

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
RAD: 11-170483- -11	FECHA: 2014-11-06 14:19:20
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS: 9
ACT: 519 PRESENTACION	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado(a)/Señor(a)
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Asunto: Radicación: 11-170483- -11
 Trámite: 11
 Evento: 378
 Actuación: 519
 Oficio: 14004
 Folios: 9

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I	X	Capítulo II	
No. Solicitud Internacional	PCT/US2010/036365				
Fecha de Presentación Internacional	27/05/2010				

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Radicado No. 11-170483-00000-0000	12/Diciembre/2011
Reivindicaciones:	Radicado No. 11-170483-00000-0000	12/Diciembre/2011
	Radicado No. 11-170483-00005-0000	11/Septiembre/2013
	Radicado No. 11-170483-00008-0000	01/Abril/2014
Dibujos:	Radicado No. 11-170483-00000-0000	12/Diciembre/2011
Prioridad:	US 61 186 595	12/Junio/2009

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del capítulo primero del Título 10 de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por el solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10)

reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada.

Título de la solicitud: “Soluciones para infusión e inyección de diacetato de ipamorelina y método para producir la sal orgánica in situ” (modificado en la Resolución 9886 de 2014).

El problema planteado en esta solicitud consiste la necesidad de desarrollar una formulación inyectable de solubilidad y estabilidad óptima de ipamorelina que es utilizada como secretagoga de la hormona de crecimiento.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una solución para infusión o inyección de ipamorelina que comprende:

- a) ipamorelina solubilizada mediante aproximadamente dos equivalentes molares de ácido acético (diacetato de ipamorelina), en una cantidad de 0.001 a 20%, con base en el peso de la base libre de ipamorelina;
- b) un exceso molar de ácido cítrico o ácido acético, en una cantidad suficiente para dar un pH de por lo menos 4 y menos de 6.5;
- c) opcionalmente de 0.1 a 30% de uno o más auxiliares de formulación; y
- d) cantidad suficiente de agua hasta alcanzar 100%; todos los porcentajes se basan sobre el peso total de la solución.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A61K 9/08, A61K 38/25, A61K 47/12, A61K 9/00

4. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Las reivindicaciones 1y 3 no son claras porque el término aproximadamente es impreciso, por lo cual no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirlo por un término preciso o un rango concreto.

La reivindicación 1 no es clara porque de su lectura no se establece sin ambigüedad que el pH de la formulación está entre 4 y menos de 6.5, ya que después de la adición de del exceso molar de ácido cítrico o ácido acético se puede adicionar opcionalmente 0.1 a 30% de uno o más auxiliares de formulación, entre los cuales según lo soportado en la descripción se puede encontrar el NaOH y cambiar el pH de la formulación final. Se sugiere modificar la reivindicación de tal forma que se establezca el pH final de la composición.

La reivindicación 1 no es concisa porque no establece claramente cuáles son los auxiliares de formulación opcionales que se puede agregar, de acuerdo a lo efectivamente soportado en la descripción, lo que no permite determinar claramente el alcance de la solicitud. Se recuerda al solicitante que una composición debe ser caracterizada por sus componentes y las proporciones de éstos.

La reivindicación 5 no es clara porque señala que se ajusta el pH de la solución a por lo menos 3 y menos de 7, mientras que la reivindicación 1 establece que se añade un exceso molar de ácido cítrico o ácido acético en una cantidad suficiente para dar un pH de por lo menos 4 y menos de 6.5. Se sugiere modificar el pH en la reivindicación 5 para que concuerde con lo establecido en la reivindicación 1 y no generar confusiones a la hora de determinar el alcance del capítulo reivindicatorio.

5. Determinación del estado de la técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: Junio 12 de 2009 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación*
D1	WO2008124183	Methods of treating or preventing emesis using growth hormone secretagogues	16/Octubre/2008
D4	WO2005097173	Use of a secretagogue for the treatment of ghrelin deficiency	20/Octubre/2005
D5	The journal of pharmacology and experimental therapeutics Vol. 329, No. 3 329:1110–1116	Efficacy of Ipamorelin, a Novel Ghrelin Mimetic, in a Rodent Model of Postoperative Ileus	16/Marzo/2009

D1http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20081016&CC=WO&NR=2008124183A1&KC=A1

Divulga composiciones de ipamorelina preparadas en el marco de un método para tratar el riesgo de emesis. Las composiciones de ipamorelina se preparan disolviendo el activo en SSN (NaCl 0.9%), adicionando dos equivalentes de ácido acético glacial y ajustando el pH a 7.5 ± 0.2 por adición de NaOH 1N, solución stock 4mg/mL. La solución fue esterilizada por filtración ($0.22\mu\text{m}$) y congelada a -20°C . El día de la inoculación la solución fue descongelada y disuelta en NaCl 0.9% hasta la concentración deseada (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105]). En el estudio divulgado por el documento D1 se estableció que el activo ipamorelina (1mg/Kg/dosis IV) disminuye los episodios de náuseas y vómito comparado con el grupo control (Pág. 73, Párr. [117]).

D4http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20051020&CC=WO&NR=2005097173A2&KC=A2

Divulga claramente que los secretagogos de la hormona de crecimiento, derivados de grelina como Tabimorelina (NN703) e Ipamorelina (Pág. 9 y 16 línea 1) se pueden estabilizar en formulaciones inyectables estériles tipo soluciones (Pág. 44 líneas 33 a 35) mediante el control del pH en un rango que oscila entre: 3,5 y 7, o bien entre 4 y 6, incluso entre 5 y 6 y de forma específica puede estar entre 5,3 y 5,7 siendo preferible 5,5 (Pág. 45 líneas 5 a 18).

D5 da a conocer composiciones de ipamorelina. Las composiciones de ipamorelina se preparan disolviendo el activo en solución salina estéril, adicionando dos equivalentes de ácido acético glacial hasta pH 3 a 4 y ajustando el pH a 7.0 - 7.2 por adición de NaOH (Pág. 1111, col. de la derecha, test and control compounds).

6. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 1 consiste en una solución para infusión o inyección de ipamorelina que comprende:

- ipamorelina solubilizada mediante aproximadamente dos equivalentes molares de ácido acético (diacetato de ipamorelina), en una cantidad de 0.001 a 20%, con base en el peso de la base libre de ipamorelina;
- un exceso molar de ácido cítrico o ácido acético, en una cantidad suficiente para dar un pH de por lo menos 4 y menos de 6.5;
- opcionalmente de 0.1 a 30% de uno o más auxiliares de formulación; y
- cantidad suficiente de agua hasta alcanzar 100%; todos los porcentajes se basan sobre el peso total de la solución. (Ver radicado 11-170483-00008)

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D5
Una solución para infusión o inyección que comprende:	Una solución para infusión o inyección que comprende:	Una solución que comprende:
(a) ipamorelina solubilizada mediante aproximadamente dos equivalentes molares de ácido acético (diacetato de ipamorelina) en una cantidad de 0.001 a 20%, con base en el peso de la base libre de ipamorelina	(a) ipamorelina solubilizada por reacción con dos equivalentes de ácido acético glacial en una proporción de 0.4% p/v (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105])	2 equivalentes molares de ácido acético glacial se usan para producir la sal diacetato soluble (Pág. 1111, col. de la derecha, test and control compounds).
(b) un exceso molar de ácido cítrico o ácido acético, en una cantidad suficiente para alcanzar un pH entre 4 y 6,5	(b) un exceso de ácido acético hasta alcanzar un pH inferior a 7.5	Exceso molar de ácido acético glacial para alcanzar un pH de 3 a 4 (Pág. 1111, col. de la derecha, test and control compounds).
(c) opcionalmente de 0.1 a 30% de uno o más auxiliares de formulación	(c) NaOH 1N para ajustar el pH a 7.5, NaCl 0.9% para ajustar tonicidad	La solución fue titulada con NaOH para obtener un pH de 7 a 7.2 (Pág. 1111, col. de la derecha, test and control compounds).
(d) cantidad suficiente de agua hasta 100%	(d) solución salina normal (NaCl 0.9% en agua) hasta 100% (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105])	Se hacen diluciones adicionales con solución salina (NaCl 0.9% en agua) hasta 100% (Pág. 1111, col. de la derecha, test and control compounds).
Donde todos los porcentajes se basan sobre el peso total de la solución	Porcentajes correspondientes al peso total de la formulación.	-

Las características **esenciales** de la composición de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual da a conocer composiciones de ipamorelina preparadas en el marco de un método para tratar el riesgo de emésis. Las composiciones de ipamorelina se preparan disolviendo el activo en SSN (NaCl 0.9%), adicionando dos equivalentes de ácido acético glacial y ajustando el pH a 7.5±0.2 por adición de NaOH 1N, solución stock 4mg/mL. La solución fue esterilizada por filtración (0.22µm) y congelada a -20 °C. El día de la inoculación la solución fue descongelada y disuelta en NaCl 0.9% hasta la concentración deseada (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105]). En el estudio divulgado por el documento D1 se estableció que el activo ipamorelina (1mg/Kg/dosis IV) disminuye los episodios de náuseas y vómito comparado con el grupo control (Pág. 73, Párr. [117]).

