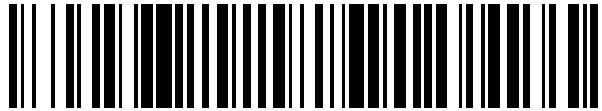


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 081**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/10** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**A61K 38/30** (2006.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 9/70** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**C07K 14/65** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2002 E 02786015 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1462455**

54 Título: **Péptido Ser-Ser-Ser-Arg y sus utilizaciones medicinales**

30 Prioridad:

**03.12.2001 JP 2001368103**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.09.2013**

73 Titular/es:

**SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)**  
**9-19, Shimoshinjo 3-chome Higashiyodogawa-ku**  
**Osaka-shi Osaka 533-8651, JP y**  
**NISHIDA, TERUO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NISHIDA, TERUO;**  
**INUI, MAKOTO y**  
**NAKAMURA, M.**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 422 081 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

Péptido Ser-Ser-Ser-Arg y sus utilizaciones medicinales

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo péptido, formado por la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg, y a un agente terapéutico de los trastornos corneales, o a un agente que promueve la cicatrización de las heridas cutáneas, que incluyen como principios activos un péptido formado por la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg y un péptido formado por la secuencia aminoácida representada por Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>.

**Antecedentes de la invención**

15 La córnea es un tejido transparente, avascular que posee un diámetro de 1 cm aproximadamente y un grosor de 1 mm aproximadamente. La transparencia de la córnea afecta a su función visual. En la córnea, varios fenómenos fisiológicos y bioquímicos trabajan funcionalmente, principalmente en el mantenimiento de su transparencia.

20 Los defectos epiteliales corneales provocados por diversas patologías tales como úlceras corneales, erosiones corneales, queratitis y sequedad ocular, son reparados espontáneamente a menos que se asocie mezclada con una infección. Cuando la reparación se retrasa o no se completa, o el defecto epitelial se prolonga por alguna razón, sin embargo, no sólo resulta muy afectada la construcción normal del epitelio corneal, sino que también se dañan incluso las construcciones y funciones del estroma corneal y del endotelio. El principio de los procedimientos terapéuticos según la técnica convencional es pasivo. Es decir, los procedimientos terapéuticos incluyen la protección de la superficie corneal de la estimulación externa, con la intención de que el epitelio corneal se amplíe espontáneamente para volver a recubrir el área afectada. Siguiendo el desarrollo de la biología celular en años recientes, se han dilucidado los factores implicados en la proliferación, migración, adhesión, extensión y similares. Se ha informado de que los compuestos que promueven la extensión del epitelio corneal, ejerzan funciones importantes en la reparación de los defectos epiteliales corneales (Japanese Journal of Clinical Ophthalmology, 46, 738-743 (1992); Japanese Journal of Ophthalmology Surgery, 5, 719-727 (1992)).

Mientras, el factor de crecimiento de tipo insulínico constituye uno de los factores de crecimiento que regula el desarrollo de células humanas normales, tales como los factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento derivados de las plaquetas, y factores transformantes de crecimiento, que incluye el factor-I de tipo insulínico de crecimiento (al que se hace referencia como "IGF-I" a continuación en la presente memoria), y el factor-II de tipo insulínico de crecimiento (al que se hace referencia como "IGF-II" a continuación en la presente memoria). Recientemente, por ejemplo, se ha informado de que IGF-I, estimula la proliferación de las células tiroideas (J. Biol. Chem. 264, 18485-18488 (1989)) y que IGF-II regula el crecimiento muscular y la diferenciación (Hum. Mol. Genet., 3, 1117-1121 (1994)). En el campo de la oftalmología, se dio a conocer que IGF-I, IGF-II y sus derivados funcionales promueven la supervivencia de las neuronas retinianas (publicación de la patente japonesa 7-500839 (Tokuhyo)); que IGF-II resulta muy efectivo para el tratamiento de todos los tipos de heridas, incluyendo principalmente las lesiones producidas durante la queratoplastia (publicación del documento JP-A-63-233925); y que una solución que contiene los factores de crecimiento puede utilizarse para mantener los tejidos oculares como la córnea que van a utilizarse para la queratoplastia en su estado recién preparado, incluso en circunstancias que supongan temperaturas bajas (publicaciones de los documentos JP-A-5-25001 y JP-A-6-48901). Además, se llevó a cabo otra divulgación sobre una composición de gel que contiene un factor de crecimiento, respecto a que la composición de gel es generalmente efectiva para la cicatrización de la herida de, por ejemplo, el segmento anterior del ojo (publicación del documento JP-A-2-112).

