

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 565**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01) **A61P 25/00** (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) **A61P 25/28** (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01) **A61P 27/02** (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 11/08 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 15/10 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03775859 .6**
96 Fecha de presentación: **21.11.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1571155**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **PÉPTIDOS Y COMPOSICIONES MEDICINALES QUE CONTIENEN LOS MISMOS.**

30 Prioridad:
27.11.2002 JP 2002344523

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
ILS INC.
2-1, KUBOGAOKA 1-CHOME
MORIYA-SHI IBARAKI 302-0104, JP

72 Inventor/es:
ONOUE, Satomi;
ENDO, Kousuke, y
MATSUMOTO, Asami,

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 368 565 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos y composiciones medicinales que contienen los mismos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un derivado peptídico que tiene isomerización inhibida y alta estabilidad durante la producción y almacenamiento de un derivado de PACAP/VIP e *in vivo*.

10 **Antecedentes de la técnica**

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) se denomina un péptido de cerebro-intestinal, que es un tipo de péptido biológicamente activo capaz de acelerar el flujo de sanguíneo y reducir la presión sanguínea. Este VIP se extrae del intestino porcino y está comprendido por 28 restos aminoacídicos (véase, por ejemplo, S. I. Said *et al.*, Science, U.S.A., 1970, vol. 169, pág. 1217). Por el contrario, el polipéptido activador de adenilato ciclase de la hipófisis (PACAP) es un péptido que está comprendido por 38 restos aminoacídicos que se aislaron del hipotálamo de oveja y la estructura de los mismos se determinó basándose en el sistema de bioensayo para activar adenilato ciclase en células de hipófisis cultivadas. Están presentes dos tipos de PACAP, es decir, PACAP38 y PACAP27, (véase, por ejemplo, A. Miyata *et al.*, Biochemical and biophysical research communications, U.S.A. 1989, vol. 164, pág. 567). La estructura de la secuencia de aminoácidos que consiste en 27 restos aminoacídicos del extremo N-terminal de PACAP es muy similar a la de VIP. Puesto que la secuencia de aminoácidos de VIP y la de PACAP son similares a las de secretina, glucagón y similares, se considera que VIP y PACAP son péptidos que pertenecen a la superfamilia de glucagón-secretina. PACAP y VIP muestran sus actividades biológicas mediante receptores de PACAP/VIP. Tales receptores de PACAP/VIP se distribuyen extensamente a lo largo del cuerpo de un organismo y, por lo tanto, se ha indicado que PACAP/VIP tienen una diversidad de actividades biológicas. Los ejemplos de las mismas incluyen un efecto antiasmático (Publicación de patente JP (Kokai) N° 8-333276 A (1996)), un efecto hipotensor (Publicación de patente JP (Kokai) N° 63-179894 A (1988)), un efecto restaurador del cabello (Publicación de patente JP (Kokai) N° 1-83012 A (1989)), un efecto de aliviar la disfunción eréctil masculina (Publicación de patente JP (Kokai) N° 1-19097 A (1989)), un efecto de mejorar la lubricación vaginal (Publicación de patente JP (Kokai) N° 1-501937 (1989)), un efecto de inhibir el movimiento en el tracto gastrointestinal (Publicación de patente JP (Kohyo) N° 6-507415 A (1994)), un efecto de aliviar enfermedades neurodegenerativas, hipoxia y habilidades de memoria reducidas (Publicación de patente JP (Kokai) N° 7-69919 A (1995)), un efecto de tratamiento de úlcera cutánea (Publicación de patente JP (Kokai) N° 8-40926 A (1996)), aceleración de la construcción de red neural (Publicación de patente JP (Kokai) N° 2001-226284 A) y actividad como un agente para aliviar enfermedades conformacionales (Onoue S. *et al.*, FEBS Letters, Holanda, 2002, vol. 522, pág. 65-70). Si se tomaran en consideración tales actividades biológicas, las aplicaciones médicas de PACAP y VIP pueden ser muy amplias. Sin embargo, los péptidos biológicamente activos, tales como PACAP y VIP, son generalmente inestables, se metabolizan inmediatamente particularmente en el cuerpo de un organismo y, por lo tanto, la duración de sus efectos es muy corta. En consecuencia, los presentes inventores crearon un derivado de PACAP/VIP que posee resistencia enzimática como una función nueva (Publicación de patente JP (Kokai) N° 8-333276 A (1996)). Demostraron que el derivado de PACAP/VIP tenía excelente estabilidad frente al metabolismo causado por peptidasa *in vivo* tal como tripsina (Kashimoto K. *et al.*, Peptide Chemistry, 1996, vol. 1997, pág. 249-252) y dicho derivado tuvo efectos significativos de prolongación de los efectos farmacológicos empleando los efectos de dilatación bronquial como un indicador (Yoshihara, S. *et al.*, Peptides, U.S.A., 1998, vol. 19, pág. 593-597; y Yoshihara, S. *et al.*, British Journal of Pharmacology, 1997, vol. 121, pág. 1730-1734). Por lo tanto, el derivado de PACAP/VIP de actuación larga se consideró muy útil para aplicaciones médicas y se consideró que era un probable candidato como un fármaco que se dirige a las diversas actividades biológicas y farmacológicas anteriormente mencionadas. Aunque la estabilidad bioquímica del derivado de PACAP/VIP se confirmó, se descubrió que dicho derivado podría causar problemas graves con respecto a estabilidad farmacéutica, particularmente con respecto a estabilidad a largo plazo en forma de solución. Dicha degradación drástica da lugar a una profunda preocupación sobre la actividad reducida de PACAP/VIP, efectos secundarios inesperados causados por impurezas generadas y similares. Debido a las actividades biológicas farmacológicas de PACAP/VIP, la administración sencilla de los fármacos que comprenden los mismos difícilmente es suficiente y, por lo tanto, sería fácil deducir que tales fármacos deben administrarse de forma continua en situaciones clínicas durante un período largo de tiempo. Por lo tanto, la generación de productos secundarios resultantes de diversos problemas en relación con la estabilidad es particularmente un problema grave.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a proporcionar una composición farmacéutica que comprende un derivado de PACAP/VIP que es altamente estable y es seguro para su uso clínico.

Los presentes inventores han realizado estudios concentrados en relación con los factores que contribuyen a la inestabilidad de PACAP/VIP y un derivado peptídico de los mismos en una solución. Como resultado, descubrieron que se producía isomerización en algunas secuencias y no era preferible el uso clínico de las mismas como un principio activo de una composición farmacéutica. Dicha isomerización es peculiar para aminoácidos ácidos, tales como ácido aspártico o ácido glutámico y sus formas amida, es decir, asparagina y glutamina. Se ha indicado que

los péptidos y proteínas que comprenden tales aminoácidos son propensos a generar como producto secundario succinimida o imida de ácido glutárico en condiciones ácidas o básicas, dependiendo de la estructura de un aminoácido adyacente (Bodanszky, M. *et al.*, *Int J. Pept. Protein. Res.*, 1978, 12, 69; Nobuo Izumiya *et al.*, "Pepuchido Gousei no Kiso a Jikken (Fundamentals and Experiment of Peptide Synthesis)," Maruzen, 71-72). Es más probable que esta reacción secundaria se produzca cuando una cadena lateral de aminoácidos está protegida con bencil éster en comparación con cuando la cadena lateral está libre. El péptido aspartilo es particularmente inestable y puede formar imida en condiciones neutras. Un péptido se vuelve inestable particularmente cuando está presente glicina, serina, treonina o histidina junto a ácido aspártico y asparagina. En el caso de VIP, la secuencia Asn-Ser en las posiciones 24 y 25 es particularmente propensa a causar isomerización. El péptido 4, que es un derivado de VIP resistente a enzima, provoca isomerización similar en la secuencia Asn-Gly en las posiciones 28 y 29 además de la secuencia Asn-Ser en las posiciones 24 y 25. De acuerdo con el informe de Kitada *et al* (*Peptide Chemistry* 1990, 1991, 239-244), VIP y su derivado relevante forman fácilmente succinimida en la secuencia Asp-Asn en las posiciones 8 y 9. En el caso de PACAP, la secuencia Asp-Gly en las posiciones 3 y 4 puede formar succinimida y por lo tanto su estabilidad en una solución es una preocupación grave.

Por lo tanto, los presentes inventores se centraron en estas secuencias y han intentado sustituir estas secuencias con secuencias de aminoácidos más estables para producir un grupo de compuestos que tienen las mismas actividades biológicas que el péptido PACAP/VIP y que tienen estabilidad mejorada.

De acuerdo con el informe anterior por los presentes inventores (Onoue, S. *et al.*, *Biomed. Res.*, 1999, 20, 219-231; Onoue, S. *et al.*, *Peptides*, 2001, 22, 867-872; y Onoue, S. *et al.*, *Pharmacol. Rev. Commun.*, 2002, 12, 1-9), la estructura N-terminal de PACAP/VIP contribuye significativamente a las propiedades de reconocimiento específico de receptor en el momento de unión entre PACAP/VIP y un receptor de PACAP/VIP, que es esencial para mostrar las funciones de los mismos. Basándose en dicho concepto, las posiciones 24 y 25 que constituyen una secuencia de factor de inestabilidad de VIP se sustituyeron con las posiciones 24 y 25 de una secuencia estable de PACAP (i).

Basándose en el hecho de que Asn-28 de VIP no contribuía a la actividad, que se había descubierto por los presentes inventores (Nagano, Y. *et al.*, *Peptide Science* 2001, 2002, 147-150), la posición 28 del péptido 4 (un péptido modificado que tiene contenido de Arg aumentado en comparación con VIP de tipo silvestre) se suprimió para eliminar el riesgo de isomerización provocado en la secuencia Asn-Gly. (ii).

Met-17 de VIP se convierte a sulfóxido de metionina tras metabolismo *in vivo* inmediato o durante su proceso de producción e influye significativamente en las actividades. Por lo tanto, Met-17 se sustituye con Leu o Nle (iii).

Además, los presentes inventores produjeron un compuesto derivado de VIP sustituyendo Asp-8 con Glu o Ala, implicando un menor riesgo de isomerización que Asp. Cuando la posición 8 de VIP se sustituyó con Ala, se indicó que su actividad de unión al receptor mejoraba (Igarashi, H. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002, 37-50). Por lo tanto, se espera estabilización y un alto nivel de actividad del derivado.

Los presentes inventores indicaron que la unidad activa mínima de VIP estaba comprendida por 23 restos (Nagano, Y. *et al.*, *Peptide Science* 2001, 2002, 147-150). Por lo tanto, se espera que la actividad biológica de VIP permanezca en un derivado de VIP que tenga la sustitución de aminoácidos anteriormente mencionada si se conservan al menos 23 restos del extremo N terminal.

