descartan otras proteínas, que no poseen una secuencia de aminoácidos o estructura similar pero que unen este tipo

de compuestos y afectan de algún modo su acción biológica ya sea por activación, por potenciación, por represión, por competencia o sinergismo con otros sustratos o por algún otro mecanismo descrito o aun no descrito, pero evidenciado experimentalmente.

5 Para la definición de los compuestos químicos descritos en la invención se realizó el modelado molecular exhaustivo del receptor de la ghrelina humana utilizando técnicas combinadas de modelación por homóloga, dinámica molecular y búsquedas exhaustivas en el espacio conformacional. Una vez modelado el receptor se construyeron modelos de unión basados en la también modelación exhaustiva de
10 la ghrelina y otros secretagogos, a partir del modelo de las interacciones se construyó una biblioteca virtual con varios miles de estructuras de péptidos que cumplieran con estas características para realizar un análisis conformacional, y se realizó un acoplamiento molecular masivo en el modelo del receptor.

Partiendo de este análisis, se propuso una serie de compuestos para varias familias
15 estructurales que se sintetizaron químicamente y probaron con varios sistemas *in vivo* e *in vitro*. Luego de los ensayos biológicos preliminares, se reoptimizaron los compuestos y se generaron nuevas bibliotecas virtuales sobre las cuales se repitió el análisis aplicándoles una segunda ronda de acoplamiento con valores más restrictivos de y fueron analizados de nuevo para extraer las regularidades
20 estructurales, la estructura química de los compuestos seleccionados en el segundo ciclo fue optimizada para obtener valores mayores de energía de unión calculada, entre -58 y -32 KJ/mol y para buscar una mayor acción sobre el sistema biológico mediante regularidades estructurales mas específicas. Una selección representativa de 18 de estos compuestos, con energías de unión superiores a -40 KJ/mol, fueron
25 sintetizados, purificados utilizando Cromatografía Líquida, luego analizados por Espectrometría de Masas y finalmente evaluados en cuanto a su efectividad *in vitro* e *in vivo*.

Descripción de las figuras

Figura 1: Efecto del tratamiento con los compuestos A221(a), A228(b) y A233(c) en
30 la prevención del fallo miocárdico inducido por Doxorrubicina (Dx).

Figura 2: Efecto protector del compuesto A221(a), A228(b) y A233(c) en ratas tratadas con Dx ante estrés forzado.

Figura 3: Efecto del tratamiento con los compuestos A221(a), A228(b) y A233(c) en el tiempo y reversión de la Cardiomiopatía Dilatada inducida por Doxorubicina en los grupos tratados con dosis entre 500 $\mu\text{g/kg}$ y 100 $\mu\text{g/kg}$.

Figura 4: Efecto del tratamiento con el compuesto A221(a), A228(b) y A233(c) en la 5 sobrevivencia de los animales con Cardiomiopatía Dilatada inducida por Doxorubicina (Dx).

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos

La presente invención se explica a través de los siguientes ejemplos de realización:

10 **Ejemplo 1: Selección de los compuestos mediante modelación molecular *in silico*.**

Los compuestos resultados del segundo ciclo de evaluación computacional fueron optimizados obteniéndose valores superiores de energías de unión y regularidades 15 estructurales más específicas en su unión al receptor. De ellos se seleccionaron 18 compuestos representativos con energías predichas mayores de -40 KJ/mol las cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Energía calculada de la interacción con el modelo del Receptor de Secretagogos de la Hormona de Crecimiento, después del acoplamiento molecular.

Compuesto	Energía (KJ/mol)	Compuesto	Energía(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

Ejemplo 2: Prevención de la muerte de las células PC12 por privación de NGF.

Las células PC12 se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 cm² en DMEM conteniendo 5% suero fetal bovino y 10% de suero equino, en presencia de gentamicina 50 µg/ml. Las células fueron incubadas en 5% CO₂ a 37°C. Para inducir la diferenciación las células fueron sembradas a una densidad de 1X10⁴ células en placas de 96 pozos recubiertas con polilisina en medio DMEM suplementado con NGF por 7 días, con cambio de medio cada 2-3 días. Después de la diferenciación las células fueron incubadas con los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento, a diferentes concentraciones por 72 horas. La viabilidad celular fue determinada utilizando el ensayo de proliferación citotoxicidad Cell Titer 96 no-radioactivo (Promega), que se basa en la conversión de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT) en un producto que se detecta espectrofotométricamente. Después de la privación del NGF y el suero, el medio es aspirado y se adicionan 15 µl del colorante disuelto en DMEM. Después de 4 hr de incubación a 37°C, 100 µl de la solución de parada es adicionada y la absorbancia del producto solubilizado es medido a 570 nm.

Los compuestos producen un efecto de neuroprotección dependiente de la concentración. En la tabla 2 se representa la IC₅₀ de cada uno de los péptidos.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de cada compuesto durante los experimentos de protección de la muerte neuronal inducida por privación de NGF.

Compuesto	IC ₅₀ uM	Compuesto	IC ₅₀ uM
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

Ejemplo 3: Prevención del daño neuronal inducido por la adición de Peróxido de Hidrógeno en un cultivo primario de neuronas.

Cultivos primarios de células granulares del cerebelo fueron obtenidos a partir de los cerebelos de ratas Wistar de 7-9 días. Posterior a una disección rápida los cerebelos se sumergieron en una solución fría de medio y las meninges fueron eliminadas de la superficie del cerebelo. Cada cerebelo se colocó en una solución de 2-3 ml de medio fresco y cortado finamente. Las células fueron disociadas por trituración utilizando una pipeta Pasteur. Las células disociadas se filtraron por una membrana de nylon de 40 μ M (Falcon, Franklin Lakes, N.J.). El número de células viables fue determinado en un hematocitómetro por conteo de células que excluyen el colorante vital tripan azul. Las células se sembraron en placas de 96 pozos recubiertas con polilisina a una densidad de 6250 células en un volumen final de 200 μ l. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora de CO₂ a 5% y 37°C. Después de 24 horas de cultivo, se añadió 10 μ M de citosina arabinofuranosa (AraC; Sigma) para inhibir la proliferación de las células no neuronales.