Las características **esenciales** de la composición de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento D5, el cual da a conocer composiciones de ipamorelina. Las composiciones de ipamorelina se preparan disolviendo el activo en solución salina estéril, adicionando dos equivalentes de ácido acético glacial hasta pH 3 a 4 y ajustando el pH a 7.0 - 7.2 por adición de NaOH (Pág. 1111, col. de la derecha, test and control compounds).

En consecuencia, la reivindicación carece de novedad, según lo divulgado en los documentos D1 y D5 en forma independiente.

La reivindicación dependiente 2 no menciona alguna característica que haga nueva a la composición de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no es nueva.

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 1 consiste en una solución para infusión o inyección de ipamorelina que comprende:

a) ipamorelina solubilizada mediante aproximadamente dos equivalentes molares de ácido acético (diacetato de ipamorelina), en una cantidad de 0.001 a 20%, con base en el peso de la base libre de ipamorelina;

b) un exceso molar de ácido cítrico o ácido acético, en una cantidad suficiente para dar un pH de por lo menos 4 y menos de 6.5;

c) opcionalmente de 0.1 a 30% de uno o más auxiliares de formulación; y

d) cantidad suficiente de agua hasta alcanzar 100%; todos los porcentajes se basan sobre el peso total de la solución. (Ver radicado 11-170483-00008)

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D4
Una solución para infusión o inyección que comprende:	Una solución para infusión o inyección que comprende:	Soluciones estériles para administración parenteral de secretagogos de la hormona de crecimiento como:
(a) ipamorelina solubilizada mediante aproximadamente dos equivalentes molares de ácido acético (diacetato de ipamorelina) en una cantidad de 0.001 a 20%, con base en el peso de la base libre de ipamorelina	(a) ipamorelina solubilizada por reacción con dos equivalentes de ácido acético glacial en una proporción de 0.4% p/v (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105])	(a) Ipamorelina o Tabimorelina (Pág. 9 y 16 línea 1)
(b) un exceso molar de ácido cítrico o ácido acético, en una cantidad suficiente para alcanzar un pH entre 4 y 6,5	(b) un exceso de ácido acético hasta alcanzar un pH inferior a 7.5	(b) formación de sales con ácidos orgánicos tal es el caso de ácido acético (Pág. 45 líneas 26 y 27). Control del pH en un rango que oscila entre: 3,5 y 7, o bien entre 4 y 6, incluso entre 5 y 6 y de forma específica puede estar entre 5,3 y 5,7 siendo preferible 5,5 (Pág. 45 líneas 5 a 18)
(c) opcionalmente de 0.1 a 30% de uno o más auxiliares de formulación	(c) NaOH 1N para ajustar el pH a 7.5, NaCl 0.9% para ajustar tonicidad	(c) pueden incorporar un regulador de pH de ser necesario, un diluyente isotonizante en cantidad suficiente como: solución salina o glucosa (Pág. 46, líneas 26 a 34)
(d) cantidad suficiente de agua hasta 100%	(d) solución salina normal (NaCl 0.9% en agua) hasta 100% (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105])	(d) solución acuosa
Donde todos los porcentajes se basan sobre el peso total de la solución	Porcentajes correspondientes al peso total de la formulación.	-

Los documentos D1 y D4 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención porque:

El documento D1 divulga composiciones de ipamorelina preparadas en el marco de un método para tratar el riesgo de emésis. Las composiciones de ipamorelina se preparan disolviendo el activo en SSN (NaCl 0.9%), adicionando dos equivalentes de ácido acético glacial y ajustando el pH a 7.5 ± 0.2 por adición de NaOH 1N, solución stock 4mg/mL. La solución fue esterilizada por filtración (0.22 μ m) y congelada a -20 °C. El día de la inoculación la solución fue descongelada y disuelta en NaCl 0.9% hasta la concentración deseada (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105]). En el estudio divulgado por el documento D1 se estableció que el activo ipamorelina (1mg/Kg/dosis IV) disminuye los episodios de náuseas y vómito comparado con el grupo control (Pág. 73, Párr. [117]).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1, y la composición divulgada en el documento D1 consiste en que el pH de la solución se ajusta en un rango concreto entre 4 y 6,5 por adición de un exceso molar de ácido acético; mientras que en el documento D1 se indica que el pH debe ser menor a 7,5 y se controla por adición de 1N de NaOH de ser requerido (Párr. 00104, Págs. 70 y 71).

El efecto técnico que causa la adición del exceso molar de ácido acético para llevar el pH a un rango entre 4 y 6,5 consiste en mejorar las condiciones de estabilidad de la molécula ipamorelina en solución, hasta alcanzar que la potencia etiquetada del activo permanezca en niveles del 98, 68% y 97, 96% después de realizar un ensayo de estabilidad por un periodo de 6 meses a 40°C (DP#1 a pH de 5 y DP#4 a pH de 6), frente al control que alcanzó un nivel de 92,28%.

El problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo modificar la formulación divulgada en el documento D1 para disminuir la tendencia a la inestabilidad de las formulaciones para infusión o inyección de ipamorelina”.

Sin embargo, el documento D4 divulga claramente que los secretagogos de la hormona de crecimiento, derivados de grelina como Tabimorelina (NN703) e Ipamorelina (Pág. 9 y 16 línea 1) se pueden estabilizar en formulaciones inyectables estériles tipo soluciones (Pág. 44 líneas 33 a 35) mediante el control del pH en un rango que oscila entre: 3,5 y 7, o bien entre 4 y 6, incluso entre 5 y 6 y de forma específica puede estar entre 5,3 y 5,7 siendo preferible 5,5 (Pág. 45 líneas 5 a 18).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia contaba con la sugerencia o motivación razonable para diseñar formulaciones parenterales para infusión tipo inyectables mediante la conversión de los péptidos en sus sales de adición con ácidos orgánicos como el ácido acético, como se divulga en el documento D1, y de controlar el pH de la solución para lograr estabilizar las sales tal y como se divulga en el documento D4, por lo cual, la reivindicación 1 se considera obvia y sin nivel inventivo.