Para inhibir la formación de péptido succinilo en las posiciones 3 y 4 de PACAP, la Gly.-4 puede sustituirse con Ala que es el resto aminoacídico en la misma posición de VIP para estabilización (iv). Esta sustitución es eficaz para estabilizar péptidos asociados con PACAP, tales como péptido 3 (PACAP 38), péptido 5 (PACAP30) y péptido 6 (un péptido modificado que tiene contenido de Arg aumentado en comparación con PACAP 38), así como para estabilizar el péptido 2 (PACAP 27).

Ya se sabe que la unidad activa mínima de PACAP está comprendida por 23 restos del extremo N terminal, como es cierto en el caso de VIP (Kitada, C. *et al.*, *Peptide Chemistry* 1990, 1991, 239-244). Por lo tanto, se espera que el grupo de derivados de PACAP, si conservan al menos 23 restos del extremo N terminal, tengan efectos biológicos y farmacológicos de PACAP.

Basándose en dicho punto de vista, los presentes inventores sintetizaron una gran diversidad de péptidos y descubrieron después péptidos que tenían actividades biológicas similares a o mayores que las de VIP y PACAP de tipo silvestre y que tenían alta estabilidad.

Más específicamente, la presente invención proporciona los siguientes (1) a (12).

- (1) Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por fórmula (I) o una sal Farmacéuticamente aceptable del mismo:

His-Ser-Asp-Ala-A-Phe-Thr-B-C-Tyr-D-Arg-E-Arg-F-Gln-G-Ala-Val-H-I-Tyr-

Leu-Ala-Ala-J-K-L (SEC ID N^o: 1) (I)

en la que A representa Val o Ile; B representa Asp, Glu o Ala; C representa Asn o Ser; D representa Thr o Ser; E representa Leu o Tyr; F, H e I representan independientemente cada una Lys o Arg; G representa Leu o nLeu; J representa Ile o Val; K representa Leu-Gly-Lys-Lys, Leu-Gly-Lys-Arg o Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa un resto del grupo carboxilo α del aminoácido C terminal que puede modificarse; es decir, $-\text{NH}_2$ o $-\text{OH}$; a condición de que el péptido no sea un péptido representado por la fórmula (II):

**H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-X₁-Gln-X₂-
Ala-Val-X₃-X₄-Tyr-Leu-X₅-X₆ (II)**

en la que X₁, X₃ y X₄ representan Lys o Arg, respectivamente; X₂ representa Met, Leu o nLeu; X₅ representa un enlace químico, Asn, Asn-Ser, Asn-Ser-Ile, Asn-Ser-Ile-Leu o Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-X₇ (en la que X₇ representa un enlace químico, Gly, Gly-Lys, Gly-Lys-Arg, Gly-Arg o Gly-Arg-Arg); X₆ representa $-\text{OH}$ o NH_2 , siempre que, cuando X₁, X₃ y X₄ son Lys, X₅ es Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-X₇, X₇ es un enlace químico y X₆ es $-\text{NH}_2$, entonces X₂ representa Leu o nLeu.

(2) El péptido de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; C representa Asn; D representa Thr; y E representa Leu.

(3) El péptido de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Ile; C representa Ser; D representa Ser; y E representa Tyr.

(4) El péptido de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; B representa Asp; C representa Asn; D representa Thr; E representa Leu; F, H e I representan cada uno independientemente Arg; G representa Leu; J representa Ile; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-\text{NH}_2$. Específicamente, dicho péptido es equivalente al péptido 12 (SEC ID N°: 13).

(5) El péptido de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; B representa Glu; C representa Asn; D representa Thr; E representa Leu; F, H e I representan cada uno independientemente Arg; G representa Leu; J representa Ile; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-\text{NH}_2$. Específicamente, dicho péptido es equivalente a péptido 21 (SEC ID N°: 22).

(6) El péptido de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; B representa Ala; C representa Asn; D representa Thr; E representa Leu; F, H e I representan cada uno independientemente Arg; G representa Leu; J representa Ile; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-\text{NH}_2$. Específicamente, dicho péptido es equivalente a péptido 23 (SEC ID N°: 24).

(7) El péptido de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; B representa Asp; C representa Asn; D representa Thr; E representa Leu; F, H e I representan cada uno independientemente Arg; G representa Leu; J representa Val; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-\text{NH}_2$. Específicamente, dicho péptido es equivalente al péptido 25 (SEC ID N°: 26).

(8) El péptido de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Ile; B representa Asp; C representa Ser; D representa Ser; E representa Tyr; F, H e I representan cada uno independientemente Arg; G representa Leu; J representa Val; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-\text{NH}_2$. Específicamente, dicho péptido es equivalente al péptido 26 (SEC ID N°: 27).

Los péptidos 10, 12, 21, 23, 25, 26, 29 y 31 son péptidos modificados a los que se han aplicado las modificaciones anteriormente mencionadas (i) a (iv). Además, los aminoácidos en las posiciones 8 de los péptidos 21 y 23 se han alterado a Glu o Ala.

(9) Una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de (1) a (8) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(10) La composición farmacéutica de acuerdo con (9), que comprende el péptido de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (8) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de al menos el 50 % en peso basándose en el péptido biológicamente activo completo como un principio activo.

La expresión "principio activo" se refiere a una sustancia que está contenida en la composición farmacéutica y que tiene efectos de tratar, prevención, alterar o aliviar una enfermedad, síntomas o afecciones de un sujeto. La expresión "péptido biológicamente activo" se refiere a un péptido que tiene actividad biológica en el sujeto. En la presente descripción, tales péptidos incluyen péptido PACAP/VIP, una sal del mismo y un derivado del mismo. Los "péptidos PACAP/VIP" incluyen PACAP o VIP de tipo silvestre de seres humanos y animales, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos similar a la de PACAP o VIP y un péptido que tiene actividad biológica similar a la de PACAP o VIP. Adicionalmente, "péptidos PACAP/VIP" incluyen un péptido que pertenece a la familia de secretina-glucagón.

(11) La composición farmacéutica de acuerdo con (9) o (10) para tratar o prevenir una o más enfermedades o síntomas seleccionados del grupo que consiste en trastornos cerebrovasculares isquémicos incluyendo embolia cerebral y trombosis cerebral, enfermedades que provocan toxicidad para el sistema nervioso periférico o central, isquemia cerebrovascular, trombosis, enfermedades conformacionales, enfermedades neurodegenerativas, alopecia, disfunción eréctil, demencia, insuficiencia renal, enfermedades degenerativas del nervio óptico incluyendo atrofia del nervio óptico y neuropatía óptica isquémica y enfermedades degenerativas retinales, para mejorar el flujo sanguíneo, para relajar el músculo liso bronquial o para inhibir el movimiento en el tracto gastrointestinal.

(12) Uso del péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una o más enfermedades o síntomas seleccionados de trastornos cerebrovasculares isquémicos incluyendo

embolia cerebral y trombosis cerebral, enfermedades que provocan toxicidad para el sistema nervioso periférico o central, isquemia cerebrovascular, trombosis, enfermedades conformacionales, enfermedades neurodegenerativas, alopecia, disfunción eréctil, demencia, insuficiencia renal, enfermedades degenerativas del nervio óptico incluyendo atrofia del nervio óptico y neuropatía óptica isquémica y enfermedades degenerativas retinales, para mejorar el flujo sanguíneo, para relajar el músculo liso bronquial o para inhibir el movimiento en el tracto gastrointestinal.

A continuación, la presente invención se describe en detalle.

Específicamente, el derivado peptídico altamente estable de acuerdo con la presente invención consiste en la secuencia de aminoácidos representada por fórmula (I). Se muestran ejemplos representativos de tales péptidos y péptidos de ejemplo comparativo adicionales en la Tabla 1. Los péptidos 10 a 32 mostrados en ella son equivalentes a las secuencias mostradas en las SEC ID N° 11 a 33 de la lista de secuencias. Los péptidos 10, 22, 24, 31 y 32 son péptidos que corresponden a regiones consistentes en 23 restos del extremo N terminal, los péptidos 13, 28 y 32 tienen cada uno de forma independiente un grupo acetilo unido al grupo amino N terminal y el péptido 14 tiene un grupo estearilo unido a su grupo amino N terminal. El péptido 33 (SEC ID N°: 34) consiste en 23 restos que tienen la misma secuencia de aminoácidos que el péptido 31 (SEC ID N°: 32), excepto que el aminoácido en la posición 4 es glicina.

Tabla 1.

N° de Péptido	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
10 *	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg			NH ₂
11 *	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Lys	Lys	Ile	Leu-Asn	NH ₂
12	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
13	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	De	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
14	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
15	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Arg-Arg	OH
16	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	NLE	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
17 *	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly	NH ₂
18 *	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Lys	NH ₂
19 *	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Arg	NH ₂
20	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Lys-Arg	NH ₂
21	Val	Glu	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
22 *	Val	Glu	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg			NH ₂
23	Val	Ala	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
24 *	Val	Ala	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg			NH ₂
25	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Val	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
26	Ile	Asp	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Arg	Val	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
27	Ile	Asp	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
28	Ile	Asp	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Arg	Val	Leu-Gly-Arg-Arg	NH ₂
29 *	Ile	Asp	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Arg	Val	Arg Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-	NH ₂
30 *	Ile	Asp	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Arg	Ile	Arg Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-	NH ₂
31 *	Ile	Asp	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Arg			NH ₂
32 *	Ile	Asp	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Arg			NH ₂
33 *	Ile	Asp	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Arg			NH ₂

* indica péptido mostrado para fines comparativos

Cuando se usan los péptidos anteriores, una sustancia polar o no polar (por ejemplo, ácido graso o acilo) puede unirse al extremo N terminal de los mismos para alterar la polaridad molecular o un compuesto polimérico tal como polietilenglicol o glucosaminoglucano (ácido hialurónico) puede unirse a los mismos para mejorar la resistencia enzimática. Un péptido tal puede unirse a un soporte liposomal para encapsularse en el liposoma o puede inmovilizarse en la superficie de una membrana lipídica. Un experto en la materia sabe que la introducción de un grupo acilo puede dar como resultado inhibición de la autoagregación así como mejora de la actividad.

Se descubrió que el péptido de acuerdo con la presente invención era muy estable en una solución acuosa tal como agua destilada o un tampón. Cuando el péptido de acuerdo con la presente invención se almacena en una solución a niveles de pH de 6,0 y 7,0 a 40 °C durante 1 semana, por ejemplo, el péptido puede conservarse con una tasa de 70 % o más, preferiblemente 80 % o más y más preferiblemente 85 % o más. Cuando el péptido se almacena en una solución ajustada a niveles de pH de 6,0 y 7,0 a 55 °C durante 3 días, puede conservarse con una tasa de 85 % o más y preferiblemente 90 % o más. En la presente invención, son particularmente preferibles los péptidos 12, 21, 23, 25 y 26.