La capacidad de prevenir el daño neuronal inducido por la adición al medio de cultivo de 500 μ M de peróxido de hidrógeno en concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento, fue evaluado a las 24 horas utilizando el ensayo de proliferación/citotoxicidad Cell Titer 96 no-radioactivo (Promega).

Los compuestos producen un efecto de neuroprotección dependiente de la concentración. En la tabla 3 se representa la IC₅₀ de cada uno de los péptidos.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de cada compuesto durante los experimentos de prevención del daño neuronal inducido por adición de Peróxido de Hidrógeno al cultivo primario de neuronas.

Compuesto	IC ₅₀ μ M	Compuesto	IC ₅₀ μ M
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

Ejemplo 4: Demostración de la actividad biológica de los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento, en peces.

- 5 Se determinaron los niveles de ARN mensajero del IGF-I en hígado de tilapias inyectadas intraperitonealmente, así como se monitoreo los niveles de GH en los mismos animales en el tiempo, demostrándose que los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento eran capaces de estimular, en peces, la presencia de GH circulante en sangre y como respuesta a esta de incrementar los niveles del ARN mensajero del IGF-I después de la inyección de los compuestos, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Niveles de ARN mensajero de IGF1 normalizados contra un grupo control donde se utiliza un peptido sintetico no relacionado.

Compuesto	IGF1	Compuesto	IGF1
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

- 15 **Ejemplo 5: Experimento de crecimiento en tilapias juveniles tratadas con compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento:**

5.1 Aceleración del crecimiento en tilapias tratadas con compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento por vía intraperitoneal (ip)

Los compuestos fueron diluidos en solución tampón de fosfato de sodio (PBS) e inyectados dos veces a la semana durante tres semanas a 0.1 µg/g de peso húmedo de cada pez (gbw). Los compuestos fueron aplicados de forma individual a un grupo de 10 tilapias machos con peso promedio de 60.41 ± 10.36 g y se utilizó un grupo control de 10 tilapias machos con peso promedio de 60.58 ± 19.67 g el cual recibió PBS. Se midió el peso promedio cada semana. Todos los animales del experimento fueron marcados con microchips (Stoelting Co. Wood Dale, E.U.). Obteniéndose un incremento de peso, cuyo máximo fue de un 165% en los peces inyectados con respecto a los que recibieron PBS como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Incremento de peso en % para los animales tratados tomando 100% como el crecimiento del grupo control.

Compuesto	Inc. de peso (%)	Compuesto	Inc. de Peso (%)
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

En este mismo experimento se estudió la presencia de Trichodinicos y helmintos monogeneos en los animales utilizados en el ensayo, para observar y comparar la intensidad y la extensión de la invasión de estos agentes patógenos en los grupos tratados, cuyo examen comparado con los controles que exhibieron seis cruces como promedio, se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Intensidad de la infección con patógenos (Trichodinicos y helmintos) vista en animales tratados con los compuestos ensayados.

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

5.2 Estimulación del crecimiento en larvas de tilapias (*Oreochromis sp*) mediante los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento, vía inmersión

Se realizó la evaluación del crecimiento en larvas de tilapia *Oreochromis sp.*, 100 larvas por grupo, de 0.01g utilizando los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento, en dosis de 100 µg/L de agua, dos veces por semana de una hora de duración, al cabo de tres semanas se logró una estimulación del crecimiento de 155 % en el peso promedio de los animales tratados con respecto a los tratados con PBS como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Incremento de peso en % para los animales tratados tomando 100% como el crecimiento del grupo control.

Compuesto	Inc. de peso (%)	Compuesto	Inc. de Peso (%)
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

En este experimento se midieron también los niveles de lisozima y se obtuvo un incremento de la presencia de este marcador de la inmunidad en los animales tratados, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Niveles de Lisozima en los animales tratados con relacion al grupo control.

Compuesto	Lisozima	Compuesto	Lisozima
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

Ejemplo 6: Experimento de crecimiento en camarones v *Litopenaeus vanamei* por baños de inmersión con los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento.

- 10 Se tomaron grupos de larvas de camarones, se les aplicaron cuatro baños de inmersión, uno cada tres días de una hora de duración con diferentes concentraciones de los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento. Las concentración utilizada fue 0.1 mg/L, al grupo control se le dio la misma frecuencia de baños de inmersión con BSA a 1 mg/L.
- 15 Como resultado se observó que el grupo tratado mejoraba la calidad de las larvas de los camarones *Litopenaeus vanamei*. Esto estaba evidenciado en un incremento en peso del 120-150%, de un 10-25% de incremento en la talla, como se muestra en la tabla 9, exhibiendo ademas un mayor número de pares de ramificaciones branquiales y modificaciones rostrales. Además se encontró que de manera general
- 20 los animales tratados presentaban menor contenido de agua en el músculo y mayores valores de las relaciones RNA/DNA, Proteína/DNA, evidenciando la activación del metabolismo del músculo de estas larvas

Tabla 9. Incremento de peso y talla en % para los animales tratados tomando 100% como los valores del grupo control del grupo control

Compuesto	Inc. de peso (%)/ Inc. de talla (%)	Compuesto	Inc. de Peso (%)/ Inc. de talla (%)
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

El experimento anterior fue corroborado en condiciones de producción para los compuestos A221, A228 y A233, con un aumento de la sobrevivencia del 20% en los animales tratados comparado con sus hermanos controles, además manteniéndose una estimulación promedio del 110% en el peso y de un 30% en la talla, mostrando los animales tratados mayor homogeneidad en la talla que sus hermanos no tratados reflejándose en que el coeficiente de variación de solo 30% y 8% en el peso y la talla respectivamente en animales tratados con el péptido a diferencia del 77% y 30% que se observa en el peso y la talla en los animales hermanos.

Ejemplo 7: Estimulación del crecimiento en camarones mediante la inclusión en la dieta de los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento.

Los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento, fueron incluidos en una dieta para postlarvas de crustáceos al 1%. Posteriormente se alimentaron postlarvas de *Litopenaeus vanamei* con la dieta mencionada, así como un control con BSA incluido en el pienso. El efecto fue estimado midiendo la longitud del carapacho de las larvas y postlarvas con un micrómetro óptico y pesadas en una pesa de 0.1 mg de error.