La reivindicación 3 consiste en un método para producir soluciones para infusión e inyección de diacetato de ipamorelina in situ, a una concentración de ipamorelina de 0.001 a 20%, sin aislar la sal de diacetato después de formación, que comprende:

- a) mezclar la base libre de ipamorelina y ácido acético en una relación molar de aproximadamente 1:2 para formar una solución acuosa de diacetato de ipamorelina;
- b) mezclar dicho diacetato de ipamorelina con 0.1 a 30% de uno o más auxiliares de formulación incluyendo un exceso molar de ácido acético, sin aislar dicho diacetato de ipamorelina en forma sólida; y
- c) mezclar opcionalmente dicho diacetato de ipamorelina con agua adicional de tal manera que la concentración final de ipamorelina es de 0.001 a 20%, con base en el peso total de la solución y el peso de la base libre de ipamorelina; en donde se realizan las etapas (a), (b) y (c) simultáneamente, secuencialmente o en cualquier orden. (Ver radicado 11-170483-00008)

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D4
Un método para producir una solución para infusión e inyección de diacetato de ipamorelina in situ en una concentración de 0.001 a 20% sin aislar la sal de acetato después de la formación, que comprende	Un método para preparar una solución inyectable de ipamorelina en una concentración de 0.4% p/v sin aislar la sal de acetato después de la formación, que comprende:	Proceso para preparar soluciones estériles para administración parenteral de secretagogos de la hormona de crecimiento como: (Pág. 53, líneas 11 a 17 y Pág. 54, líneas 16 a 26)
(a) mezclar la base libre de ipamorelina y ácido acético en una relación molar de aproximadamente 1:2 para formar una solución acuosa de diacetato de ipamorelina;	(a) mezclar la base libre de ipamorelina y ácido acético glacial en una relación molar de 1:2 para formar una solución acuosa de diacetato de ipamorelina (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105])	(a) Ipamorelina o Tabimorelina (Pág. 9 y 16 línea 1)
(b) mezclar dicho diacetato de ipamorelina con de 0.1 a 30% de uno o más auxiliares de formulación incluyendo un exceso molar de ácido acético, sin aislar dicho diacetato de ipamorelina en forma sólida,	(b) mezclar dicho diacetato de ipamorelina con NaOH 1N para ajustar el pH a 7.5 y NaCl 0.9% para ajustar tonicidad sin aislar dicho diacetato de ipamorelina en forma sólida	(b) formación de sales con ácidos orgánicos tal es el caso de ácido acético (Pág. 45 líneas 26 y 27). Control del pH en un rango que oscila entre: 3,5 y 7, o bien entre 4 y 6, incluso entre 5 y 6 y de forma específica puede estar entre 5,3 y 5,7 siendo preferible 5,5 (Pág. 45 líneas 5 a 18)
(c) mezclar opcionalmente dicho diacetato de ipamorelina con agua adicional de tal manera que la concentración final de ipamorelina es de 0,001 a 20%, con base en el peso total de la solución y el peso de la base libre de ipamorelina;	(c) mezclar con solución salina normal (NaCl 0.9% en agua) hasta 100% para obtener una solución stock de concentración 4mg/mL equivalente a 0.4% p/v (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105]).	(c) pueden incorporar un regulador de pH de ser necesario, un diluyente isotonizante en cantidad suficiente como: solución salina o glucosa (Pág. 46, líneas 26 a 34)
en donde se forman las etapas (a), (b) y (c) simultáneamente, secuencialmente o en cualquier orden.	Secuencial (Págs. 70 y 71)	No menciona

Los documentos D1 y D4 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención porque:

El documento D1 divulga un método de tratamiento de la emésis que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un secretagogo de la hormona de crecimiento o una sal, hidrato o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable (Pág. 2, Párr. [004]). Específicamente el documento divulga un ensayo de evaluación de la actividad *in vivo* del método de tratamiento, en el cual hurones machos de 24 semanas recibieron una dosis de cisplatino (10mg/Kg IP) y posteriormente recibieron dos dosis de SSN, grelina (0.25 mg/Kg IV) o ipamorelina (1mg/Kg/dosis IV). Dicha formulación de ipamorelina fue preparada disolviendo el activo en SSN (NaCl 0.9%), adicionando dos equivalentes de ácido acético glacial y ajustando el pH a 7.5±0.2 por adición de NaOH 1N, solución stock 4mg/mL. La solución fue esterilizada por filtración (0.22µm) y congelada a 20 °C. El día de la inoculación la solución fue descongelada y disuelta en NaCl 0.9% hasta la concentración deseada (Pág. 70, Párr. [103] a Pág. 71, Párr. [105]). El estudio divulgado en el documento D1 permitió establecer que ipamorelina (1mg/Kg/dosis IV) disminuye los episodios de náuseas y vomito comparado con el grupo control (Pág. 73, Párr. [117]).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 3, y el procedimiento divulgado en el documento D1 consiste en la etapa b) del método en la que se adiciona un exceso molar de ácido acético.

El efecto que se logra por el hecho de incluir un exceso molar de ácido acético consiste en controlar el pH de la solución con el propósito de evitar la inestabilización del péptido ipamorelina.

El problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo modificar el procedimiento divulgado en el documento D1 para diseñar un procedimiento para elaborar composiciones parenterales para infusión e inyección de ipamorelina que anulen el impacto de procesos de descomposición del péptido”.

Sin embargo, el documento D4 divulga un proceso para la elaboración de soluciones parenterales de secretagogos de la hormona de crecimiento, entre ellos tabimorelina (NN703) e ipamorelina (Pág. 9 y 16 línea 1) que contempla sus sales y que consiste en prepararlos en agua o solución salina y opcionalmente incorporar un tensioactivo, agentes reguladores de pH, formadores de liposomas, diluentes y otra clase de aditivos (Pág. 53, líneas 11 a 17 y Pág. 54, líneas 16 a 26). El documento D4 señala además que se pueden estabilizar las formulaciones inyectables estériles tipo soluciones (Pág. 44 líneas 33 a 35), mediante el control del pH en un rango que oscila entre: 3,5 y 7, o bien entre 4 y 6, incluso entre 5 y 6 y de forma específica puede estar entre 5,3 y 5,7 siendo preferible 5,5 (Pág. 45 líneas 5 a 18). Además, el documento enseña que es posible formar sales de adición con ácidos orgánicos (Pág. 45 líneas 26 y 27) entre los que se contempla el ácido acético. Asimismo, el documento enseña que para el caso de soluciones para administración parenteral los compuestos se pueden incorporar en soluciones acuosas estériles que incluso pueden incorporar un regulador de pH de ser necesario, un diluyente isotonizante en cantidad suficiente como es el caso de solución salina o glucosa (Pág. 46, líneas 26 a 34).

En consecuencia, la persona versada en la materia contaba con la sugerencia o motivación razonable para diseñar un método de elaboración de composiciones para infusión o inyección como el divulgado en el documento D1, mediante la formación de las sales de secretatogos de la hormona de crecimiento tipo grelina o ipamorelina con ácidos orgánicos como el ácido acético, y de incluir una etapa en la que se controle el pH de la solución para garantizar la estabilidad del péptido en un pH que esté entre 3 y 7, tal y como lo señala el documento D4 para llegar al objeto de la reivindicación 3 y sus dependientes 4 a 6, por lo cual, el método se considera obvio y sin nivel inventivo.

7. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	WO2008124183	1 – 6	Novedad/Nivel Inventivo
D4	WO2005097173	1 – 6	Nivel Inventivo
D5	The journal of pharmacology and experimental therapeutics Vol. 329, No. 3 329:1110–1116	1 y 2	Novedad

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir del día siguiente de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JESÚS FERNEL GARCÍA GARCÍA
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2014-11-11

Elaboró: Juanita Catalina Rico Valbuena
Revisó: Gloria Jacqueline Alfonso Roza

Efficacy of Ipamorelin, a Novel Ghrelin Mimetic, in a Rodent Model of Postoperative Ileus

Kalina Venkova, William Mann, Richard Nelson, and Beverley Greenwood-Van Meerveld

Department of Physiology (K.V., B.G.-V.M.), Oklahoma Center for Neuroscience University of Oklahoma Health Science Center (K.V., B.G.-V.M.), and Veterans Administration Medical Center (B.G.-V.M.), Oklahoma City, Oklahoma; and Sapphire Therapeutics, Inc., Bridgewater, New Jersey (W.M., R.N.)