50 Por otra parte, la sustancia P es un polipéptido formado por 11 aminoácidos y provoca acciones tales como vasodilatación, contracción del músculo liso, promueve la secreción de las glándulas salivales, y diuresis. En el ámbito oftalmológico, se da a conocer que la sustancia P puede mejorar la secreción anormal de las células caliciformes de la conjuntiva (publicación Internacional WO95/13087), mientras que también se informa de la cinética de la sustancia P en el caso de inflamación tal como queratitis (Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 91, 982-987 (1987); Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 92, 448-452 (1988); y similares). Tal como se describe anteriormente, se han llevado a cabo varios estudios. Además, la publicación de JP-A-10-17489 da a conocer que el tetrapéptido Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (al que se hace referencia como "FGLM" a continuación en la presente memoria) en el extremo C de la sustancia P, cuando se utiliza combinadamente con IGF-I, puede promover la cicatrización de las heridas del epitelio corneal y que el FGLM constituye la unidad mínima entre los péptidos parciales con dicha acción de sustancia P. Sin embargo, todavía no se ha identificado nunca qué sitio de la secuencia aminoácida en IGF-1 es responsable de la expresión del efecto, ya que IGF-1 es un polipéptido formado por tantos aminoácidos como 70.

65 Las heridas cutáneas son aquellas de los tejidos superficiales, que incluyen un desgarro, una abrasión, una incisión quirúrgica, una úlcera dérmica o una quemadura. Dichas heridas cutáneas se tratan aplicando un tratamiento de urgencia a un sitio herido y esperando que las heridas cicatricen espontáneamente mediante el potencial biológico de recuperación por sí mismo. Dicha curación espontánea necesita de un largo tiempo hasta que se produce la

recuperación, persistiendo todo ese tiempo el dolor. Por tanto, es preferible que la cicatrización de las heridas se promueva activamente, administrando un agente para la cicatrización de las heridas en los lugares en que éstas se encuentren.

5 A causa de que, mediante la migración celular y el crecimiento durante la cicatrización de las heridas, se forman nuevos tejidos epiteliales y conjuntivos, un agente farmacéutico que promueva o estimule la migración celular, la diferenciación y el crecimiento, que participe en la cicatrización de las heridas, es posiblemente un agente para la cicatrización de las heridas. Es conocido que dichos agentes para la cicatrización de las heridas pueden ser el cloruro de lisozima y el solcoserilo.

10 Sin embargo, los agentes existentes para la cicatrización de las heridas, no muestran acciones suficientes para promover ésta, por lo tanto son problemáticas en el sentido de que, en un corto período de tiempo, no curan las heridas completamente. Se considera que la causa se debe a la escasa contribución de estos agentes a la curación de las heridas, a, por ejemplo, el recubrimiento de la epidermis, la síntesis del colágeno, la mejora de la circulación periférica, la granulación y la angiogénesis, que constituyen importantes elementos durante la curación de las heridas.

15 No existe información sobre la mínima unidad para exhibir la actividad en IGF-1, y tampoco, acerca del péptido *per se* de la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg. Además, tampoco existe información con respecto a la acción de una administración conjunta de un péptido formado por la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg y un péptido formado por la secuencia aminoácida representada por Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, para las alteraciones de la córnea, o su acción en las patologías dérmicas.

20 Generalmente, cuando los péptidos formados por numerosos aminoácidos se administran a los organismos biológicos, pueden cortarse debido al metabolismo y similares. Además, en un estadio de su formulación para utilizarlos como agentes farmacéuticos, los péptidos resultan aptos para su descomposición. Es deseable que un péptido muestre una cadena tan corta como sea posible. A causa de que su actividad farmacológica deberá conservarse, sin embargo, un objetivo importante en el desarrollo de productos farmacéuticos consiste en encontrar la unidad mínima para que pueda mostrarse que la actividad de un péptido de larga cadena. El IGF-I es un péptido de cadena larga formada por tantos como 70 aminoácidos. Un objetivo muy importante para la preparación de un producto farmacéutico más útil consiste en encontrar la unidad mínima para la exhibición de la actividad de IGF-I. Además, aún, un objetivo muy interesante consiste en realizar estudios con respecto a acciones farmacológicas específicas, principalmente la acción en trastornos corneales y la acción en las heridas cutáneas utilizando la unidad mínima para que se muestre la actividad.