Los compuestos incluidos en la dieta incrementaron el crecimiento de los camarones entre un 30 - 40% respecto al control, como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Incremento de talla en % para los animales tratados tomando 100% como el crecimiento del grupo control.

Compuesto	Inc. de talla (%)	Compuesto	Inc. de talla (%)
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: Encapsulación en *Artemia salina*

- 5 Los compuestos análogos a los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento, fueron bioencapsulados en *Artemia* con las que fueron alimentadas las postlarvas de *Litopenaeus vanamei*. Para bioencapsular cada uno en la *Artemia salina*, se le adicionó a una concentración de 10 mg/L durante 1 hora y se cosecharon y lavaron. Posteriormente se alimentaron las postlarvas de *Litopenaeus*
- 10 *vanamei* con esta *Artemia* cuatro veces al día durante un mes de experimentación. El grupo control fue alimentado con *Artemia salina* con BSA bioencapsulada. El efecto de los compuestos fue estimado midiendo la longitud del carapacho de las larvas y postlarvas con un micrometro óptico y pesadas en una pesa de 0.01 mg de error.
- 15 Los compuestos bioencapsulados en *Artemia salina* incrementaron el crecimiento de los individuos entre un 30% y un 40% respecto al control. Con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Incremento de talla en % para los animales tratados tomando 100% como el crecimiento del grupo control.

Compuesto	Inc. de talla (%)	Compuesto	Inc. de talla (%)
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

Ejemplo 8: Efecto cardioprotector de los compuestos análogos de los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento en ratas.

Para reproducir la fisiopatogenia de la Cardiomiopatía Dilatada (CMD) ratas Wistar hembras de 160 g fueron tratadas con Doxorubicina (Dx) a 2mg/kg durante 8 semanas. Un grupo de estas ratas fue tratada concomitantemente con los compuestos A221, A228 y A233 a 500µg/Kg que se administraron diariamente por vía intraperitoneal durante las 8 semanas del tratamiento con Dx. El otro grupo de los animales tratados con Dx recibió solución salina a modo de placebo. Como control sano de este experimento se utilizó un grupo de ratas Wistar de la misma edad sin tratar con Dx.

Al finalizar el periodo de tratamiento se les realizó un ecocardiograma a todas las ratas, para comprobar el estado funcional del ventrículo en términos de fracción de eyección ventricular (FEV).

Como se puede apreciar en la Fig. 1, las ratas que reciben el tratamiento concomitante Dx-compuesto A221(1a), A228(1b) y A233(1c) apenas modifican la FEV ($p > 0.05$) respecto al control etareo sano, en cambio el grupo que recibe solución salina a modo de placebo sufre una caída de la FEV alrededor de un 40% ($p < 0.01$), respecto al control sano.

Para demostrar desde el punto de vista funcional lo que implica la caída de la FEV, a los efectos de la CMD y de la repercusión que tiene esto en la respuesta ante el estrés, las ratas fueron sometidas a natación forzada durante 30 minutos en agua a 4°C. Como se aprecia en la Fig.2, los animales que recibieron el tratamiento concomitante Dx-compuesto A221(2a), A228(2b) y A233(2c) tienen una sobrevida de un 100% y de los del grupo Dx-solución salina solo sobrevive el 45 % ($p = 0.0043$). Estos resultados sugieren que la protección conferida por los compuestos A221,

A228 y A233, no solo garantiza el mantenimiento de la FEV sino que además en condiciones de estrés forzado el miocardio resiste sin claudicación.

Ejemplo 9: Efecto cardioprotector y de reversión de la CMD de los compuestos análogos de los secretagogos peptídicos de la hormona de crecimiento en ratas.

Para demostrar si existe una efecto dosis-respuesta y de reversión de la CMD se realizó un experimento de inducción de CMD en ratas Wistar, con Dx a 2mg/kg durante 8 semanas. Posteriormente se les realiza ecocardiograma y se seleccionan todas las ratas en las que la FEV había caído por debajo del 40%. Estas ratas se dividieron en grupos (n=8) y se comenzaron a tratar con diferentes dosis de los compuestos A221, A228 y A233:

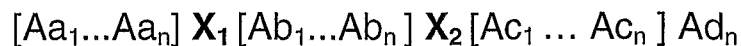
- 500 µg/kg,
- 250 µg/kg,
- 100 µg/kg,
- 50 µg/kg,
- 25 µg/kg,
- 10 µg/kg
- Solución Salina.

Quedando definido los grupos en base a la dosis del Péptido A221 con que fueron tratados.

Como se aprecia en la Fig. 3, dos semanas de tratamiento con el Efecto cardioprotector de los compuestos A221(3a), A228(3b) y A233(3c) revierte la CMD parcialmente en el rango de dosis comprendido entre 500 µg/kg y 50 µg/kg, pero a las 4 semanas de tratamiento la reversión de la CMD es total solo en los grupos que reciben los compuestos A221, A228 y A233 en el rango comprendido entre 500 µg/kg y 100 µg/kg. La dosis de 50 µg/kg si bien no es efectiva en la recuperación total de la FEV, es medianamente efectiva en reducir la mortalidad de los animales tratados respecto al placebo y a los grupos tratados con dosis inferiores, estos animales no recuperan la FEV e incluso tienen una menor sobrevida días después de finalizado el tratamiento (Fig. 4, a A221, b A228 y c A233).