Received December 10, 2008; accepted March 13, 2009

ABSTRACT

Ghrelin and ghrelin mimetics stimulate appetite and enhance gastric motility. The present study investigates whether ipamorelin, a selective growth hormone secretagogue and agonist of the ghrelin receptor, would accelerate gastrointestinal transit and ameliorate the symptoms in a rodent model of postoperative ileus (POI). Fasted male rats were subjected to laparotomy and intestinal manipulation. At the end of surgery, a dye marker was infused in the proximal colon to evaluate postsurgical colonic transit time, which was the time to the first bowel movement. In addition, fecal pellet output, food intake, and body weight were monitored regularly for 48 h. Ipamorelin (0.01–1 mg/kg), growth hormone-releasing peptide (GHRP)-6

(20 μ g/kg), or vehicle (saline) were administered via intravenous bolus infusion after a single dosing or a 2-day repetitive dosing regimen (four doses a day at 3-h intervals). Compared with the vehicle, a single dose of ipamorelin (1 mg/kg) or GHRP-6 (20 μ g/kg) decreased the time to the first bowel movement but had no effect on cumulative fecal output, food intake, or body weight gain measured 48 h after the surgery. In contrast, repetitive dosing of ipamorelin (0.1 or 1 mg/kg) significantly increased the cumulative fecal pellet output, food intake, and body weight gain. The results suggest that postsurgical intravenous infusions of ipamorelin may ameliorate the symptoms in patients with POI.

Postoperative ileus (POI) is a gastrointestinal (GI) dysfunction that develops as a consequence of abdominal surgery or other major surgical procedures. Abdominal distention, nausea, vomiting, anorexia, and an inability to pass stool are the main symptoms of POI. Although normal GI motility returns spontaneously within several days in most patients, POI is the main cause for prolonged hospitalization and often leads to serious complications in others (Senagore, 2007). The mechanisms causing POI are complex, involving immune and neuronal reactions to the surgery that result in delayed gastric emptying and impaired propulsive motility of the bowel (Bauer and Boeckxstaens, 2004). In addition, opioid drugs used for pain management contribute significantly to the delay in GI transit.

POI is a generalized event involving the entire GI tract and not restricted to the region directly subjected to manipulation. Manipulation of the small intestine in the rat was found

to inhibit muscle contractility and evoke inflammatory responses in the stomach and the colon (Kalff et al., 1998; Schwarz et al., 2004), whereas manipulation of the cecum delayed gastric emptying (Martínez et al., 1999). Moreover, the time course of functional recovery varies in different anatomical regions of the GI tract. In humans, small intestinal motility recovers within several hours, whereas the recovery of gastric function takes 1 to 2 days, and colonic propulsive motility requires at least 2 to 3 days for recovery (Condon et al., 1986). There are currently no pharmacological agents available to normalize gut motility, and the pharmacological strategies proposed to accelerate recovery from POI are based on the effects of commonly used prokinetic drugs and/or selective periphery-restricted opioid receptor antagonists (for review, see Greenwood-Van Meerveld, 2007). The treatment of POI is limited to supportive measures to correct nutrition and fluid deficits and promote GI function by early feeding, ambulation, or selective use of nasogastric decompression to alleviate the symptoms. Because anorexia is a major complication during the postoperative period, the capability of a novel agent to promote food intake could also be

This work was supported by Sapphire Therapeutics, Inc.
Article, publication date, and citation information can be found at
<http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.108.149211.

ABBREVIATIONS: POI, postoperative ileus; GI, gastrointestinal; GRLN, ghrelin; GHRP, growth hormone-releasing peptide; ANOVA, analysis of variance; TZP-101, (4*R*,7*S*,10*R*,13*R*)-7-cyclopropyl-13-(4-fluorobenzyl)-3-oxa-6,9,12,15-tetraaza-4,9,10-trimethyl-4,5,6,7,10,12,13,15,16,17,18-undecahydro-1,2-benzocyclooctadecene-8,11,14-trione; GSK894281, *N*-[5-(*cis*-3,5-dimethyl-1-piperazinyl)-2-(methoxy)phenyl]-3-fluoro-4-(5-methyl-2-furanyl) benzenesulphonamide.

of benefit. Most recently, a new class of agents that mimic the activity of endogenous ghrelin by exhibiting both prokinetic and orexigenic effects has been proposed for the treatment of POI. TZP-101 (Hoveyda et al., 2006), a small molecule with potent binding affinity and full agonist activity at the human recombinant ghrelin (GRLN) receptor, is now in clinical development (Lasseter et al., 2008).

The GRLN receptor has been previously identified as an orphan receptor referred to as the growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor or growth hormone secretagogue receptor_{1a} because its activation by synthetic small peptide compounds resulted in the release of growth hormone from the pituitary (Davenport et al., 2005). More than 10 years ago, ipamorelin was characterized as the first selective GHRP receptor agonist showing no significant effect on plasma ACTH and cortisol levels (Raun et al., 1998). Later, a 28-amino acid peptide isolated from rat stomach was discovered as the endogenous ligand of the orphan receptor and called ghrelin (Kojima et al., 1999). Endogenous ghrelin is a multifunctional hormone involved in the regulation of appetite, feeding behavior, and GI motility. Because regulation of food intake (Ueno et al., 2005) and stimulation of gastric motility and secretion (Masuda et al., 2000; Fujino et al., 2003) are among the most important biological effects of ghrelin, treatment with ghrelin mimetics or ghrelin could be of benefit to the patient after surgery. Preclinical studies in rodent models of POI have shown that both ghrelin and small molecule synthetic agonists of the GRLN receptor accelerate gastric emptying (Trudel et al., 2002; Poitras et al., 2005; Venkova et al., 2007). The goal of this study was to investigate whether ipamorelin, a synthetic peptidomimetic that selectively stimulates the ghrelin receptor and causes growth hormone release (Raun et al., 1998), would accelerate GI transit in a rat model of POI. The results support the concept that repetitive intravenous infusions of the GRLN receptor agonist ipamorelin could improve GI motility and support the overall recovery after abdominal surgery. Clinical development of ipamorelin for the treatment of POI is underway.

Materials and Methods

Animals. Adult male Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA) at an initial body weight of 250 to 270 g. An acclimation period of at least 1 week was allowed before the experiments. All rats were single-housed with free access to food and water at 21 to 23°C and a 12-h light/dark cycle. The animals were purchased with indwelling catheters implanted in the right jugular vein for administration of drugs or vehicle. The catheters were maintained patent by gently flushing with 0.2 to 0.3 ml of heparinized saline every 3 to 4 days. An additional group of control rats, not subjected to surgery and drug or vehicle treatment, was purchased with an indwelling catheter implanted into the proximal colon (1–2 cm from the cecum) used for infusion of a dye marker measuring colonic transit. The colonic catheters were flushed with 0.2 ml of saline every 3 to 4 days. The experimental protocol was approved by the Animal Studies Subcommittee, Research and Development Committee and the Institutional Animal Care and Use Committee at the Oklahoma City Veterans Administration Medical Center and University of Oklahoma Health Sciences Center.

Abdominal Surgery. POI was induced by a surgical procedure described as “running of the bowel” (Kalf et al., 1998). Rats were anesthetized with isoflurane (2–3%) inhalation, the abdomen was shaved, the area was treated with alcohol and then a povidone-iodine topical antiseptic for disinfection, and a midline incision was made to

expose the viscera. The small intestine and the cecum were exteriorized, inspected for 5 min using cotton applicators soaked in sterile saline, and then covered with gauze soaked in saline for an additional 10 min. At the end of the surgery, the small intestine and the cecum were placed back into the abdominal cavity, and the incision was closed with running silk sutures. The surgical procedure lasted 25 to 30 min and was always performed at 6:00 to 8:00 AM.

Colonic Transit Time. Before the experiments all rats were fasted for 20 to 22 h with free access to water. To evaluate colonic transit, 200 µl of a nonabsorbable dye marker (trypan blue in saline) was injected into the proximal colon at the end of the surgical procedure. The abdomen was closed, and the rats were placed in clean home cages supplied with preweighed food (Purina rat chow) and water. Within a period of 5 to 10 min, the rats regained consciousness and started ambulating in the home cage. Colonic transit time, which was also the time to the first bowel movement, was evaluated as the period between the end of surgery and the appearance of dye in the fecal pellet. A control rat, not subjected to surgery and drug or vehicle treatment, was studied on each experimental day together with the rats with POI. The control rats were equipped with colonic catheters used to infuse the dye marker into the colon after a 20- to 22-h fasting.