El péptido usado para el inductor de neuritas de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitado y puede sintetizarse de acuerdo con una técnica convencional de síntesis peptídica. Dicho péptido puede sintetizarse de acuerdo con el método descrito en, por ejemplo, "The Peptides" vol. 1, 1966, Schreder y Luhke, Academic press, Nueva York, Estados Unidos o "Pepuchido Gousei (Peptide Síntesis)", "Izumiya *et al.*, Maruzen, 1975. Más específicamente, la síntesis peptídica puede llevarse a cabo mediante una diversidad de técnicas, tales como el método de azida, el método de cloruro ácido, el método de anhídrido ácido, el método de anhídrido mixto, el método de DCC, los métodos de éster activo (por ejemplo, el método de p-nitrofenil éster, método de imida éster N-hidroxisuccínico o el método de cianometil éster), el método que implica el uso del reactivo de Woodward K, el método de carboimidazol, el método de reducción-oxidación y el método aditivo de DCC (HONB, HOBT o HOSu). Estas técnicas pueden aplicarse a síntesis de fase sólida y síntesis de fase líquida.

En la presente invención, la síntesis peptídica se lleva a cabo de acuerdo con técnicas generalizadas para síntesis polipeptídica como se ha mencionado anteriormente. Por ejemplo, la síntesis peptídica se lleva a cabo mediante lo que se denomina un método por etapas en el que los aminoácidos se fusionan secuencialmente al resto aminoácido terminal uno por uno. Como alternativa, los aminoácidos se dividen en varios fragmentos y los fragmentos se acoplan entre sí.

Un ejemplo específico de un método para síntesis peptídica de fase sólida por etapas es el método de Merrifield, R. B. (Solid phase peptide synthesis, J. Amer. Chem. Soc., 85, 2149-2159, 1963), y puede llevarse a cabo de la siguiente manera. El aminoácido C-terminal (un grupo amino protegido) se une primero a una resina insoluble mediante su grupo carboxilo y el grupo protector amino de aminoácido C-terminal se retira después. Posteriormente, se fusiona secuencialmente un grupo carboxilo reactivo de un aminoácido protegido con grupo amino con el grupo amino reactivo libre resultante de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del péptido diana. Por lo tanto, se sintetiza una secuencia total de una manera por etapas y el péptido se separa después de resina insoluble.

Cualquier resina insoluble puede emplearse para la síntesis peptídica en fase sólida, siempre que pueda unirse a un grupo carboxilo reactivo. Los ejemplos de la misma incluyen resina de benzhidrilamina (BHA), resina de clorometilo, resina de oximetilo, resina de aminometilo, resina de metilbenzhidrilamina (MBHA), 4-aminometilfenoximetilo, resina de 4-hidroximetilfenoximetilo y resina de 4-oximetilfenilacetamidometilo.

Cuando se usa un grupo de 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) como un grupo protector α -amino, por ejemplo, es preferible el uso de resina de 4-hidroximetilfenoximetilo, de la que puede eliminarse un péptido con la ayuda de ácido trifluoroacético (TFA). Cuando se usa un grupo de t-butoxicarbonilo (Boc), por ejemplo, es preferible el uso de resina de 4-oximetilfenilacetamidometilo (PAM), de la que puede eliminarse un péptido con la ayuda de fluoruro de hidrógeno. La cantidad de péptido es preferiblemente 0,5 mmoles o menor por gramo de resina.

El método descrito anteriormente requiere enlace de un grupo protector con un grupo amino implicado en el enlace peptídico de aminoácidos, eliminación de grupo protector y activación de un grupo carboxilo implicado en el enlace peptídico de los aminoácidos.

Los ejemplos de grupos protectores amino incluyen grupos tales como benciloxicarbonilo (Z), t-butoxicarbonilo (Boc), t-amiloxicarbonilo (Aoc), isoborniloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, 2-cloro-benciloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftaloilo, formilo, o-nitrofenilsulfenilo y difenilfosfinotioilo.

Los grupos funcionales de cadena lateral de aminoácidos, tales como His, Tyr, Thr, Lys, Asp, Arg y Ser están preferiblemente protegidos. Puede protegerse un grupo funcional de acuerdo con una técnica convencional en la que un grupo protector habitual enumerado a continuación se une al grupo funcional. Después de la compleción de la reacción, el grupo protector se elimina.

Los ejemplos de grupos protectores imino de His incluyen grupos benciloximetilo (Bom), p-toluenosulfonilo (Tos), bencilo (Bzl), benciloxicarbonilo (Z) y tritilo.

El grupo hidroxilo de Ser y Thr puede protegerse mediante, por ejemplo, esterificación o eterificación, aunque dicha protección no es esencial. Los ejemplos de grupos que son adecuados para esterificación incluyen grupos de alcanilo inferior tales como acetilo, grupos de aroilo tales como benzoilo y grupos derivados de ácidos carbónicos tales como benzoiloxicarbonilo y etiloxicarbonilo. Los ejemplos de grupos que son adecuados para eterificación incluyen grupos bencilo (Bzl), tetrahidropiranoilo y terc-butilo.

Los ejemplos de grupos protectores para grupos hidroxilo de Tyr incluyen grupos bencilo (Bzl), bromobenciloxicarbonilo (Br-Z), diclorobencilo (Cl₂-Bzl), benciloxicarbonilo (Z), acetilo y p-toluenosulfonilo (Tos).

Los ejemplos de grupos protectores para grupos amino de Lys incluyen grupos benciloxicarbonilo (Z), clorobenciloxicarbonilo (Cl-Z), diclorobencilo (Cl₂-Bzl), t-butoxicarbonilo (Boc) y p-toluenosulfonilo (Tos).

Los ejemplos de grupos protectores para grupos guanidino de Arg incluyen grupos de p-toluenosulfonilo (Tos), nitro,

benciloxicarbonilo (Z) y t-amiloxicarbonilo (Aoc).

Un grupo carboxilo de Asp está protegido mediante, por ejemplo, esterificación con la ayuda de alcohol bencílico, metanol, etanol, terc-butanol y ciclohexilo (cHex).

Los ejemplos de grupos protectores para otros aminoácidos, tales como grupo indolilo de Trp, incluyen formilo, carbobenzoxilo, 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo y 2,2,2-tricloroetiloxicarbonilo, aunque dicha protección no es esencial.

Un método para proteger un grupo tiometilo de Met incluye preparar previamente un metil sulfóxido y después reducirlo, aunque dicho método no es esencial.

Por el contrario, un grupo carboxilo puede activarse de acuerdo con una técnica convencional y pueden seleccionarse de forma adecuada reactivos conocidos y similares para activación. Por ejemplo, puede activarse un grupo carboxilo permitiendo que el grupo carboxilo reaccione con una diversidad de reactivos para formar cloruro ácido relevante, anhídrido ácido o anhídrido mixto, azida, o ésteres activos (por ejemplo, ésteres con pentaclorofenol, p-nitrofenol, imida de ácido N-hidroxisuccínico, N-hidroxibenzotriazol o N-hidroxi-5-norbomen-2,3-dicarboxiimida).

Cualquier disolvente que puede usarse para formación de enlace peptídico puede usarse para reacción de condensación (formación de enlace peptídico) entre un grupo amino reactivo y un grupo carboxilo reactivo en la síntesis de fase sólida. Por ejemplo, dimetilformamida anhídrida o hidratada (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), piridina, cloroformo, dioxano, diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), etil acetato, N-metil pirrolidona o triamida hexametilfosfórica (HMPA) pueden usarse solos o en combinaciones de dos o más.

La reacción de condensación anteriormente mencionada puede llevarse a cabo en presencia de un agente de condensación, tal como reactivos de carbodiimida tales como diciclohexilcarboxiimida (DCC) o carbodiimidazol, tetraetil pirofosfato y benzotriazol-N-hidroxi-tris-dimetilamino-fosfonio hexafluorofosfato (un reactivo de Bop).

El péptido sintetizado puede someterse a desalación y purificación de acuerdo con técnicas habituales. Los ejemplos de técnicas habituales incluyen cromatografía de cambio iónico en celulosa-DEAE, cromatografía de partición en Sephadex LH-20 o Sephadex G-25, cromatografía de fase normal en gel de sílice, cromatografía de fase inversa en gel de sílice-ODS y cromatografía líquida de alto rendimiento.

El péptido purificado de esta forma puede convertirse a una forma de sal farmacológicamente aceptable, tal como acetato, clorhidrato o fosfato, usando diversos tipos de ácidos de acuerdo con la necesidad.

El péptido o una sal del mismo se prepara como una composición farmacéutica en forma de líquido, inyección, comprimido, polvo, gránulo, supositorio, comprimido revestido de forma entérica, gota nasal, formulación de inhalación, formulación bucal, cápsula, colirio, pomada, formulación percutánea, agente de liberación prolongada y otro sistema de suministro de fármaco usando un disolvente, excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas convencionales para producir preparaciones farmacéuticas.

El péptido de acuerdo con la presente invención o una sal del mismo tiene actividad biológica que es la misma que la de PACAP/VIP conocido y puede usarse de la misma manera. El péptido y una sal del mismo son capaces de inducir formación de neuritas y por lo tanto son útiles como inductores de neuritas. Tales agentes son particularmente eficaces para prevenir y tratar diversas enfermedades que implican degeneración de neuronas, tales como demencia de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, muerte de neuronas, neuroblastoma o amnesia. Además, el péptido y una sal del mismo son eficaces para la defensa contra fármacos que son peligrosos para el sistema nervioso. Además, también son útiles como un agente antiasmático, debido al efecto del péptido en la dilatación de los bronquios y como un inhibidor del movimiento peristáltico gástrico durante la endoscopia. Como en el caso de PACAP/VIP, una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con la presente invención o una sal del mismo también puede usarse para tratar o prevenir una o más enfermedades o síntomas seleccionados del grupo que consiste en trastornos cerebrovasculares isquémicos incluyendo embolia cerebral y trombosis cerebral, déficits de nervio periférico o craneal resultantes de los trastornos isquémicos anteriormente mencionados u otras fuentes, enfermedades conformacionales, enfermedades neurodegenerativas, alopecia, disfunción eréctil, demencia, insuficiencia renal, enfermedades degenerativas del nervio óptico incluyendo atrofia del nervio óptico y neuropatía óptica isquémica y enfermedades degenerativas retinales. Tal composición farmacéutica también puede usarse para mejorar el flujo sanguíneo, para relajar el músculo liso bronquial o para inhibir el movimiento en el tracto gastrointestinal, aunque las aplicaciones de la misma no se limitan a estas. Debería observarse que los presentes inventores ya han descubierto que el péptido PACAP/VIP es capaz de proteger los nervios contra una proteína específica que podría dar como resultado enfermedad conformacional (Solicitud de Patente Japonesa N° 2001-386699).