REIVINDICACIONES

- 1) Compuestos químicos de naturaleza peptídica, con ciclos internos y compuestas de aminoácidos con estereoquímica L, y sus variantes homólogas, que son capaces de realizar funciones similares a las atribuidas a la ghrelina, des-acil ghrelina, y otros Secretagogos de la Hormona de crecimiento peptídicos, que se caracterizan por tener una estructura química definida por la secuencia aminoacídica siguiente que incluye una ciclación por sus cadenas laterales o empleando cualquier agente químico, y que son seleccionados cumpliendo con las siguientes regularidades estructurales



Donde **Aa** son L-aminoácidos seleccionados del conjunto de [Cys, Gly, Ser, His, Ala, Leu, Met o Thr], variando en combinaciones desde 1 hasta 4 residuos, **Ab** son L-aminoácidos, seleccionados del conjunto de [Pro, Ile, Ala, Phe, Trp, Lys, Asp, Asn, Glu, Gln, Gly, Leu, Met, Tyr o Thr], variando en combinaciones de 1 hasta 4 residuos, **Ac** son L-aminoácidos seleccionados del conjunto [Arg, Leu, Pro, Val, Thr, Glu, His, Gln, Asn, Asp, Trp, Tyr, Phe, Ser, Ala, Gly o Ile], variando en combinaciones de 1 hasta 5 y **Ad** son L-aminoácidos, naturales o no, sin límite de numero, **X₁** y **X₂** son L-aminoácidos, naturales o no, con las cadenas laterales enlazadas covalentemente formando un ciclo interno, utilizando cualquier reacción química para la unión de forma directa o utilizando un compuesto de enlazamiento como puente.

- 2) Composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos químicos de la reivindicación 1, o sus sales; y excipientes o vehículos farmacológicamente aceptables.
- 3) Composición farmacéutica, de acuerdo a la reivindicación 2, caracterizada porque los compuestos químicos de naturaleza peptídica se encuentran en un rango entre 2 y 100 µg/ml cuando se prepara en forma de solución o como sal liofilizada.
- 4) Composición veterinaria, para la acuicultura u otras actividades de cría o mejoramiento de animales, que comprende uno o más compuestos químicos de

la reivindicación 1, o sus sales; y excipientes o vehículos aceptables para uso veterinario.

- 5) Composición veterinaria, de acuerdo a la reivindicación 4, caracterizada porque se administra como pienso, suplemento nutricional, inyecciones periódicas o
5 baños de inmersión, para la estimulación del crecimiento y el aumento de la resistencia a enfermedades en peces y crustáceos.
- 6) Método para inducir la liberación de hormona de crecimiento en un paciente que lo requiere, caracterizado por la administración de uno o más compuestos químicos de la reivindicación 1, o sus sales.
- 10 7) Método para inducir cardioprotección, neuroprotección, control y regulación del apetito, incluyendo la regulación del metabolismo de las grasas y la energía en un paciente que lo requiere, caracterizado por la administración de uno o más compuestos químicos de la reivindicación 1, o sus sales.
- 8) Método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en
15 organismos acuáticos, caracterizado porque se emplea uno o más compuestos químicos de la reivindicación 1, o sus sales.
- 9) Método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos, de acuerdo a la reivindicación 8, que se caracteriza porque los compuestos químicos de naturaleza peptídica se encuentran en el
20 rango de 0,01-1% si se administran como pienso para la alimentación; en el rango de 0,05 – 10 µg de compuesto por gramo de peso húmedo del animal si se administran como inyecciones periódicas; o en el rango entre 10 – 500 µg de compuesto por litro si se administran por baños de inmersión.