Cumulative Fecal Output, Food Intake, and Body Weight. In the rats treated with a single dose of ipamorelin fecal pellets were counted and weighed at 3-h intervals during the first 12 h after surgery and then at 24 and 48 h postsurgery. The cumulative fecal output was evaluated by adding the number of pellets at 12, 24, and 48 h postsurgery. Food intake was recorded at the same time points according to the experimental design and was normalized as grams per 100 g of body weight. In the rats subjected to multiple dosing of ipamorelin, fecal output and food intake were measured after each administration of ipamorelin between 0 and 12 and 24 and 36 h after the surgery. The data from all time points were subjected to regression analysis to evaluate the rate of recovery of fecal output and food intake in the rats receiving ipamorelin or vehicle treatment on the 1st and 2nd days after the surgery. The cumulative food intake was calculated for 48 h postsurgery. Body weight was measured daily at 6:00 to 8:00 AM before fasting the animals, on the day of experiment before the surgery and at 24 and 48 h postsurgery. Changes in body weight are expressed as body weight gain compared with the weight of the fasted animal taken before the surgery.

Test and Control Compounds. The test compound, ipamorelin, is a pentapeptide (Aib-His-D-2-Nal-D-Phe-Lys-NH₂) (Raun et al., 1998). Ipamorelin-free base (Albany Molecular Research, Inc., Albany, NY) used in the experiments was provided by Sapphire Therapeutics, Inc. (Bridgewater, NJ). Because the solubility of ipamorelin is very low, 2 M equivalents of glacial acetic acid are required to produce a soluble diacetate salt. Stock solutions of 0.5 mg/ml were prepared daily in sterile saline plus glacial acetic acid (0.1 µl/ml) to bring ipamorelin into solution, pH 3 to 4. The solution was titrated with NaOH to pH 7.0 to 7.2. Additional dilutions were made in saline. Sterile saline was used in the vehicle control experiments. The positive control GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and dissolved in sterile saline.

Experimental Design. The animals received ipamorelin or vehicle treatment during the light phase of the light/dark cycle. Both the test and control compounds were administered as a bolus intravenous infusion via the jugular catheter at a volume of 0.2 ml/100g body weight. Two series of experiments employing a single or repetitive administration of ipamorelin were performed to evaluate the ability of ipamorelin to reduce the symptoms of POI. The growth hormone secretagogue GHRP-6 (20 µg/kg) was used as a positive control because it has been reported to accelerate gastric emptying in mice at a dose range of 20 to 100 µg/kg (De Winter et al., 2004). In the first series, ipamorelin or vehicle was administered as a single bolus intravenous infusion at the end of the surgery at doses of 0.1 to 1 mg/kg. Colonic transit time was evaluated by the appearance of the

first marked fecal pellet. Cumulative fecal pellet output and food intake were measured at 3-h intervals during the first 12 h and at 12-h intervals until 48 h after surgery. In the second series, ipamorelin at doses of 0.01, 0.1, or 1 mg/kg or vehicle was administered according to a repetitive dosing regimen initiated at the end of surgery. Two series of four consecutive bolus infusions performed at 3-h intervals were administered between 8:00 AM and 5:00 PM on the 1st and 2nd postoperative days. Fecal pellet output and food intake were measured at 3-h intervals after each of the individual doses. The dosing regimen was based on the relatively short 2-h half-life of ipamorelin (Gobburu et al., 1999). All animals were weighed 1 day before the surgery, after a 20- to 22-h fasting before surgery and at 24 and 48 h postsurgery. Four surgeries were performed on each experimental day, and the doses of ipamorelin were given in a randomized manner. A vehicle control and a control rat (not subjected to surgery) were studied simultaneously with the rats receiving ipamorelin on each experimental day.

Data Analysis and Statistics. The data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. for each group. Differences between groups were assessed for statistical significance by Student's *t* test and by one- or two-way ANOVA followed by Dunnett's or Bonferroni's test for multiple comparisons where appropriate. A level of $p < 0.05$ was considered significant. In addition, the effects of multiple dosing were evaluated using linear regression analysis of individual data. The statistical procedures were performed using Prism software (version 4; GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Results

The Rat Model of POI. To study the effect of surgery on GI function, we evaluated surgery-induced inhibition of the propulsive motility of the colon by measuring the colonic transit time to the first bowel movement after surgery and the cumulative fecal output for 48 h. Food intake and body weight were also measured. In the present study, abdominal surgery was found to delay colonic transit, causing a significant increase of the time to the first bowel movement registered by the appearance of a colored fecal pellet (10.4 ± 0.6 h in rats subjected to surgery versus 6.6 ± 0.6 h in control rats, $p < 0.05$, Student's *t* test). The cumulative fecal pellet output was significantly decreased during the first 12 and 24 h after surgery (Fig. 1A). When placed in the home cage for observation, control rats and rats subjected to surgery ingested approximately the same amount of food during the first 0 to 3 h. However, at later periods of 12, 24, and 48 h, food intake was suppressed in the rats with POI (Fig. 1B). In accordance, the body weight gain in the rats with POI was significantly lower at 24 and 48 h in comparison with control rats (Fig. 1C).

Effects of a Single-Dose Treatment with Ipamorelin in Rats with POI. Experiments were performed in rats with POI to investigate the efficacy of a single-dose treatment with ipamorelin at doses of 0.1 or 1 mg/kg. Ipamorelin or the vehicle was administered via intravenous infusion upon completion of the surgery, and efficacy was evaluated during a 48-h recovery period by comparing the effects of ipamorelin with the effect of the vehicle. In addition, the effect of the GRLN receptor agonist GHRP-6 administered at a dose of 20 μ g/kg was studied as a positive control. The results presented in Fig. 2 demonstrate that a single postsurgical dose of ipamorelin (1 mg/kg) or GHRP-6 significantly decreased colonic transit time shortening the time to the first bowel movement. However, neither ipamorelin nor GHRP-6 had any significant effect on cumulative fecal pellet output (Fig.

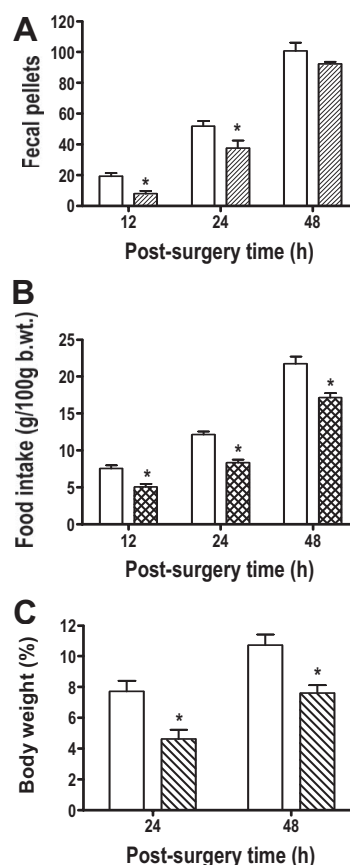


Fig. 1. Cumulative fecal pellet output (A), food intake (B), and body weight gain (C) were decreased in rats subjected to abdominal surgery with manipulation of the bowel (hatched bars) compared with control rats (open bars). Data are mean $\pm$ S.E.M. from 12 rats with POI and 14 control rats. Statistical significance of the differences was assessed by two-way ANOVA ($p < 0.05$) and Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons: *, $p < 0.05$ compared with vehicle.

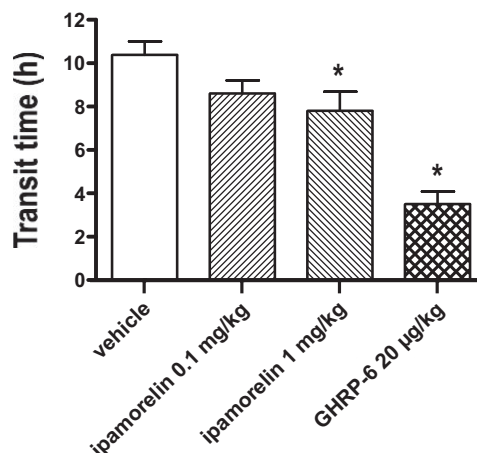


Fig. 2. Colonic transit time, which was also the time to the first bowel movement in rats after surgery, was decreased by a single dose of 1 mg/kg ipamorelin or 20 μ g/kg GHRP-6. Data are mean $\pm$ S.E.M. from 9 to 12 rats per group. Statistical significance of the differences was assessed by one-way ANOVA ($p < 0.05$) and Dunnett's post hoc test for multiple comparisons to the vehicle: *, $p < 0.05$.