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse de forma segura a mamíferos tales como seres humanos, ratones, ratas, conejos, perros o gatos por vía parenteral o vía oral o

mediante un sistema de suministro de fármaco tal como gotas nasales, un inhalante, un agente de liberación prolongada, colirio, una pomada, una formación percutánea o una formulación bucal, de acuerdo con la necesidad. La vía adecuada de administración, forma de dosificación, frecuencia de dosificación y otras condiciones pueden determinarse por un especialista tal como un médico, de acuerdo con el tipo de enfermedad, los efectos esperados y las condiciones generales del paciente. Los ejemplos de dispositivos para administración incluyen, pero sin limitación, gotas nasales, tales como Jetlizer, Puvlizer y un insuflador nasal, e inhalantes, tales como Spinhaler, E-haler, FlowCaps, Jethaler, Diskhaler, Rotahaler, Turbuhaler, Easyhaler, Accuhaler, Clickhaler, Inspir-Ease e Inhalation Aid. La dosis de la composición farmacéutica puede cambiarse adecuadamente de acuerdo con la forma de dosificación, la vía de administración, condiciones y otros factores. Cuando la composición se administra a mamíferos incluyendo seres humanos, por ejemplo, el péptido se administra a un paciente en cantidades de aproximadamente 1 pg a 1 mg por kilogramo de peso corporal por día. En tal caso, el péptido de acuerdo con la presente invención o un sal del mismo constituye el 50 % en peso o más, preferiblemente 80 % en peso o más y más preferiblemente 95 % en peso o más del péptido biológicamente activo como un principio activo de la composición. Esto indica que la cantidad de péptido biológicamente activo que no está representado por fórmula I en la composición es de 50 % en peso o menos, preferiblemente 20 % en peso o menos y particularmente preferiblemente 5 % o menos.

La presente descripción incluye parte o todos los contenidos como se desvela en la descripción y/o dibujos de la Solicitud de Patente Japonesa N° 2002-344523, que es un documento de prioridades de la presente solicitud.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es una cromatografía que muestra el péptido 4 (I) y la muestra (II), que se prepara disolviendo el péptido 4 en un tampón fosfato a pH 7,0 (concentración: 300 µg/ml) y permitiendo que la solución se mantenga en una incubadora a 55 °C durante 24 horas.

La Figura 2 muestra el contenido helicoidal en las estructuras de mayor orden de los péptidos 1, 7 y 8 calculado basándose en el método para análisis de estructuras de mayor orden.

La Figura 3 muestra las relaciones relativas de los péptidos 7 y 8 para inhibir la constricción de músculos lisos gástricos murinos en relación con el péptido 1 (VIP de tipo silvestre).

La Figura 4 (A) muestra el efecto relajante del péptido 12 en los bronquios, la Figura 4 (B) muestra el del péptido 21 y la Figura 4 (C) muestra el del péptido 23.

La Figura 5 muestra los efectos de inducir formación de neuritas del control (una muestra de ensayo en la que no hay adición de péptidos), péptido 1 (VIP de tipo silvestre), péptido 4, péptido 12, péptido 21 y péptido 23.

La Figura 6 muestra los efectos de péptidos 4, 12, 21 y 23 para proteger nervios contra priones anómalos (Prp 106-126), en los que “##” representa una diferencia significativa de una muestra de ensayo en ausencia de péptido (P < 0,01) y “***” representa una diferencia significativa del péptido 1 (P < 0,01).

Realizaciones Preferidas de la Invención

La presente invención se describe en lo sucesivo en mayor detalle en referencia a los ejemplos, aunque el alcance técnico de la presente invención no está limitado a los mismos.

[Ejemplo 1] Síntesis peptídica

El péptido 12 que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N°: 13 se produjo de acuerdo con una técnica convencional de síntesis peptídica en fase sólida.

La resina de MBHA-HCl (un copolímero de poliestireno-divinilbenceno (1 %), malla de 100 a 200) se añadió a un recipiente de reacción de síntesis manual (hecho de vidrio; φ 6,0 x 29,5), la resina se lavó con metanol en cantidades de 2 a 3 veces la de la misma en agitación y se permitió después que la resina lavada se hinchara mediante lavado con diclorometano (en cantidades de 2 a 3 veces las de la resina) en agitación. Se llevó a cabo neutralización en trietilamina/diclorometano 10 %, Boc-Arg (Tos)-OH correspondiente al aminoácido C-terminal se usó en cantidades equivalentes a aproximadamente 2 veces la de la resina y se añadieron dicitohexilcarbodiimida y N-hidroxibenzotriazol para realizar reacción de condensación. Después de que la reacción se hubiera llevado a cabo durante aproximadamente 2 horas (en agitación), la resina se lavó con metanol y diclorometano, se confirmó la desaparición de un grupo amino a por el ensayo de Kaiser y se llevó a cabo después la desprotección tratando la resina con ácido trifluoroacético/diclorometano 50 % durante 30 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo la neutralización en trietilamina/diclorometano 10 %, se realizó un lavado de nuevo con metanol y con diclorometano y se llevó a cabo el ensayo de Kaiser para confirmar la desprotección. Después de la confirmación, se repitió el mismo procedimiento para acoplamiento de Boc-Arg (Tos)-OH localizado en la segunda posición del extremo C-terminal. A continuación, Boc-Gly-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Tyr (Cl₂-Bzl)-OH, Boc-Arg (Tos)-OH, Boc-Arg (Tos)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gln (Xan)-OH, Boc-Arg (Tos)-OH, Boc-Arg (Tos)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Arg (Tos)-OH, Boc-Thr (Bzl)-OH, Boc-Tyr (Cl₂-Bzl)-OH, Boc-Asn (Xan)-OH, Boc-Asp (OchHex)-OH, Boc-Thr (Bzl)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Val-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Asp (OchHex)-OH, Boc-Ser (Bzl)-OH y Boc-His (Bom)-OH se sometieron secuencialmente a acoplamiento y desprotección en ese orden para obtener un péptido protegido correspondiente al péptido 12: His (Bom)-Ser (Bzl)-Asp (OchHex)-

Ala-Val-Phe-Thr (Bzl)-Asp (OchHex)-Asn-Tyr (Cl₂-Bzl)-Thr (Bzl)-Arg (Tos)-Leu-Arg (Tos)-Arg (Tos)-Gln-Leu-Ala-Val-Arg (Tos)- Arg (Tos)-Tyr (Cl₂-Bzl)-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-MBHA. Se añadió fluoruro de hidrógeno anhídrido a la resina de MBHA-péptido protegido y se permitió que reaccionaran entre sí en presencia de etanoditiol y anisol. Después de la reacción, se retiró el fluoruro de hidrógeno anhídrido por destilación con la presión reducida, el resto se lavó con éter y se añadió ácido acético 10 % al mismo para extraer péptidos. El extracto se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa y se liofilizó para obtener el péptido 12.

Los siguientes péptidos 1 a 33 se sintetizaron químicamente de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

10 Péptido 1 (SEC ID N°: 2):

**His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys
-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂**

15 Péptido 2 (SEC ID N°: 3):

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-

Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂

Péptido 3 (SEC ID N°: 4):

**His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-
Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH₂**

20

Péptido 4 (SEC ID N°: 5):

**His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-
Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Gly-Arg-Arg-NH₂**

25

Péptido 5 (SEC ID N°: 6):

**His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-
Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂**

30 Péptido 6 (SEC ID N°: 7):

**His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-
Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Arg-NH₂**

35 Péptido 7 (SEC ID N°: 8):

**His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys
-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-NH₂**

Péptido 8 (SEC ID N°: 9):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-NH₂

5 Péptido 9 (SEC ID N°: 10):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Leu-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-NH₂

10 Péptido 10 (SEC ID N°: 11):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-NH₂

Péptido 11 (SEC ID N°: 12):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Leu-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Asn-NH₂

15

Péptido 12 (SEC ID N°: 13):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂

20

Péptido 13 (SEC ID N°: 14):

Acetyl-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂

25 Péptido 14 (SEC ID N°: 15):

Stearyl-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂

30 Péptido 15 (SEC ID N°: 16):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-OH

Péptido 16 (SEC ID N°: 17):

**His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Nle-Ala-Val-Arg
-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂**

Péptido 17 (SEC ID N°: 18):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-NH₂

5

Péptido 18 (SEC ID N°: 19):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Lys-NH₂

10

Péptido 19 (SEC ID N°: 20):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-NH₂

15

Péptido 20 (SEC ID N°: 21):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Lys-Arg-NH₂

20

Péptido 21 (SEC ID N°: 22):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Glu-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂

Péptido 22 (SEC ID N°: 23):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Glu-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-NH₂

25

Péptido 23 (SEC ID N°: 24):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Ala-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂

30

Péptido 24 (SEC ID N°: 25):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Ala-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-NH₂

Péptido 25 (SEC ID N°: 26):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂

5

Péptido 26 (SEC ID N°: 27):

His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂

10

Péptido 27 (SEC ID N°: 28):

His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂

15

Péptido 28 (SEC ID N°: 29):

Acetyl-His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg-NH₂

20

Péptido 29 (SEC ID N°: 30):

His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Arg-NH₂

25

Péptido 30 (SEC ID N°: 31):

His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Arg-NH₂

30

Péptido 31 (SEC ID N°: 32):

His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-

Arg-Tyr-Leu-NH₂

Péptido 32 (SEC ID N°: 33):

Acetyl-His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-NH₂

Péptido 33 (SEC ID N°: 34):

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-NH₂

5

[Ejemplo 2] Estabilidad del péptido 4

10 El péptido 4, un péptido modificado, que tiene un mayor contenido de Arg que VIP de tipo silvestre se pesó y se fraccionó a aproximadamente 1 mg, las fracciones se disolvieron en agua destilada ajustada a niveles de pH de 4,0, 5,0, 6,0 y 7,0 (Agua Destilada Otsuka) y la concentración final se ajustó a 10 µg/ml. Se permitió que las soluciones resultantes permanecieran en un incubador a 40 °C (LH20-11M, Nagano Kagaku) durante 24 horas, se llevó a cabo análisis mediante HPLC de fase inversa (longitud de onda: 220 nm; fase móvil: acetonitrilo 28 %/ácido trifluoroacético 0.1 %; columna: ODS-120T (Tosoh); temperatura de columna: 25 °C), y la cantidad de péptido 4 restante se examinó. Como se muestra en la Tabla 2, la degradación peptídica fue significativa alrededor de la región de pH neutro.

15

Tabla 2

pH	Cantidad de péptido restante
4,0	91 %
5,0	90 %
6,0	93 %
7,0	84 %

20 [Ejemplo 3] Análisis de aminoácidos y LC-MS de péptido mutante 4

25 El péptido 4 se disolvió en un tampón de fosfato (pH: 7,0; concentración 300 µg/ml) y se permitió que permaneciera en una incubadora a 55 °C durante 24 horas. Se obtuvo una cromatografía como se muestra en la Figura 1 (II). La Figura 1 (I) es un gráfico que muestra el péptido 4 (el control). Los mutantes A y B se fraccionaron por HPLC y después se sometieron a análisis de aminoácidos. Los resultados de análisis de aminoácidos de los mutantes estuvieron en sustancialmente los mismos niveles que los valores teóricos para el péptido 4, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Aminoácido	Péptido 4 (Valor teórico)	Mutante A	Mutante B	Mutante C
Asx	5	5,04	5,06	5,00
Thr	2	2,02	2,02	2,02
Ser	2	1,92	1,84	2,01
Glx	1	1,20	1,11	1,24
Gly	1	1,13	1,04	1,15
Ala	2	2,00	2,00	2,00
Val	2	2,01	1,94	2,07
Ile	1	0,97	0,97	0,96
Leu	4	4,14	4,17	4,09
Tyr	2	2,00	2,09	1,97
Phe	1	1,02	1,00	1,01
His	1	1,35	1,11	1,40
Arg	7	6,98	6,94	6,91

30

Los resultados sugieren que la secuencia de aminoácidos de los mutantes fueron muy similares a las del péptido 4 y solamente los aminoácidos ácidos Asx y Glx pueden diferir del mismo.