Figura 1a

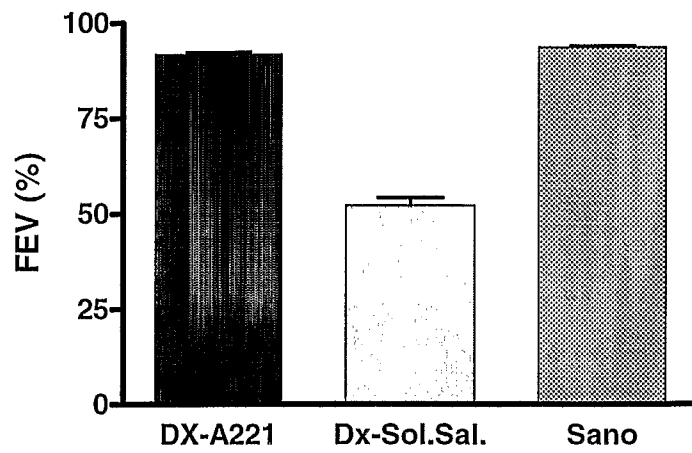


Figura 1b

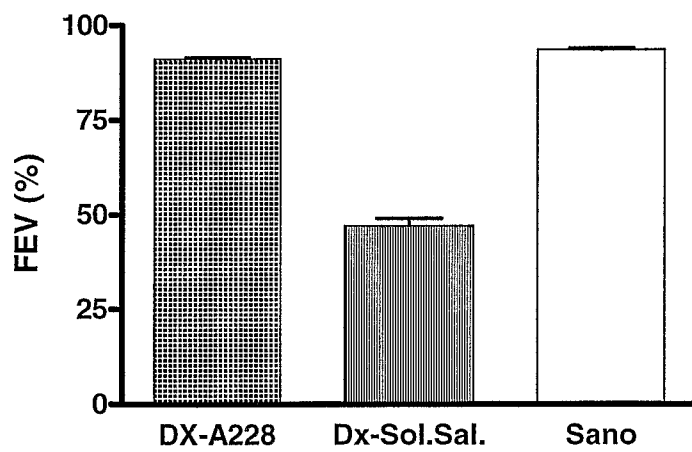


Figura 1c

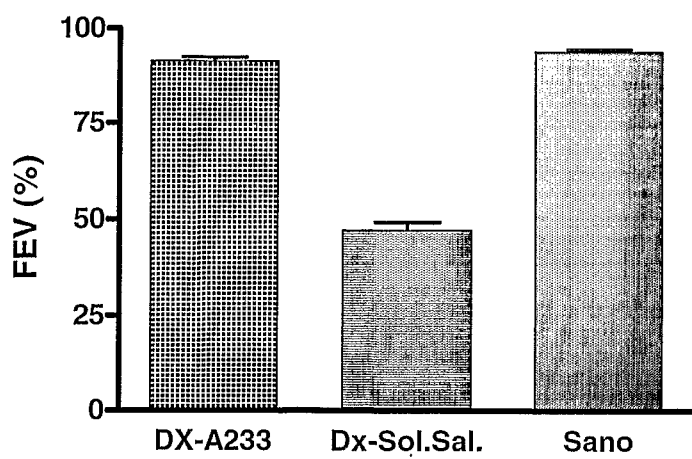


Figura 2a

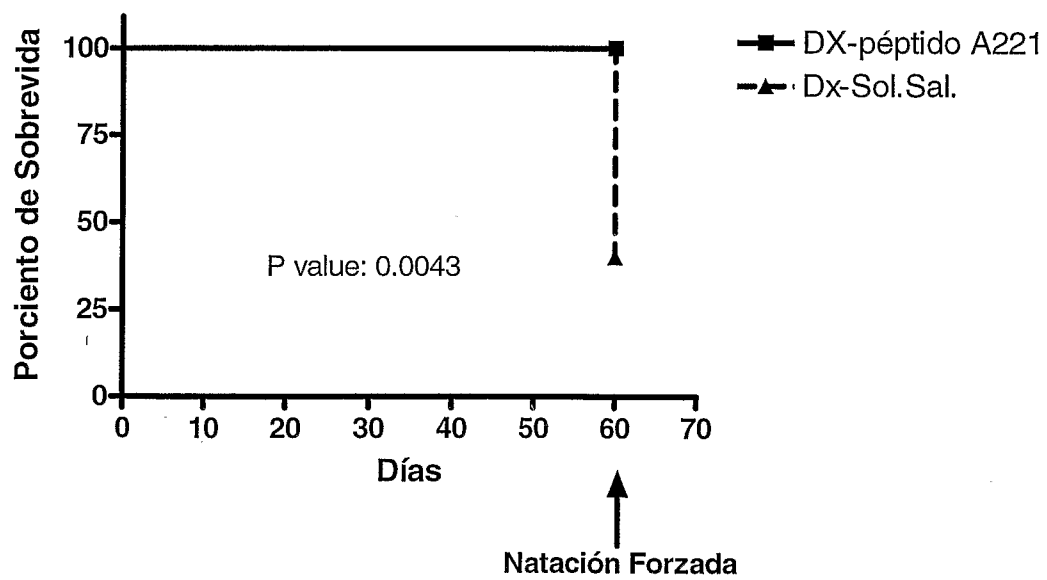


Figura 2b

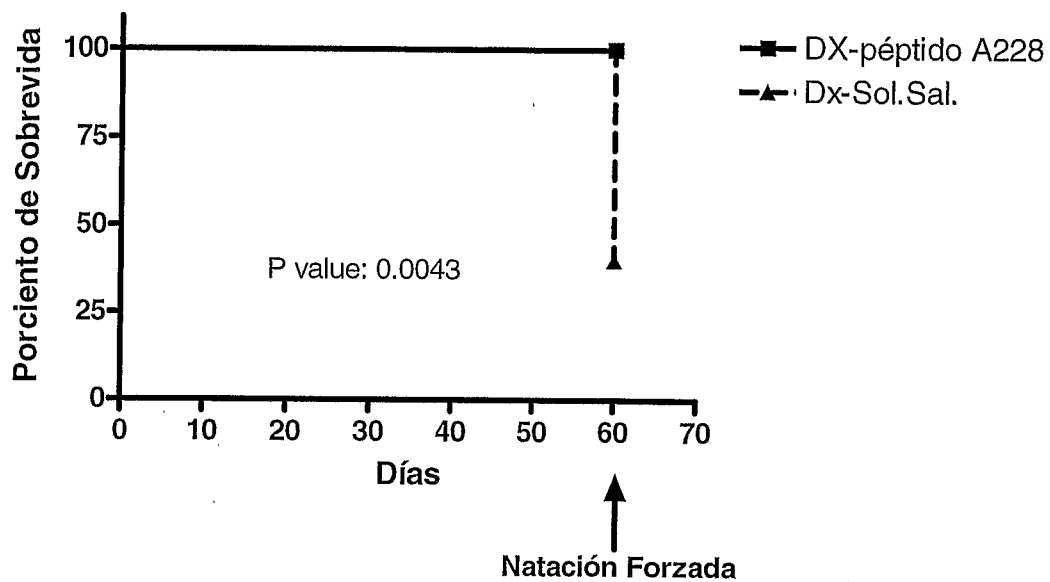


Figura 2c

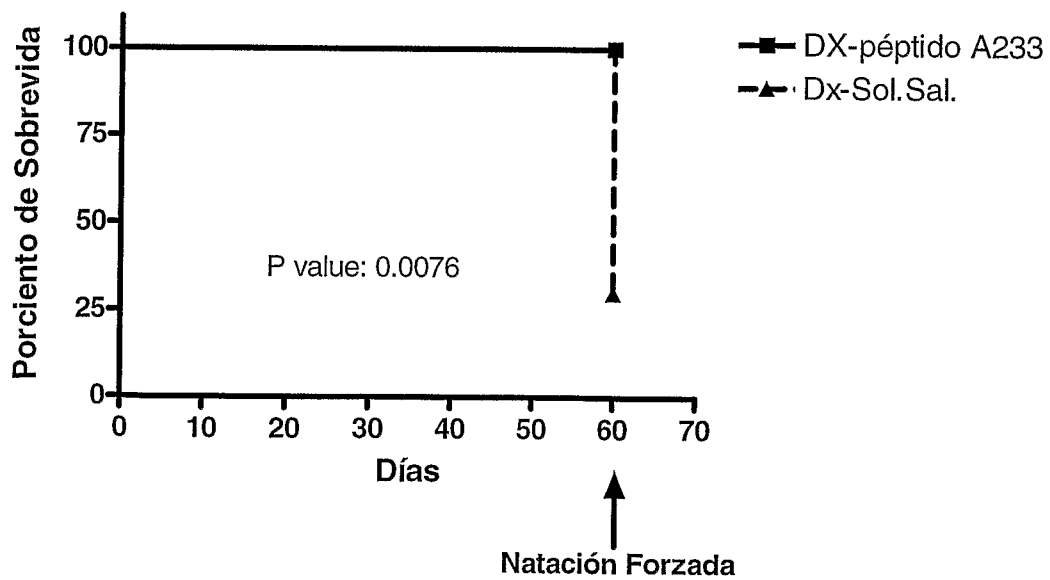


Figura 3a

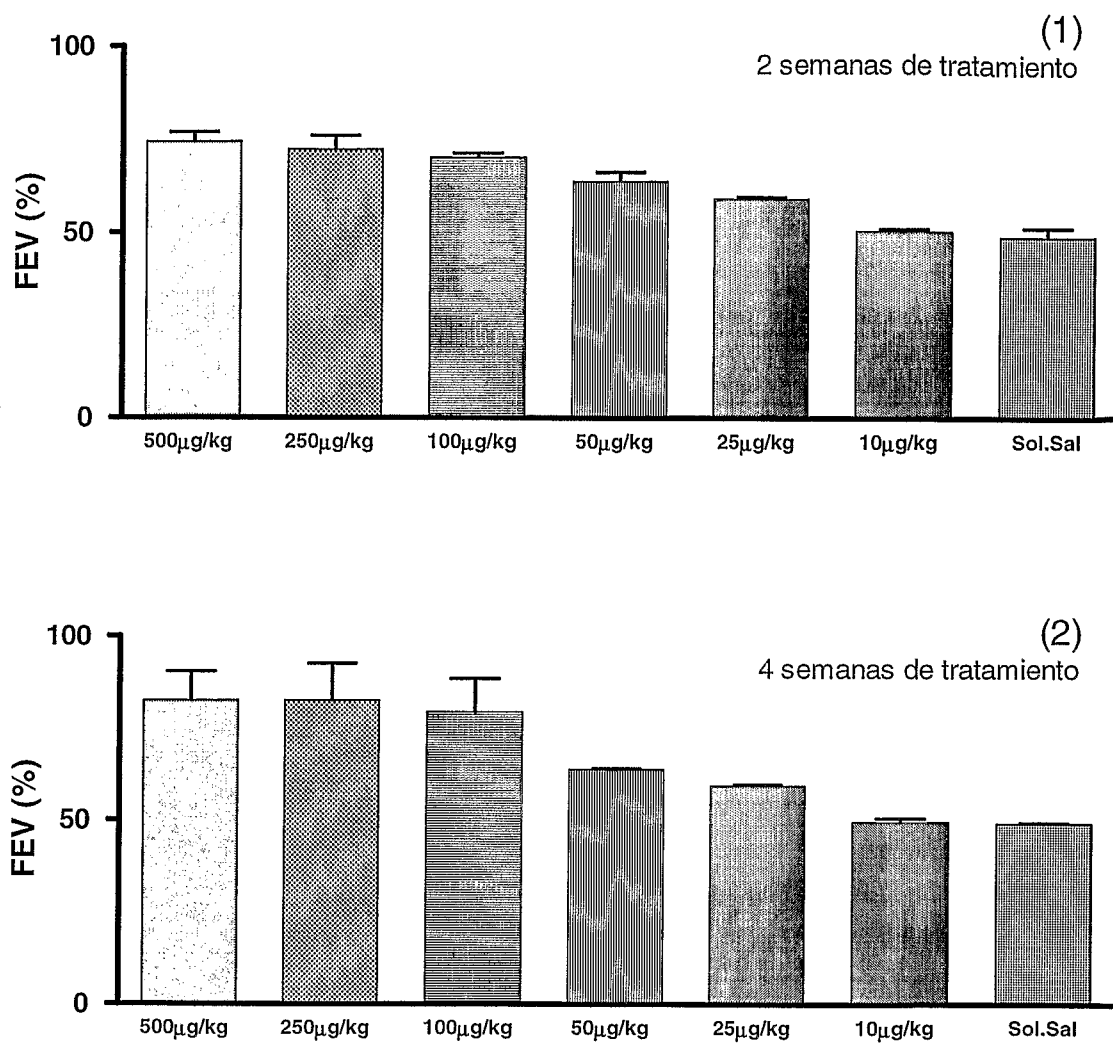


Figura 3b

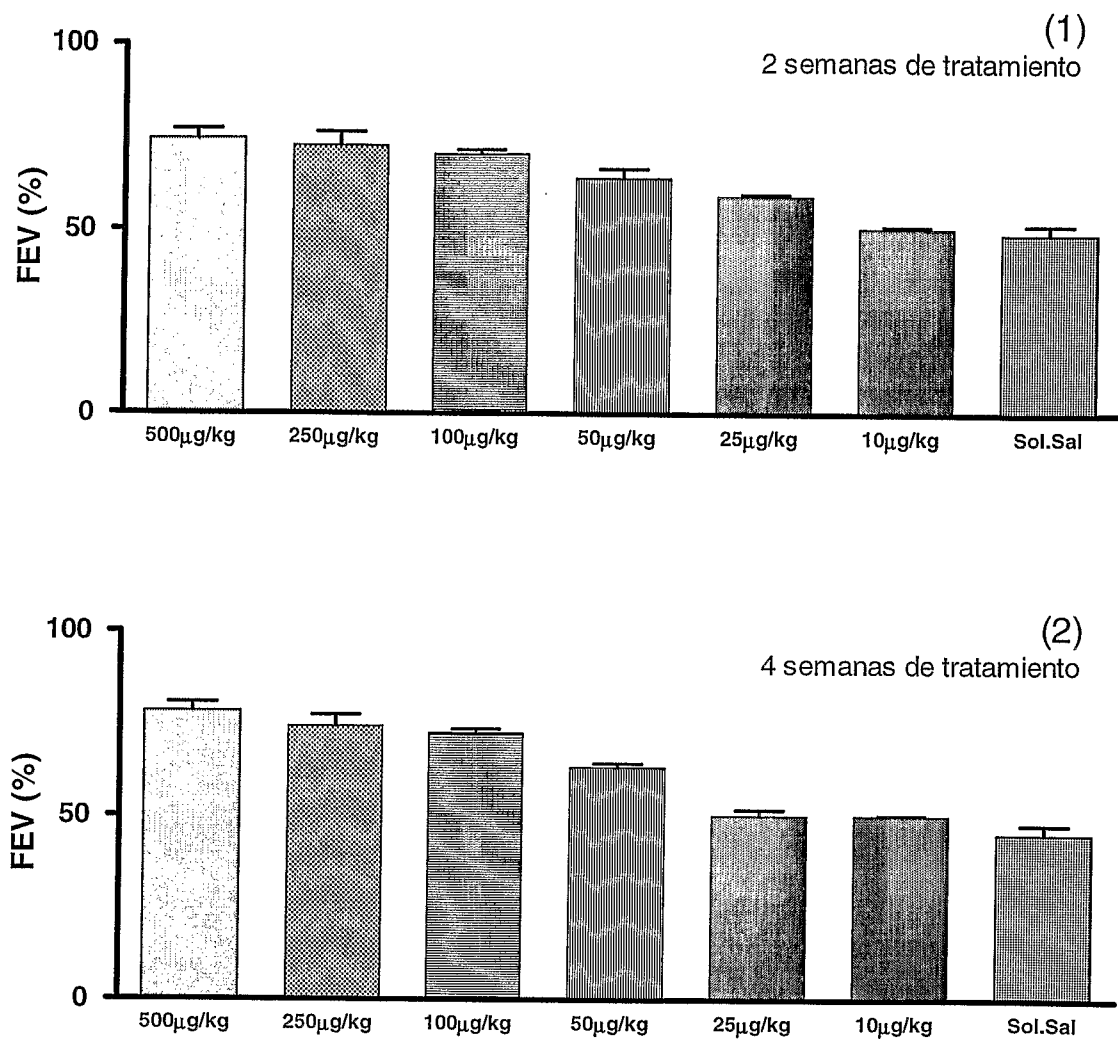


Figura 3c

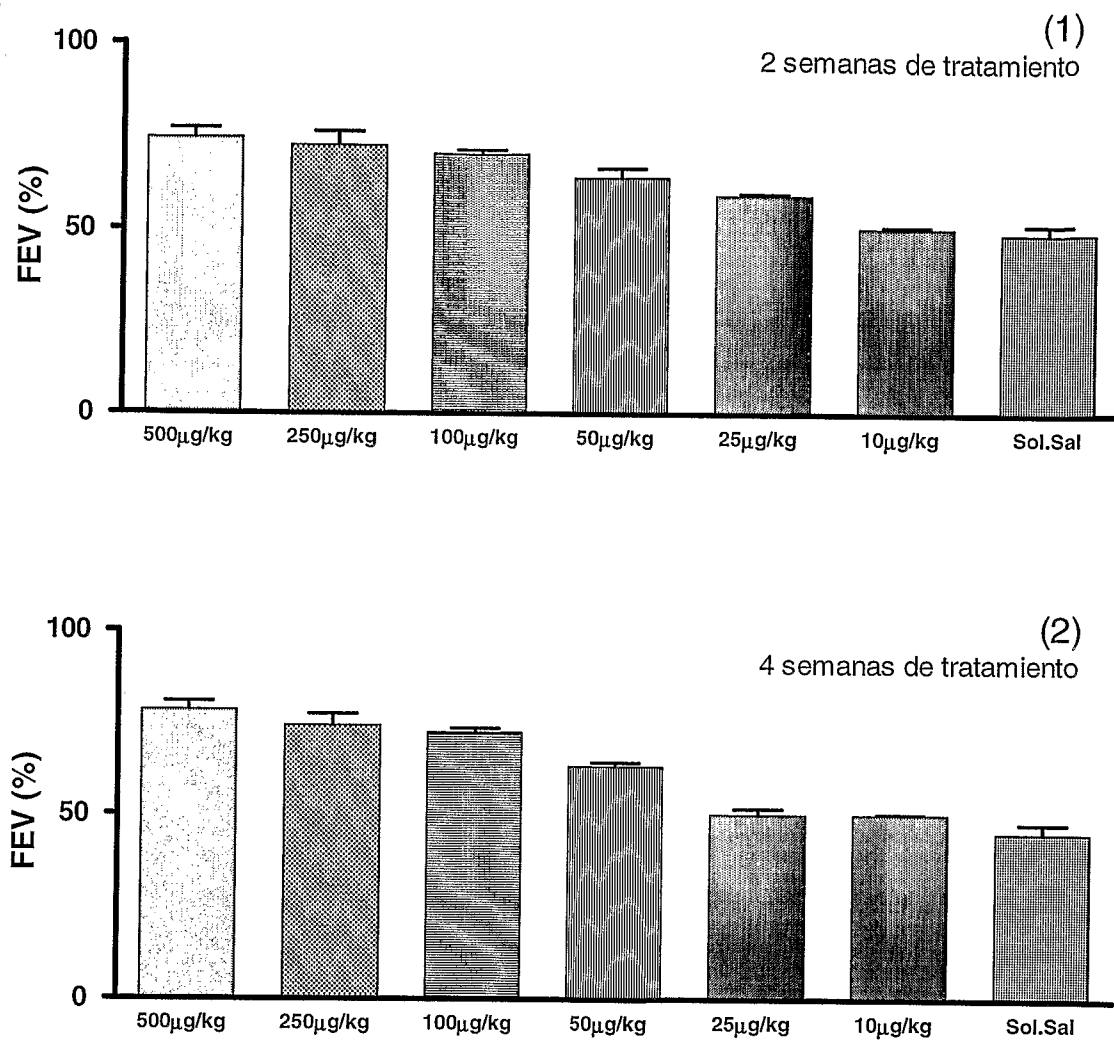


Figura 4a

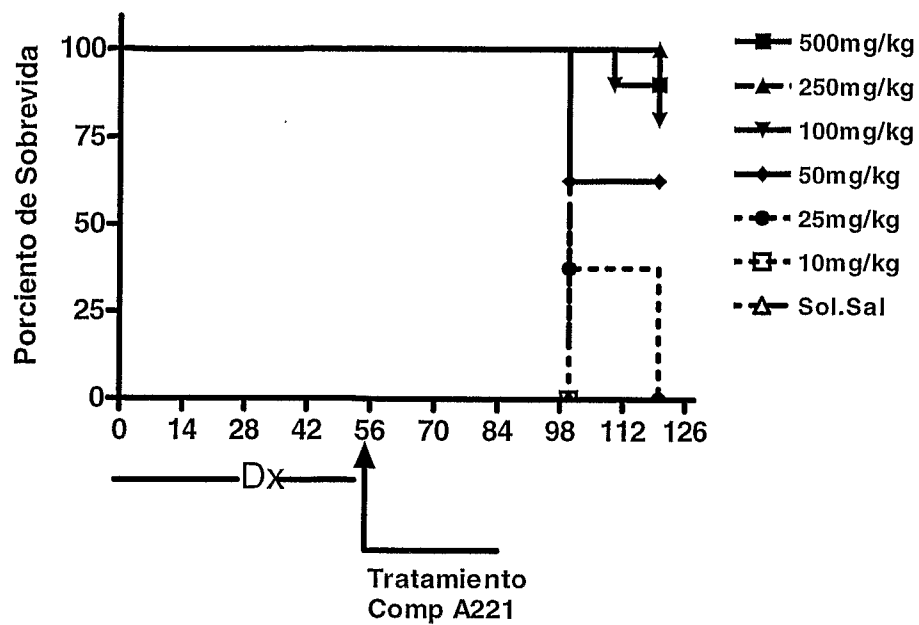


Figura 4b

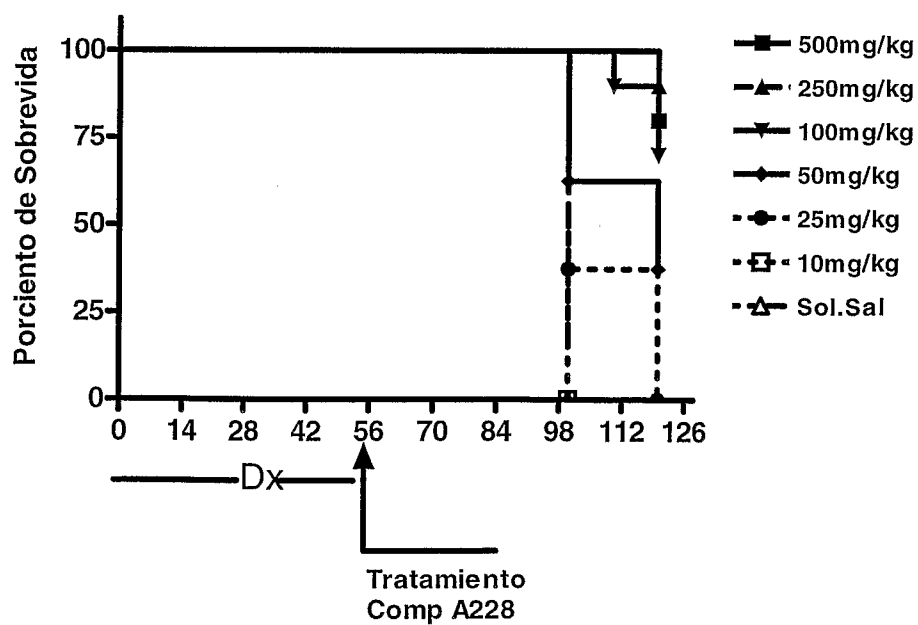
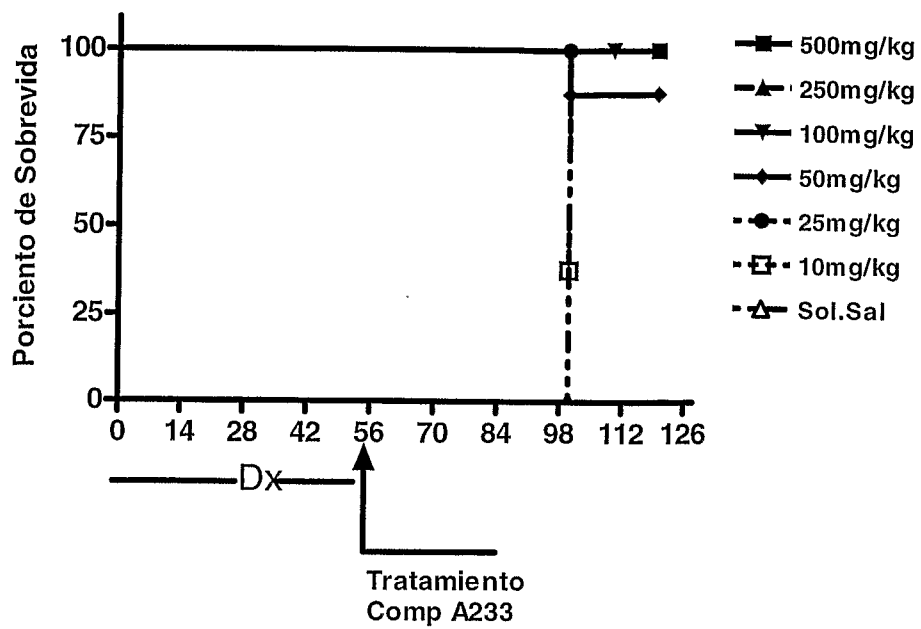


Figura 4c