3A), food intake (Fig. 3B), or body weight gain (Fig. 3C), measured at 12, 24, and 48 h after surgery.

Effects of Repetitive Dosing of Ipamorelin in Rats with POI. In a separate series of experiments, we investi-

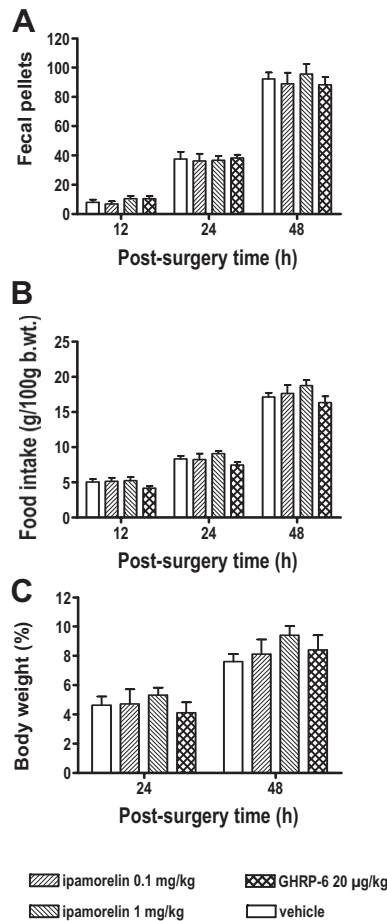


Fig. 3. Single dose treatment with ipamorelin (0.1–1 mg/kg) or GHRP-6 (20 µg/kg) had no significant effect on the cumulative fecal pellet output (A), food intake (B), and body weight gain (C) in rats subjected to abdominal surgery. Data are mean $\pm$ S.E.M. from 9 to 12 rats. Differences were assessed for statistical significance by two-way ANOVA ($p > 0.05$).

gated the dose-response effect of repetitive dosing of ipamorelin (0.01, 0.1, or 1 mg/kg i.v.) during the first 48 h postsurgery. The colonic transit time to the first bowel movement was significantly decreased by 0.1 or 1 mg/kg ipamorelin compared with the effect of the vehicle (Fig. 4). In addition, the effect of ipamorelin on cumulative fecal pellet output was associated with an increase in the number of fecal pellets.

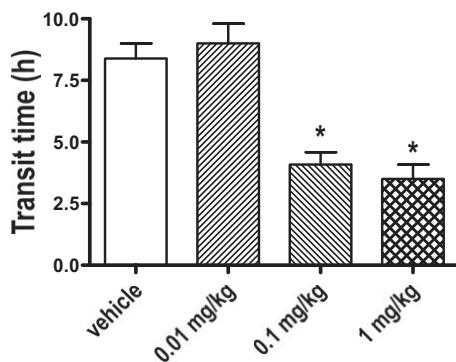


Fig. 4. Colonic transit time, which was also the time to the first bowel movement after surgery, was decreased by ipamorelin (0.1–1 mg/kg). Data are mean $\pm$ S.E.M. from eight to nine rats per group. Statistical significance of the differences was assessed by one-way ANOVA ($p < 0.05$) and Dunnett's post hoc test for multiple comparisons with the vehicle: *, $p < 0.05$.

The number of fecal pellets produced during the 48-h postsurgical period was significantly higher at doses of 0.1 or 1 mg/kg (Fig. 5A). Regression analysis of the individual data for each treatment group demonstrated a linear increase of fecal output during treatment with ipamorelin (0.01–1 mg/kg) or vehicle (Fig. 5B). However, fecal output increased at a higher rate in the rats receiving ipamorelin at doses of 0.1 or 1 mg/kg compared with rats treated with vehicle (Table 1). The repetitive dosing of ipamorelin caused a similar increase in food intake (Fig. 6, A and B; Table 1). The rats receiving 1 mg/kg ipamorelin gained significantly more weight during the first 48 h after surgery compared with the rats treated with the vehicle (Fig. 7).

Discussion

The rat model of POI induced by manipulation of the bowel is commonly used to investigate the pathogenic mechanisms relevant to the postsurgical development of GI dysfunction in humans and to investigate the efficacy of new therapeutic treatments. In previous studies, rats with POI showed a significant delay in colonic transit times and a decrease in fecal pellet output and food intake compared with control animals (Fraser et al., 2009). Data presented in this study confirm that colonic transit, food intake, and body weight gain are suppressed during the first 48 h after abdominal surgery and provide new evidence that ipamorelin, a peptidomimetic acting as an agonist of the GRLN receptor (Raun et

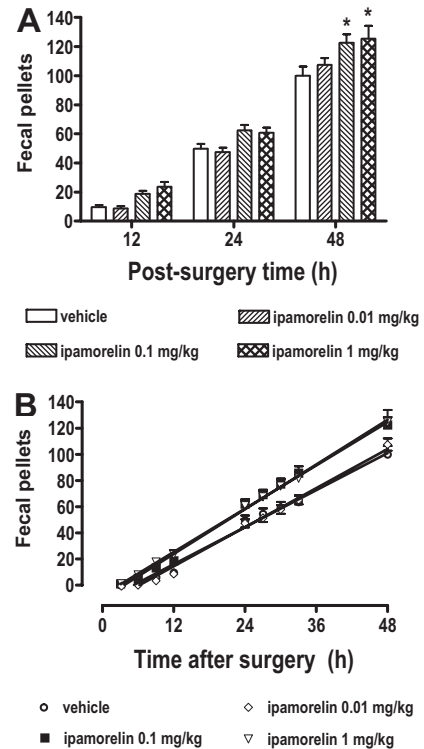


Fig. 5. A, effects of repetitive dosing of ipamorelin (0.01–1 mg/kg) on the cumulative number of fecal pellets produced during the 48-h period after surgery. Data are mean $\pm$ S.E.M. from eight to nine rats per group. Significance of the differences was evaluated by two-way ANOVA ($p < 0.05$) and Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons: *, $p < 0.05$ compared with vehicle. B, regression analysis of the individual data for each treatment group demonstrated that fecal output increased at a higher rate in the groups treated with 0.1 or 1 mg/kg ipamorelin. Graph points represent mean $\pm$ S.E.M. for each group.

TABLE 1
Regression analysis of the time-dependent increase in fecal pellet output and food intake in rats with POI treated with ipamorelin or vehicle

Linear Regression	Repetitive Dosing Vehicle	Repetitive Dosing Ipamorelin		
		0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg
Cumulative fecal pellet output				
R^2	0.91	0.95	0.94	0.92
Slope	2.36	2.49	2.58*	2.75*
95% CL	2.18–2.48	2.35–2.63	2.68–3.02	2.59–2.96
Cumulative food intake				
R^2	0.90	0.88	0.91	0.87
Slope	0.28	0.29	0.33*	0.35*
95% CL	0.26–0.31	0.27–0.31	0.32–0.38	0.31–0.35

CL, confidence limit.
* $p < 0.5$ compared with vehicle.