35 Además, los pesos moleculares de estos mutantes se midieron mediante LC-MS y se obtuvieron los resultados como se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Muestra de ensayo	Peso molecular predicho
Péptido 4	3761
Mutante A	3762
Mutante B	3762
Mutante C	3762

Los resultados mostrados en la Tabla 4 demuestran que los pesos moleculares de todos los mutantes aumentaron desde el del péptido 4 en 1. Esto sugiere que Asn se alteró para convertirse en Asp o Gln se alteró para convertirse en Glu si los resultados del análisis de aminoácidos se tomaran en consideración. Basándose en la secuencia de aminoácidos de péptido 4, se dedujo que se formó succinimida en la región que contiene Asn, se retiró un resto amino junto con ella y por lo tanto el peso molecular se aumento en 1. En consecuencia, se confirmó que se produjo transpeptidación α -w en la secuencia Asn-Ser en las posiciones 24 y 25 o la secuencia Asn-Gly en las posiciones 28 y 29 en el péptido 4.

[Ejemplo 4] Estructura del péptido 7 y péptido 8

Se disolvieron VIP (péptido 1, SEC ID N°: 2), péptido 7 (SEC ID N°: 8) correspondiente a 25 restos en el extremo N-terminal de VIP y péptido 8 (SEC ID N°: 9) que es un derivado del péptido 7 con su metionina-17 oxidada, en un tampón de Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) y se examinaron los espectros de dicroísmo circular de los mismos usando el Jasco J-720 (Jasco Corporation). De acuerdo con el cálculo analítico de la estructura de mayor orden por Greenfield *et al.*, el contenido helicoidal de péptido 1 fue de aproximadamente 50 % (Figura 2). Aunque se sugirió que el péptido 7 conservaría una gran cantidad de dicha estructura de mayor orden, el contenido helicoidal del péptido 8 con metionina oxidada se redujo a aproximadamente la mitad del péptido 1, lo que indica un cambio estructural notable.

[Ejemplo 5] Actividad farmacológica de péptido 7 y péptido 8

Se criaron preliminarmente ratones ICR macho de 9 semanas de edad durante una semana y después se usaron durante el periodo en el que tenían una edad de 10 a 18 semanas. Después de someter a los ratones a dislocación espinal cervical, se realizó una operación abdominal inmediatamente después para resección gástrica total y los interiores de los estómagos se lavaron exhaustivamente con solución salina fisiológica para preparar las muestras de ensayo. Las muestras de ensayo terminadas se suspendieron en un tanque Magnus (volumen: 20 ml; temperatura: 37 °C; carga: 2,0 g; aireación con O₂ 95 % y CO₂ 5 %; Riken Kaihatsu). Como una solución fisiológica, se usó solución Modificada de Tampón Krebs-Henseleit (Sigma). La reacción se registró en el registrador R-64M (Rika Denki) mediante un aplicador RMP-6004 (Nihon Kohden Corporation). En el experimento, se instalaron las muestras de ensayo en el aparato Magnus y se añadieron 100 μ l de solución de carbacol (concentración: 6 x 10⁻³ M) a las mismas después de que se hubiera estabilizado la línea basal. Se añadió una solución de muestra de péptido purificado 10 minutos después y se observaron los efectos relajantes en las muestras de ensayo. El efecto del péptido 1 (VIP de tipo silvestre) frente a constricción inducida por carbacol se determinó que era el 100 % y se determinó la inhibición máxima de la constricción de músculo liso cuando se añadida péptido 7 y péptido 8. La Figura 3 muestra relativamente la inhibición máxima de constricción de músculo liso gástrico murino a la concentración final de 10⁻⁶ M de los péptidos 1, 7 y 8. La actividad del péptido 8 se atenuó significativamente en comparación con la del péptido 7, lo que indica la fuerte influencia de la oxidación del resto de metionina. Se descubrió que dicha actividad atenuada se correlacionaba profundamente con el contenido helicoidal de los compuestos, basándose en el Ejemplo 4. Más específicamente, la oxidación del resto de metionina en VIP/PACAP induce cambios en estructuras de mayor orden a un nivel molecular e influye significativamente en la actividad.

[Ejemplo 6] Estabilidad del péptido 12

Se fraccionó una cantidad adecuada de péptido 12 mediante pesado, se disolvió en agua destilada (1 mg/ml, agua destilada Otsuka) y se ajustó a niveles de pH de 6,0 y 7,0 con la ayuda de NaOH 0,1 N. Además, el péptido 12 se diluyó a 10 μ g/ml y después se permitió que permaneciera en un incubador a 40 °C durante 24 horas. A continuación, se llevó a cabo análisis de HPLC de fase inversa (longitud de onda: 220 nm; fase móvil: acetonitrilo (29 %)/ácido trifluoroacético (0,1 %); columna: ODS-120T (Tosoh); temperatura de columna: 25 °C) para examinar la cantidad de péptido 12 restante. Como resultado, no se observó generación significativa de un pico no identificado en ninguna de las muestras de ensayo a un nivel de pH 6,0 ó 7,0. Esto sugiere que el péptido 12 era estable.

[Ejemplo 7] Estabilidad de péptidos 4, 12, 21 y 23

Se fraccionaron cantidades adecuadas de los péptidos 4, 12, 21 y 23 mediante pesado y después se disolvieron en agua destilada (agua destilada Otsuka) ajustada a niveles de pH de 6,0 y 7,0 para llevar la concentración final a 10 μ g/ml. Se permitió que las soluciones resultantes se mantuvieran en un incubador a 55 °C (FC-610, Advantec) durante 3 días y se llevó a cabo análisis de HPLC de fase inversa (longitud de onda: 220 nm; fase móvil: acetonitrilo (29,5 %)/ácido trifluoroacético (0,1 %); columna: ODS-120T (Tosoh); temperatura de columna: 25 °C) para examinar

las cantidades de los péptidos 4, 12, 21 y 23 restantes. Como se muestra en la Tabla 5, la estabilidad de los péptidos 12, 21 y 23 mejoró significativamente en comparación con la del péptido 4. Esto resultó particularmente evidente a pH 7,0.

5

Tabla 5

Muestra de Ensayo	PH 6,0	PH 7,0
Péptido 4	81 %	67 %
Péptido 12	94 %	100 %
Péptido 21	93 %	100 %
Péptido 23	100 %	100 %

[Ejemplo 8] Estabilidad de los péptidos 4, 12, 21 y 23

Se fraccionaron cantidades adecuadas de los péptidos 4, 12, 21 y 23 mediante pesado y después se disolvieron en agua destilada (agua destilada Otsuka) ajustada al nivel de pH de 7,0 para llevar la concentración final a 100 µg/ml. Se permitió que las soluciones resultantes se mantuvieran en un incubador a 55 °C (FC-610, Advantec) durante 0, 10, 20 y 30 días, respectivamente y se llevó a cabo análisis de HPLC de fase inversa (longitud de onda: 220 nm; fase móvil: acetonitrilo (29,5 %)/ácido trifluoroacético (0,1 %); columna: ODS-120T (Tosoh); temperatura de columna: 25 °C) para examinar la cantidad de péptidos 4, 12, 21 y 23 restantes. Como se muestra en la Tabla 6, el péptido 4 desapareció completamente después de almacenamiento durante 10 días; sin embargo, los péptidos 12, 21 y 23 aún permanecían 30 días después. Esto indica que la estabilidad de los mismos había mejorado significativamente.

10

15

Tabla 6

Muestra de Ensayo	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
Péptido 4	100 %	0 %	0 %	0 %
Péptido 12	100 %	49 %	34 %	18 %
Péptido 21	100 %	29 %	45 %	10 %
Péptido 23	100 %	62 %	42 %	30 %

20

[Ejemplo 9] Estabilidad de los péptidos 4, 12, 21 y 23

Se fraccionaron cantidades adecuadas de los péptidos 4, 12, 21 y 23 mediante pesado y después se disolvieron en tampones de fosfato (solución acuosa de dihidrógeno fosfato sódico 0,001 %) ajustados a niveles de pH de 6,0 y 7,0 para llevar la concentración final a 100 µg/ml. Se permitió que las soluciones resultantes se mantuvieran en un termo-higrostat (LH-20-11, Nagano Kagaku) a 40 °C y RH al 75 % durante una semana y se llevó a cabo análisis de HPLC de fase inversa (longitud de onda: 220 nm; fase móvil: acetonitrilo (29,5 %)/ácido trifluoroacético (0,1 %); columna: ODS-120T (Tosoh); temperatura de columna: 25 °C) para examinar las cantidades de los péptidos 4, 12, 21 y 23 restantes. Como se muestra en la Tabla 7, la estabilidad de los péptidos 12, 21 y 23 mejoró significativamente en comparación con la del péptido 4.

25

30

Tabla 7

Muestra de Ensayo	PH 6,0	PH 7,0
Péptido 4	53 %	35 %
Péptido 12	100 %	90 %
Péptido 21	100 %	87 %
Péptido 23	100 %	100 %

[Ejemplo 10] Estabilidad de los péptidos 4, 12, 21 y 23

35

Se fraccionaron cantidades adecuadas de péptidos 4, 12, 21 y 23 y se disolvieron después en tampón fosfato (una solución acuosa de dihidrógeno fosfato sódico 0,001 %) ajustado al nivel de pH de 7,0 para llevar la concentración final a 100 µg/ml. Se permitió que las soluciones resultantes se mantuvieran en un termo-higrostat (LH-20-11, Nagano Kagaku) a 40 °C y RH a 75 % durante 0, 10, 20 y 30 días y se llevó a cabo análisis de HPLC de fase inversa (longitud de onda: 220 nm; fase móvil: acetonitrilo (29,5 %)/ácido trifluoroacético (0,1 %); columna: ODS-120T (Tosoh); temperatura de columna: 25 °C) para examinar las cantidades de los péptidos 4, 12, 21 y 23 restantes. Como se muestra en la Tabla 8, la estabilidad de los péptidos 12, 21 y 23 se mejoró significativamente en comparación con la del péptido 4. Además, el péptido 4 desapareció 30 días después; sin embargo, los péptidos 12, 21 y 23 aún permanecían.