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CU2007/000007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K7/06 C07K7/08 C07K14/60 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORT JH ET AL: "Regional and systemic haemodynamic effects of some vasopressins" EUROP. J. CLIN. INVEST, vol. 5, 1975, pages 165-175, XP009084677 figure 1	1-9
X	LAMMEK B ET AL: "Synthesis of three NH2-terminally extended arginine vasopressins with prolonged biological activities" EXPERIENTIA, vol. 43, 1987, pages 1211-1212, XP009084729 table 2	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 June 2007

Date of mailing of the international search report

04/07/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Petri, Bernhard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU2007/000007

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 6-9 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/CU2007/000007

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. C07K7/06 C07K7/08 C07K14/60 A61K38/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	CORT JH ET AL: "Regional and systemic haemodynamic effects of some vasopressins" EUROP. J. CLIN. INVEST, vol. 5, 1975, pages 165-175, XP009084677 figura 1	1-9
X	LAMMEK B ET AL: "Synthesis of three NH ₂ -terminally extended arginine vasopressins with prolonged biological activities" EXPERIENTIA, vol. 43, 1987, paginas 1211-1212, XP009084729 tabla 2	1-9

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

5 Junio 2007

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

04/07/2007

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Petri, Bernhard

N° de fax

N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/CU2007/000007

Recuadro II. Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

Although claims 6-9 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud nacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4(a).

Recuadro III. Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud nacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.