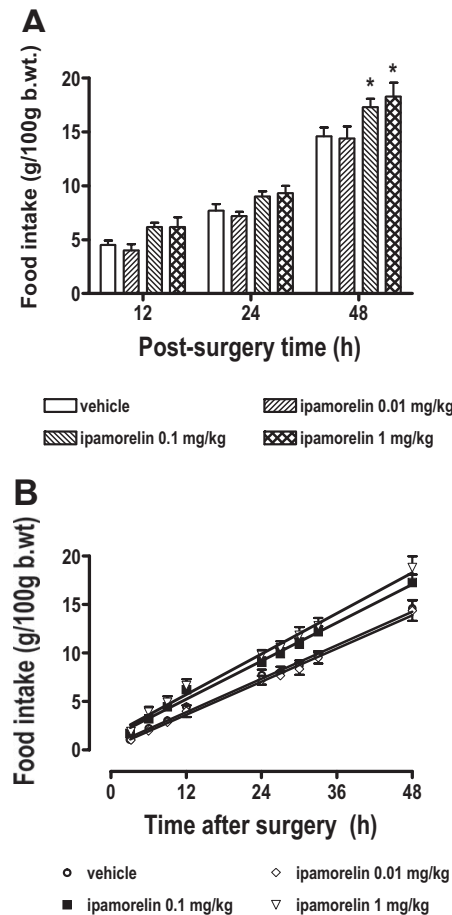


Fig. 6. A, effects of repetitive dosing of ipamorelin (0.01–1 mg/kg) on the cumulative food intake during the 48-h period after surgery. Data are mean $\pm$ S.E.M. from eight to nine rats per group. Significance of the differences was evaluated by two-way ANOVA ($p < 0.05$) and Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons: *, $p < 0.05$ compared with vehicle. B, regression analysis of the individual data for each treatment group demonstrated that food intake increased at a higher rate in the groups treated with 0.1 or 1 mg/kg ipamorelin. Graph points represent mean $\pm$ S.E.M. for each group.

al., 1998), accelerates the recovery of colonic transit and stimulates food intake and body weight gain in rats with POI. The multifactorial effect of ipamorelin, including the increase in fecal pellet output, food intake, and body weight gain, was evident with a repetitive dosing regimen, whereas the effect of a single intravenous infusion was expressed only by the decrease in the time to first bowel movement. In clinical practice, drugs are rarely administered in a single

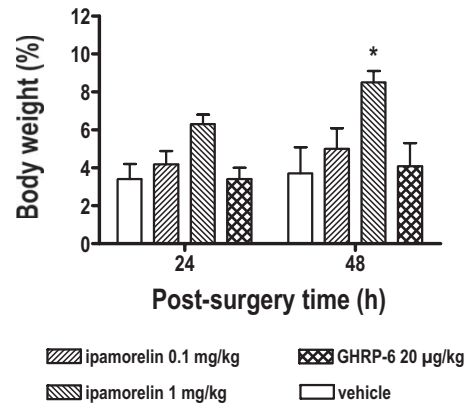


Fig. 7. Repetitive infusions of ipamorelin a dose of 1 mg/kg significantly increased body weight gain measured 48 h after surgery. Data are mean $\pm$ S.E.M. from eight to nine rats per group. Significance of the differences was evaluated by two-way ANOVA ($p < 0.05$) and Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons: *, $p < 0.05$ compared with vehicle.

dose to produce a desired effect; instead, repetitive dosing is used to maintain drug plasma concentrations producing a lasting result. The dosing regimen used in our study was based on the relatively short 2-h half-life of ipamorelin (Gobburu et al., 1999) to ensure that a plasma concentration of ipamorelin was maintained for a duration sufficient to achieve full functional activity.

Ipamorelin is a potent synthetic pentapeptide with distinct and specific growth hormone-releasing properties (Raun et al., 1998; Jiménez-Reina et al., 2002). The potency and efficacy of ipamorelin are similar to GHRP-6 (Raun et al., 1998); however, unlike GHRP-6, ipamorelin does not increase plasma levels of ACTH or cortisol. In vitro, ipamorelin was found to release growth hormone from primary rat pituitary cells, and this effect was antagonized by D-Lys³-GHRP-6, an antagonist of the GRLN receptor. In addition to its action as a growth hormone secretagogue, ipamorelin shows other activities known to occur via agonist of the GRLN receptor. Ipamorelin, administered subcutaneously twice a day in adult female rats, was found to increase the cumulative daily food intake and body weight during the first 72 h of treatment (Lall et al., 2001). This effect was independent from stimulation of growth hormone release and was most probably mediated by GRLN receptors on neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus, which release neuropeptide Y and/or agouti-related peptide regulating food intake and energy homeostasis (Cowley et al., 2003). The effect of ipamorelin seems to be similar to the effect of ghrelin, which was

found to activate hypothalamic neurons and stimulate food intake when injected into the periphery (Nakazato et al., 2001), despite the very low rate at which ghrelin passes the brain-blood barrier (Banks et al., 2002). Because the ability of peripheral ghrelin to stimulate food intake was inhibited by vagotomy, it has been suggested that activation of GRLN receptors on vagal nerve afferents may be important for the orexigenic effect of ipamorelin in rats (Date et al., 2002) and humans (le Roux et al., 2005). With regard to a possible direct interaction of ipamorelin with central GRLN receptors, one can speculate that like endogenous ghrelin, ipamorelin could penetrate the relatively permeable blood-brain barrier at the area postrema and reach GRLN receptors in neighboring structures, such as the arcuate nucleus of the hypothalamus and the nucleus of the tractus solitarius in the brainstem (Inui, 2001).

Another important aspect of the physiological role of endogenous ghrelin is the stimulation of gastric motility that has been documented and studied in detail in humans and rodents (for review, see Peeters, 2006). Ghrelin increases gastric emptying and induces fasted motor activity in fed animals and humans by modulation of vagal afferent signaling (Fujino et al., 2003; Tack et al., 2006; Ariga et al., 2007) and activation of the cholinergic neurons in the enteric nervous system (Edholm et al., 2004; Bassil et al., 2006). The GRLN receptor has been reported to show high levels of expression in the stomach and lower levels in the colon (Dass et al., 2003). Although there are no available data regarding the action of ipamorelin on gastrointestinal motility, we speculate that activation of GRLN receptors on enteric nerves (Dass et al., 2003; Xu et al., 2005) and on vagal afferents (Sakata et al., 2003) may accelerate gastric emptying in rats with POI. Recent studies have shown that a single intravenous infusion of ghrelin (Trudel et al., 2002) or synthetic GRLN receptor agonists, such as RC-1139 (Rejuvenon Corp., Woodlands, TX) (see Poitras et al., 2005) or TZP-101 (Venkova et al., 2007) in rats after surgery, increased gastric emptying, and small intestinal transit.

In our experiments, we found that ipamorelin caused a significant dose-dependent acceleration of colonic transit, shortening the time to the first bowel movement after surgery and significantly increasing cumulative fecal pellet output during the first 48 h. The mechanism(s) underlining the effect of ipamorelin on colonic motility are unknown, but a direct stimulation of colonic motility seems unlikely because in previous studies, ghrelin failed to induce colonic motility in vivo and had no effects on contractility studied in isolated colonic tissue (Trudel et al., 2002; Dass et al., 2003). However, it is possible that ipamorelin, like the centrally acting ghrelin receptor agonist GSK894281, may stimulate colonic transit, defecation, and increase fecal pellet output in rats by entering the central nervous system and activating GRLN receptors in the spinal cord (Shafton et al., 2009). An alternative mechanism by which ipamorelin may accelerate colonic transit could be the acceleration of gastric and small intestinal transit, which, in turn, could promote propagation of fecal matter in the colon. Such a mechanism of action is in agreement with previous research demonstrating that the peripherally restricted synthetic ghrelin receptor agonists TZP-101 could improve colonic transit and fecal output in a rat model of postoperative ileus (Fraser et al., 2009).

Another possible site of ipamorelin action is related to the

potential role of ghrelin in inflammation associated with the stress response to surgery. Abdominal surgery is coupled to elevated levels of proinflammatory cytokines known to suppress GI motility (Kalff et al., 1998; de Jonge et al., 2003) and contribute to anorexia and body weight loss in experimental animals. In the present experiments, ipamorelin treatment of rats with POI improved body weight gain after surgery. Our finding is in agreement with the results of a recent study showing that postoperative ghrelin treatment decreased the production of proinflammatory cytokine interleukin-6 and stabilized the body weight in senescent rats after surgery (Yukawa et al., 2008). However, additional studies specifically designed to investigate the effect of ipamorelin on inflammatory cytokine production are required to confirm its anti-inflammatory action.