40

45

Tabla 8

Muestra de Ensayo	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
Péptido 4	100 %	28 %	13 %	0 %
Péptido 12	100 %	84 %	86 %	73 %
Péptido 21	100 %	100 %	76 %	59 %
Péptido 23	100 %	98 %	89 %	73 %

[Ejemplo 11] Efecto inhibitor en el movimiento peristáltico gástrico

5 Se examinaron los efectos inhibitorios de los péptidos 9, 10 y 33 en los movimientos peristálticos gástricos de la misma manera que en el Ejemplo 5. Se emplearon ratones ICR macho de 9 semanas de edad. Después de someter a los ratones a dislocación espinal cervical, se realizó una operación abdominal inmediatamente después para resección gástrica total y los interiores de los estómagos se lavaron exhaustivamente con solución salina fisiológica para preparar las muestras de ensayo. Las muestras de ensayo terminadas se suspendieron en un tanque Magnus (volumen: 20 ml; temperatura: 37 °C; carga: 2,0 g; aireación con O₂ 95 % y CO₂ 5 %; Riken Kaihatsu). Como una solución fisiológica, se usó una solución modificada de tampón Krebs-Henseleit (Sigma). La reacción se registró en el registrador R-64 M (Rika Denki) mediante un amplificador RMP-6004 (Nihon Kohden Corporation). En el experimento, se instalaron muestras de ensayo en el aparato Magnus y se añadió una solución de Carbacol (3 x 10⁻⁶ M) a las mismas después de haberse estabilizado la línea basal. Cuando se estabilizó la constricción, se añadieron los péptidos de ensayo (10⁻⁶ M) y se observaron los efectos relajantes en las muestras de ensayo. Se determinó que el grado de constricción antes de la adición de Carbacol era del 0 %, se determinó que el de después de la estabilización tras la adición del mismo era el 100 % y el nivel de inhibición de constricción gástrica se determinó cuando se añadieron las soluciones de muestra. La Tabla 9 muestra el nivel de cada sustancia para inhibir la constricción 15 minutos después de la administración de fármaco. La Tabla 9 muestra el nivel de cada sustancia (péptidos 10 y 33) para inhibir la constricción siempre que el nivel de péptido 9, que era el fármaco control, era 100.

Tabla 9

Sustancia	Nivel de inhibición de constricción
Péptido 9	100
Péptido 10	227
Péptido 33	160

[Ejemplo 12] Efecto relajante en músculo liso bronquial

25 Se examinó si los péptidos 12, 21 y 23 eran capaces o no de constreñir temporalmente el músculo liso bronquial dilatado de la manera descrita a continuación.

30 Se sacrificaron cobayas macho Hartley de 7 semanas de edad (440 g, Japan SLC) mediante hemorragia de la arteria femoral con anestesia y se abrieron los tórax de los mismos para extirpar las tráqueas. Se retiraron los tejidos grasos y similares adheridos a las tráqueas tan completamente como fue posible, se cortaron los tejidos retirados a lo largo de los cartílagos a una anchura que abarcaba 4 ó 5 cartílagos y los cartílagos localizados en frente del esófago se cortaron longitudinalmente para preparar secciones. Las secciones obtenidas del esófago superior, medio e inferior se emplearon como muestras de ensayo. Las muestras de ensayo se suspendieron en un tanque Magnus (volumen: 20 ml; temperatura: 37 °C; carga: 0,5 g; aireación con O₂ 95 % y CO₂ 5 %). Como una solución fisiológica, se usó solución modificada de tampón de Krebs-Henseleit (Sigma). La reacción se registró en el registrador R-64 M (Rika Denki) mediante un amplificador RMP-6004 (Nihon Kohden Corporation) usando un transductor isométrico (TB-611T, Nihon Kohden Corporation). Después de estabilizarse la constricción inducida por Carbacol (3 x 10⁻⁷ M), se realizó administración acumulativa de péptido 12 (10⁻⁹ M a 3 x 10⁻⁶ M) y se realizaron administraciones sencillas de péptido 21 y de péptido 23 (3 x 10⁻⁶ M). Después de la medición, se administró isoproterenol (10⁻⁶ M), el valor obtenido en este momento se determinó que era "100 % de relajación" y el grado de relajación para cada sustancia de ensayo se determinó basándose en el mismo. Esto demuestra que los péptidos 12, 21 y 23 tenían un efecto dependiente de adición de péptidos aparente de relajar la tráquea como se muestra en la Figura 4.

[Ejemplo 13] Efecto de inducir formación de neuritas

50 El efecto de los péptidos 1, 4, 12, 21 y 23 para inducir formación de neuritas se ensayó de la manera descrita a continuación. Se cultivaron células PC-12 en medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero de caballo 5 % y suero de ternero fetal 5 % en presencia de CO₂ 5 % y aire 95 % a 37 °C. Las células se separaron del matraz de cultivo con la ayuda de tripsina, se contaron usando un citómetro y después la concentración se ajustó a 1,0 x 10⁴ células/ml. Se añadió el medio líquido que contenía células a una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno de tipo IV Biocoat en cantidades de 1 ml cada uno y después se cultivó en presencia de CO₂ 5 % y aire 95 % a 37 °C durante 24 horas. El medio se reemplazó 24 horas después y se añadieron los péptidos (100 nM) en ese momento. El resultante se cultivó continuamente durante 3 días y después se fotografió. La Figura 5 muestra las fotografías. La escala en cada fotografía representa 100 µm. Como se muestra

en las fotografías, los péptidos 4, 12, 21 y 23 indujeron significativamente formación de neuritas en comparación con el caso de control (una muestra de ensayo sin péptido) y péptido 1 (VIP de tipo silvestre).

[Ejemplo 14] Efecto neuroprotector

Ya se ha verificado que un prión normal se transforma a un prión anómalo mediante conversión conformacional (J. Neurochem, 2000, vol. 75, pág. 2536-2545). Por lo tanto, la muerte celular causada por plegamiento anómalo de la proteína priónica (106-126) se examinó usando células PC12 derivadas de feocromocitoma de rata, que se usan como un modelo para investigar el cerebro y el sistema nervioso. Las células PC12 se cultivaron en medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero de caballo al 5 % y suero de ternero fetal al 5 % en presencia de CO₂ 5 % y aire 95 % a 37 °C. Las células PC12 se separaron del matraz de cultivo con ayuda de tripsina y después se cultivaron en una placa de cultivo de 96 pocillos (10⁴ células/pocillo). Se añadieron priones (106-126, 50 µM, American Peptide Company Inc.) y neuropéptidos 10⁻⁷ M (péptidos 1, 4, 12, 21 y 23) a las células PC12 cultivadas, se calcularon las cuentas de células viables por ensayo de WST-8 y se cuantificó el grado de efecto neuroprotector contra priones anómalos (PrP 106-126). Los resultados se muestran en la Figura 6. Las cuentas de células viables del péptido 1 (VIP de tipo silvestre) fueron significativamente mayores que las de muestras de ensayo que no contenían péptido (##, P < 0,01) y el péptido 1 mostró efectos neuroprotectores significativos. Además, los efectos neuroprotectores de los péptidos 4, 12, 21 y 23 fueron significativamente mayores que los del péptido 1 (**, P < 0,01).

[Ejemplo 15] Producción de formulación para fabricar formulación de inhalación y gotas nasales

La formulación para fabricar formulación de inhalación y gotas nasales se produjo básicamente de acuerdo con el método para producir formulaciones en polvo descrita en la Publicación de patente Japonesa (Kokai) N° 2003-34652.

Condiciones para molienda

Equipamiento usado:	Molino de chorro A-O (Chongjin Enterprise Co., Ltd.)
Medio para suministrar materiales:	Alimentador automático
Presión de aire de suministro:	6,0 kg/cm ² G
Presión de aire de molienda:	6,5 kg/cm ² G
Recogida de polvo:	Bolsa de recogida

En el método descrito anteriormente, los péptidos 4, 12, 21 y 23 se diluyeron con lactosa o eritritol. Se mezclaron vehículos de eritritol (diámetro de partícula medio de 70 µm) o vehículos de lactosa (diámetro de partícula medio de 50 µm) con los mismos usando una bolsa no electrificada en una relación de producto finamente molido: vehículo de 0,4:1.

[Ejemplo 16] Producción de colirio

Neuropéptido	10 mg
Acido bórico	700 mg
Borato sódico	Cantidad adecuada
Cloruro sódico	500 mg
Hidroximetilcelulosa	0,5 mg
Edetato sódico	0,005 mg
	pH 7,0
Agua purificada esterilizada	Equilibrio (100 ml en total)

Se calentó agua purificada esterilizada (80 ml) a aproximadamente 80 °C, se añadió hidroximetilcelulosa a la misma, la mezcla resultante se agitó y la temperatura del líquido se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron neuropéptido, cloruro sódico, ácido bórico, edetato sódico y cloruro de benzalconio y se disolvieron en el líquido anterior. Se añadió una cantidad adecuada de borato sódico para llevar el nivel de pH a 7,0. La cantidad total de la solución se ajustó de forma precisa a 100 ml con la adición de agua purificada esterilizada.

Los péptidos 4, 12, 21 y 23 se emplearon como neuropéptidos.

[Ejemplo 17] Producción de preparación de inyección

Neuropéptido	10 mg
Cloruro sódico	900 mg
Hidróxido sódico 1N	cantidad adecuada
Agua destilada para inyección	equilibrio (100 ml en total)

Estos ingredientes se mezclaron de forma aséptica de acuerdo con una técnica convencional para preparar preparaciones de inyección. Los péptidos 4, 12, 21 y 23 se emplearon como neuropéptidos.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en este documento se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

5 Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar un derivado de PACAP/VIP que puede almacenarse durante un largo período de tiempo y puede evitar efectos secundarios inesperados resultantes de la generación de productos secundarios.

10

Texto libre de lista de secuencias

- SEC ID N°: 1: péptido sintético
SEC ID N°: 2: péptido sintético
15 SEC ID N°: 3: péptido sintético
SEC ID N°: 4: péptido sintético
SEC ID N°: 5: péptido sintético
SEC ID N°: 6: péptido sintético
SEC ID N°: 7: péptido sintético
20 SEC ID N°: 8: péptido sintético
SEC ID N°: 9: péptido sintético
SEC ID N°: 10: péptido sintético
SEC ID N°: 11: péptido sintético
SEC ID N°: 12: péptido sintético
25 SEC ID N°: 13: péptido sintético
SEC ID N°: 14: péptido sintético
SEC ID N°: 15: péptido sintético
SEC ID N°: 16: péptido sintético
SEC ID N°: 17: péptido sintético
30 SEC ID N°: 18: péptido sintético
SEC ID N°: 19: péptido sintético
SEC ID N°: 20: péptido sintético
SEC ID N°: 21: péptido sintético
SEC ID N°: 22: péptido sintético
35 SEC ID N°: 23: péptido sintético
SEC ID N°: 24: péptido sintético
SEC ID N°: 25: péptido sintético
SEC ID N°: 26: péptido sintético
SEC ID N°: 27: péptido sintético
40 SEC ID N°: 28: péptido sintético
SEC ID N°: 29: péptido sintético
SEC ID N°: 30: péptido sintético
SEC ID N°: 31: péptido sintético
SEC ID N°: 32: péptido sintético
45 SEC ID N°: 33: péptido sintético
SEC ID N°: 34: péptido sintético

LISTA DE SECUENCIAS

50 <110> ITOHAM FOODS INC.

<120> Un péptido y una composición farmacéutica que contiene el péptido

55 <130> PH-1938-PCT

<150> JP2002/344523

<151> 27-11-2002

60 <160> 34

<170> PatentIn Ver. 2. 0

<210> 1

<211> 27

65 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)
<223> Xaa = Val o Ile
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)
<223> Xaa = Asp, Glu o Ala
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)
<223> Xaa = Asn o Ser
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)
<223> Xaa = Thr o Ser
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)
<223> Xaa = Leu o Tyr
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (15)
<223> Xaa = Lys o Arg
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (17)
<223> Xaa = Leu o nLeu
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (20)
<223> Xaa = Lys o Arg
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (21)
<223> Xaa = Lys o Arg
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (26)
<223> Xaa = Ile o Val
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (27)
<223> Xaa= Leu, Leu-Asn, Leu-Gly , Leu-Gly-Lys, Leu-Gly-Arg , Leu-Gly-Lys-Lys , Leu-Gly-Lys-Arg , Leu-Gly-Arg-Arg, Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys o Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Arg
- 60 <400> 1

ES 2 368 565 T3

His Ser Asp Ala Xaa Phe Thr Xaa Xaa Tyr Xaa Arg Xaa Arg Xaa Gln

1

5

10

15

Xaa Ala Val Xaa Xaa Tyr Leu Ala Ala Xaa Xaa

20

25

<210> 2

<211> 28

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)

<223> AMIDACIÓN

15

<400> 2

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1

5

10

15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20

25

20 <210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<220>

<221> MOD_RES

30 <222> (27)

<223> AMIDACIÓN

<400> 3

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu

20 25

5 <210> 4
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (38)
<223> AMIDACIÓN

<400> 4

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys

20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys

35

20 <210> 5
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (31)
<223> AMIDACIÓN

<400> 5

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Gly Arg Arg

20 25 30

5 <210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 6

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg

20 25 30

20 <210> 7
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (38)
<223> AMIDACIÓN

<400> 7

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr Arg

20 25 30

Gln Arg Val Arg Asn Arg

35

- 5 <210> 8
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (25)
- <223> AMIDACIÓN
- 15 <400> 8

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser

20 25

- 20 <210> 9
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético
- <220>
- 30 <221> MOD_RES
- <222> (17)
- <223> OXIDACIÓN
- <220>
- 35 <221> MOD_RES
- <222> (25)
- <223> AMIDACIÓN
- <400> 9

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser

20 25

5 <210> 10
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (23)
<223> AMIDACIÓN

<400> 10

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu

20

20
25 <210> 11
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (23)
<223> AMIDACIÓN

35 <400> 11

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu
20

- 5 <210> 12
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (28)
- <223> AMIDACIÓN

- 15 <400> 12

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Asn
20 25

- 20 <210> 13
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 25 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

- <220>
- <221> MOD_RES
- 30 <222> (30)
- <223> AMIDACIÓN

- <400> 13

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg Arg
20 25 30

5 <210> 14
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> ACETILACIÓN

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 14

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg Arg
20 25 30

25 <210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

35 <220>
<221> LÍPIDO
<222> (1)
<223> ESTEARATO

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 15

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg Arg
 20 25 30

5

<210> 16
 <211> 30

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

15 <400> 16

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg Arg
 20 25 30

<210> 17
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

25

<220>
 <221> SITIO
 <222> (17)
 <223> Nle

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)
 <223> AMIDACIÓN

35

<400> 17

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
1 5 10 15

Xaa Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg Arg
20 25 30

- 5 <210> 18
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (28)
- 15 <223> AMIDACIÓN
- <400> 18

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly
20 25

- 20 <210> 19
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético
- <220>
- 30 <221> MOD_RES
- <222> (29)
- <223> AMIDACIÓN
- 35 <400> 19

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Lys

20 25

5 <210> 20
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)
<223> AMIDACIÓN

15 <400> 20

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg

20 25

20 <210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 21

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Lys Arg

20 25 30

- 5 <210> 22
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

- 15 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (30)
- <223> AMIDACIÓN

- <400> 22

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Glu Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg Arg

20 25 30

- 20 <210> 23
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 25 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

- 30 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (23)
- <223> AMIDACIÓN

- <400> 23

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Glu Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu

20

5 <210> 24
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 24

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Ala Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg Arg

20

25

30

20 <210> 25
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (23)
<223> AMIDACIÓN

<400> 25

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Ala Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu
20

5 <210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 26

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg
20 25 30

20 <210> 27
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 27

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg
 20 25 30

5 <210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)
 <223> AMIDACIÓN

15 <400> 28

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg Arg
 20 25 30

20 <210> 29
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> ACETILACIÓN

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 29

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg

20 25 30

5 <210> 30
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (38)
<223> AMIDACIÓN

<400> 30

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr Arg

20 25 30

Gln Arg Val Arg Asn Arg

35

20 <210> 31
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (38)
<223> AMIDACIÓN

<400> 31

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Gly Arg Arg Tyr Arg

20 25 30

Gln Arg Val Arg Asn Arg

35

- 5 <210> 32
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (23)
- <223> AMIDACIÓN

- 15 <400> 32

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu

20

- 20 <210> 33
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 25 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

- <220>
- <221> MOD_RES
- 30 <222> (1)
- <223> ACETILACIÓN

- <220>
- <221> MOD_RES
- 35 <222> (23)
- <223> AMIDACIÓN

- <400> 33

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu
20

- 5 <210> 34
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (23)
- 15 <223> AMIDACIÓN
- <400> 34

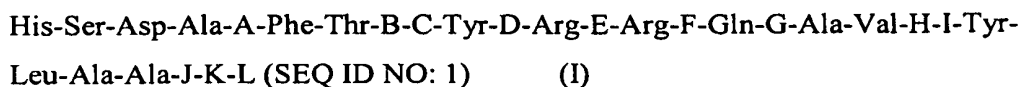
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu
20

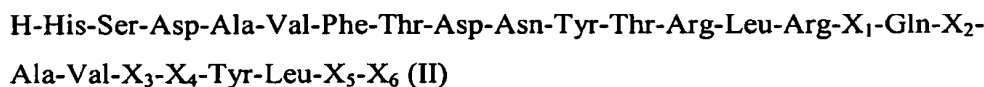
20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma:



10 en la que A representa Val o Ile; B representa Asp, Glu o Ala; C representa Asn o Ser; D representa Thr o Ser; E representa Leu o Tyr; F, H e I representan cada uno de forma independiente Lys o Arg; G representa Leu o nLeu; J representa Ile o Val; K representa Leu-Gly-Lys-Lys, Leu-Gly-Lys-Arg o Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa un resto del grupo carboxilo α del aminoácido C terminal que puede modificarse; es decir, $-NH_2$ o $-OH$; a condición de que el péptido no sea un péptido representado por la fórmula (II):



20 en la que X_1 , X_3 y X_4 representan Lys o Arg, respectivamente; X_2 representa Met, Leu o nLeu; X_5 representa un enlace químico, Asn, Asn-Ser, Asn-Ser-Ile, Asn-Ser-Ile-Leu o Asn-Ser-Ile-Leu-Asn- X_7 (en la que X_7 representa un enlace químico, Gly, Gly-Lys, Gly-Lys-Arg, Gly-Arg o Gly-Arg-Arg); X_6 representa $-OH$ o $-NH_2$, siempre que, cuando X_1 , X_3 y X_4 son Lys, X_5 es Asn-Ser-Ile-Leu-Asn- X_7 , X_7 es un enlace químico y X_6 es $-NH_2$, entonces X_2 representa Leu o nLeu.

25 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; C representa Asn; D representa Thr; y E representa Leu.

30 3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Ile; C representa Ser; D representa Ser; y E representa Tyr.

35 4. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; B representa Asp; C representa Asn; D representa Thr; E representa Leu; F, H e I representan cada uno de forma independiente Arg; G representa Leu; J representa Ile; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-NH_2$.

40 5. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; B representa Glu; C representa Asn; D representa Thr; E representa Leu; F, H e I representan cada uno de forma independiente Arg; G representa Leu; J representa Ile; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-NH_2$.

45 6. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; B representa Ala; C representa Asn; D representa Thr; E representa Leu; F, H e I representan cada uno de forma independiente Arg; G representa Leu; J representa Ile; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-NH_2$.

50 7. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Val; B representa Asp; C representa Asn; D representa Thr; E representa Leu; F, H e I representan cada uno de forma independiente Arg; G representa Leu; J representa Val; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-NH_2$.

55 8. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que, en fórmula (I), A representa Ile; B representa Asp; C representa Ser; D representa Ser; E representa Tyr; F, H e I representan cada uno de forma independiente Arg; G representa Leu; J representa Val; K representa Leu-Gly-Arg-Arg; y L representa $-NH_2$.

60 9. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de al menos 50 % en peso basándose en el péptido biológicamente activo completo como un ingrediente activo.

11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10 para el uso en el tratamiento de una o más enfermedades o síntomas seleccionados de trastornos cerebrovasculares isquémicos incluyendo embolia cerebral y

5 trombosis cerebral, enfermedades que provocan toxicidad para el sistema nervioso central o periférico, enfermedades conformacionales, enfermedades neurodegenerativas, alopecia, disfunción eréctil, demencia, insuficiencia renal, enfermedades degenerativas del nervio óptico incluyendo atrofia del nervio óptico y neuropatía óptica isquémica y enfermedades degenerativas retinales, para mejorar el flujo sanguíneo, para relajar el músculo liso bronquial o para inhibir el movimiento en el tracto gastrointestinal.

10 12. Uso del péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una o más enfermedades o síntomas seleccionados de trastornos cerebrovasculares isquémicos incluyendo embolia cerebral y trombosis cerebral, enfermedades que provocan toxicidad para el sistema nervioso central o periférico, isquemia cerebral, trombosis, enfermedades conformacionales, enfermedades neurodegenerativas, alopecia, disfunción eréctil, demencia, insuficiencia renal, enfermedades degenerativas del nervio óptico incluyendo atrofia del nervio óptico y neuropatía óptica isquémica y enfermedades degenerativas retinales, para mejorar el flujo sanguíneo, para relajar el músculo liso bronquial o para inhibir el movimiento en el tracto gastrointestinal.