Finally, when discussing the mechanism of action of ipamorelin in rats with POI we should consider the possibility that ghrelin receptor agonists may act as ghrelin secretagogues. Using whole-body autoradiography in the rat, Ahnfelt-Rønne et al. (2001) found that radiolabeled ipamorelin accumulates in the glandular part of the stomach, where endogenous ghrelin is synthesized and released. The possibility that ipamorelin exerts a direct action stimulating ghrelin expression in the stomach could not be excluded because administration of ipamorelin enhances the expression of ghrelin into the stomach (Yeung et al., 2006). In conclusion, our study suggests that postoperative treatment with ipamorelin administered via multiple intravenous bolus infusions over a period of 48 h may be useful in the clinic to overcome the symptoms and accelerate the recovery in patients with POI.

Acknowledgments

We thank Kristen Campbell-Dittmeyer for excellent technical assistance.

References

- Ahnfelt-Rønne I, Nowak J, and Olsen UB (2001) Do growth hormone-releasing peptides act as ghrelin secretagogues? *Endocrine* **14**:133–135.
- Ariga H, Tsukamoto K, Chen C, Mantyh C, Pappas TN, and Takahashi T (2007) Endogenous acyl ghrelin is involved in mediating spontaneous phase III-like contractions of the rat stomach. *Neurogastroenterol Motil* **19**:675–680.
- Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, and Heiman ML (2002) Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* **302**:822–827.
- Bassil AK, Dass NB, and Sanger GJ (2006) The prokinetic-like activity of ghrelin in rat isolated stomach is mediated via cholinergic and tachylinergic motor neurones. *Eur J Pharmacol* **544**:146–152.
- Bauer AJ and Boeckxstaens GE (2004) Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil* **16**:54–60.
- Condon RE, Frantzides CT, Cowles VE, Mahoney JL, Schulte WJ, and Sarna SK (1986) Resolution of postoperative ileus in humans. *Ann Surg* **203**:574–581.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, et al. (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**:649–661.
- Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, Morgan M, and Sanger GJ (2003) Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience* **120**:443–453.
- Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, and Nakazato M (2002) The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* **123**:1120–1128.
- Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, Spedding M, Kojima M, and Kangawa K (2005) International Union of Pharmacology: LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev* **57**:541–546.
- de Jonge WJ, van den Wijngaard RM, The FO, ter Beek ML, Bennink RJ, Tytgat GN, Buijs RM, Reitsma PH, van Deventer SJ, and Boeckxstaens GE (2003) Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology* **125**:1137–1147.
- De Winter BY, De Man JG, Seerden TC, Depoortere I, Herman AG, Peeters TL, and Pelckmans PA (2004) Effect of ghrelin and growth hormone-releasing peptide 6 on septic ileus in mice. *Neurogastroenterol Motil* **16**:439–446.

- Edholm T, Levin F, Hellström PM, and Schmidt PT (2004) Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. *Regul Pept* **121**:25–30.
- Fraser GL, Venkova K, Hoveyda HR, Thomas H, and Greenwood-Van Meerveld B (2009) Effect of the ghrelin receptor agonist TZP-101 on colonic transit in a rat model of postoperative ileus. *Eur J Pharmacol* **604**:132–137.
- Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, and Fujimiya M (2003) Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol* **550**:227–240.
- Gobburu JV, Agersø H, Jusko WJ, and Ynddal L (1999) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of ipamorelin, a growth hormone releasing peptide, in human volunteers. *Pharm Res* **16**:1412–1416.
- Greenwood-Van Meerveld B (2007) Emerging drugs for postoperative ileus. *Expert Opin Emerg Drugs* **12**:619–626.
- Hoveyda H, Peterson M, Fraser G, and Ramaseshan M (2006), inventors; Tranzyme Pharma, Inc., assignee. Macrocyclic modulators of the ghrelin receptor. U.S. patent application no. 11/149,731 and PCT International application no. PCT/US2005/020857 (published as WO 2006/009674).
- Inui A (2001) Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* **2**:551–560.
- Jiménez-Reina L, Cañete R, de la Torre MJ, and Bernal G (2002) Influence of chronic treatment with the growth hormone secretagogue Ipamorelin, in young female rats: somatotroph response in vitro. *Histol Histopathol* **17**:707–714.
- Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL, and Bauer AJ (1998) Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in post-surgical ileus. *Ann Surg* **228**:652–663.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, and Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**:656–660.
- Lall S, Tung LY, Ohlsson C, Jansson JO, and Dickson SL (2001) Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun* **280**:132–138.
- Lasseter KC, Shaughnessy L, Cummings D, Pezzullo JC, Wargin W, Gagnon R, Oliva J, and Kosutic G (2008) Ghrelin agonist (TZP-101): safety, pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation in healthy volunteers: a phase I, first-in-human study. *J Clin Pharmacol* **48**:193–202.
- le Roux CW, Neary NM, Halsey TJ, Small CJ, Martinez-Isla AM, Ghatei MA, Theodorou NA, and Bloom SR (2005) Ghrelin does not stimulate food intake in patients with surgical procedures involving vagotomy. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:4521–4524.
- Martínez V, Rivier J, and Taché Y (1999) Peripheral injection of a new corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist, astressin, blocks peripheral CRF- and abdominal surgery-induced delayed gastric emptying in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **290**:629–634.
- Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, and Kangawa K (2000) Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **276**:905–908.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, and Mat-sukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**:194–198.
- Peeters TL (2006) Potential of ghrelin as a therapeutic approach for gastrointestinal motility disorders. *Curr Opin Pharmacol* **6**:553–558.
- Poitras P, Polvino WJ, and Rocheleau B (2005) Gastrokinetic effect of ghrelin analog RC-1139 in the rat. Effect on post-operative and on morphine induced ileus. *Peptides* **26**:1598–1601.
- Raun K, Hansen BS, Johansen NL, Thøgersen H, Madsen K, Ankersen M, and Andersen PH (1998) Ipamorelin, the first selective growth hormone secretagogue. *Eur J Endocrinol* **139**:552–561.
- Sakata I, Yamazaki M, Inoue K, Hayashi Y, Kangawa K, and Sakai T (2003) Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neurosci Lett* **342**:183–186.
- Schwarz NT, Kalff JC, Türler A, Speidel N, Grandis JR, Billiar TR, and Bauer AJ (2004) Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. *Gastroenterology* **126**:159–169.
- Senagore AJ (2007) Pathogenesis and clinical and economic consequences of postoperative ileus. *Am J Health Syst Pharm* **64** (Suppl 13):S3–S7.
- Shafton AD, Sanger GJ, Witherington J, Brown JD, Muir A, Butler S, Abberley L, Shimizu Y, and Furness JB (2009) Oral administration of a centrally acting ghrelin receptor agonist to conscious rats triggers defecation. *Neurogastroenterol Motil* **21**:71–77.
- Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delpoort C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, and Peeters T (2006) Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut* **55**:327–333.
- Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, and Poitras P (2002) Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**:G948–G952.
- Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K, and Nakazato M (2005) Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regul Pept* **126**:11–19.
- Venkova K, Fraser G, Hoveyda HR, and Greenwood-Van Meerveld B (2007) Prokinetic effects of a new ghrelin receptor agonist TZP-101 in a rat model of postoperative ileus. *Dig Dis Sci* **52**:2241–2248.
- Xu L, Depoortere I, Tomasetto C, Zandeck M, Tang M, Timmermans JP, and Peeters TL (2005) Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus. *Regul Pept* **124**:119–125.
- Yeung CM, Chan CB, Woo NY, and Cheng CH (2006) Seabream ghrelin: cDNA cloning, genomic organization and promoter studies. *J Endocrinol* **189**:365–379.
- Yukawa M, Weigle DS, Davis CD, Marck BT, and Wolden-Hanson T (2008) Peripheral ghrelin treatment stabilizes body weights of senescent male Brown Norway rats at baseline and after surgery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**:R1453–R160.

Address correspondence to: Dr. Beverley Greenwood-Van Meerveld, Veterans Administration Medical Center, Research Administration Rm. 151, 921 NE 13th Street, Oklahoma City, OK 73104. E-mail: beverley-greenwood@ouhsc.edu