15

Fig. 1

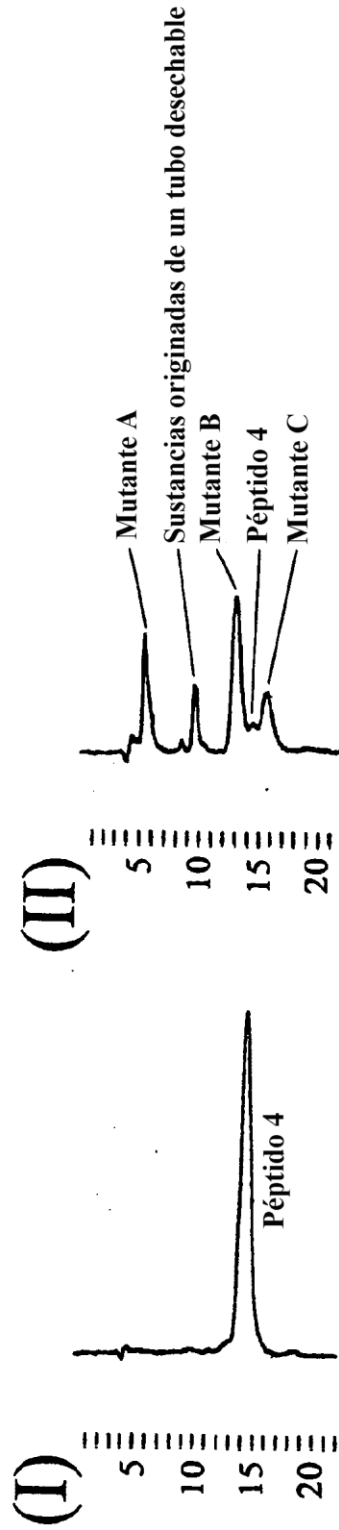


Fig. 2

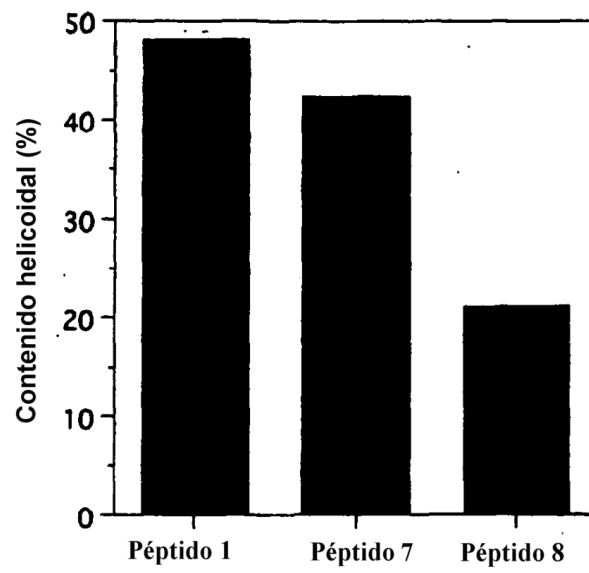


Fig. 3

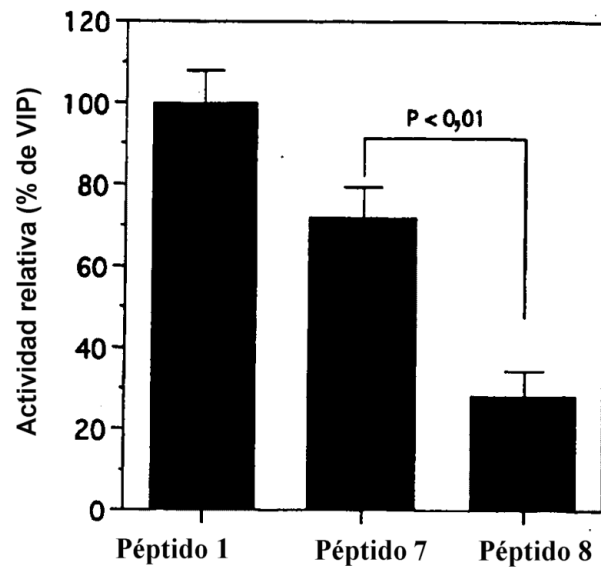


Fig. 4

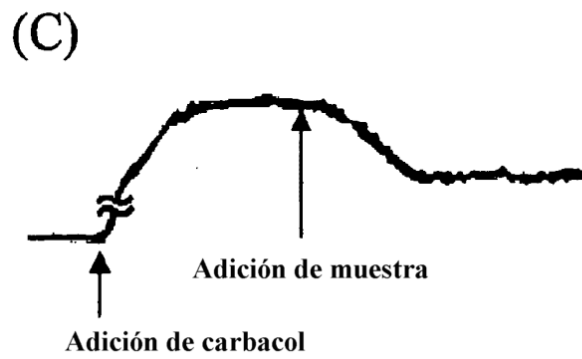
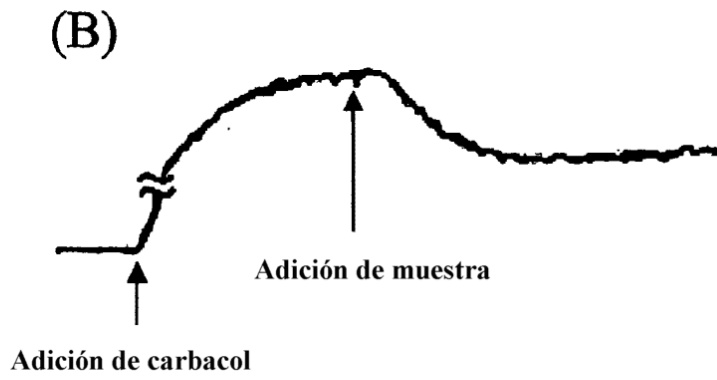
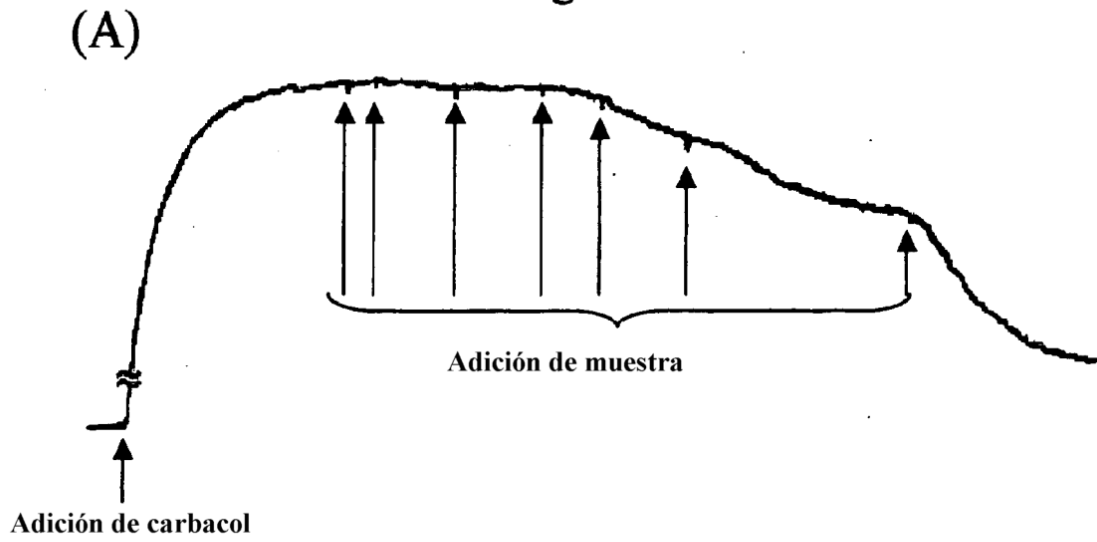


Fig. 5

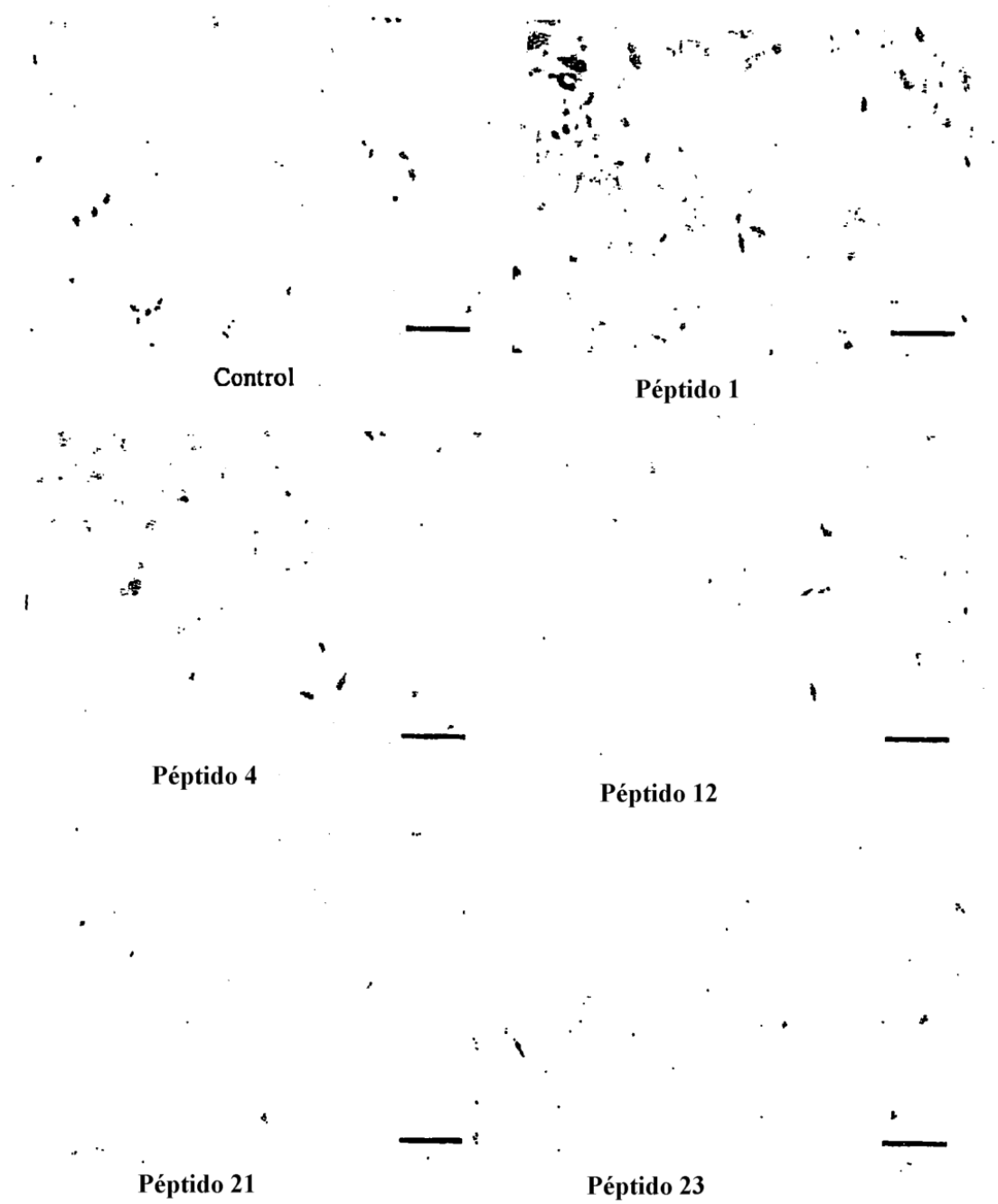


Fig. 6