### 35 **Exposición de la invención**

En el contexto de la presente invención se descubrió que la unidad mínima para mostrar la actividad de IGF-I fue la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg (a la que se hace referencia en adelante como "SSSR", sinterizando diversos péptidos parciales de IGF-I y llevando a cabo un ensayo farmacológico con respecto a la extensión del epitelio corneal, administrando la sustancia P o FGLM combinadas con los péptidos parciales. Se descubrió asimismo que la administración conjunta de un péptido formado por la secuencia aminoácida representada por SSSR, y la sustancia P o FGLM, podrían promover la curación de alteraciones de la córnea y la curación de las heridas cutáneas. Específicamente, se descubrió que una composición que contenía (1), un péptido formado por la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg, o sus sales farmacéuticamente aceptables, y (2), un péptido formado por la secuencia aminoácida representada por Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, o sus sales farmacéuticamente aceptables, fue útil como un agente terapéutico para los trastornos corneales, tales como la úlcera corneal, erosión corneal, queratitis o la sequedad ocular, donde la córnea se encuentra en un estado dañado debido a distintos factores, y como un agente curativo de las heridas cutáneas tales como un desgarro, una abrasión, una incisión quirúrgica, una úlcera de la piel, o una quemadura o gangrena causada por ellas. En la presente memoria, el agente terapéutico para los trastornos corneales y el agente promotor de la curación de las heridas, según la invención, pueden utilizarse mezclándolos con ácido ascórbico, ésteres del ácido ascórbico, sales del ácido ascórbico, ácido pantoténico y sales de éste y similares, siendo ya bien conocida su acción curativa de las heridas.

55 El IGF-I está compuesto de dominios individuales, A, B, C y D. Los dominios A y B poseen una estructura similar a los de la insulina y el IGF-II. Así con la atención centrada en los dominios C y D de IGF-I, se examinó la acción extensora del epitelio corneal. Entonces, se llevó a cabo una prueba de extensión del epitelio corneal, utilizando el péptido que compone el dominio C o el péptido que compone el dominio D en combinación con la sustancia P. Se descubrió que el péptido que compone el dominio C, principalmente Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr (al que se hace referencia como "GYGSSRRAPQT" a continuación), presentaba actividad. Incluso después de que dos aminoácidos se eliminaran entonces de los dos extremos de GYGSSRRAPQT respectivamente, la actividad permanecía todavía. De este modo, los aminoácidos en Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro (a los que se hace referencia como "GSSRRAP" a continuación en la presente memoria), se sustituyeron secuencialmente con alanina, utilizando el enfoque del escaneo de alanina, para sintetizar las secuencias aminoácidas sustituidas con alanina. En presencia de la sustancia P o de FGLM con las secuencias aminoácidas sustituidas con alanina, se llevó

entonces a cabo una prueba de ampliación del epitelio corneal. A causa de que todos los péptidos que contenían la secuencia aminoácida representada por SSSR, mostraban actividad, se encontró que SSSR era esencial, constituía el péptido parcial mínimo de IGF-I para mostrar una acción para la ampliación del epitelio corneal.

5 Se obtuvieron principalmente las siguientes tres invenciones:

Una primera invención se refiere a un nuevo péptido formado por la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg, o sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 La característica de la primera invención se basa en el hallazgo del nuevo péptido como la unidad mínima para exhibir la actividad por parte del IGF-I, principalmente el nuevo péptido formado por la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg. Los aminoácidos que componen este péptido se encuentran en la forma L, D y DL, que también, están incluidas en el alcance de la invención. Tal como se describe específicamente en la sección de ensayos farmacológicos, cuando se utiliza SSSR en combinación con la sustancia P o FGLM, puede mostrar el efecto de ampliación del epitelio corneal y el efecto de promover la cicatrización de las heridas cutáneas.

15 El SSSR de la invención puede prepararse mediante procedimientos conocidos utilizando un sintetizador automático de péptidos, describiéndose los detalles en los ejemplos.

20 Una segunda invención se refiere a un agente para su utilización en el tratamiento de un trastorno corneal, conteniendo dicho agente (1) un péptido formado por la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg o sus sales farmacéuticamente aceptables y (2), un péptido que está formado por la secuencia aminoácida representada por Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> o sus sales farmacéuticamente aceptables como principios activos.

25 Una tercera invención se refiere a un agente para su utilización en la promoción de la curación de heridas cutáneas, conteniendo dicho agente el péptido (1) y el péptido (2) como principios activos.

30 La característica de las segunda y tercera invenciones es el descubrimiento de que la administración conjunta del péptido en el que la unidad mínima para la exhibición de la actividad, está representada por Ser-Ser-Ser-Arg, y el péptido en el que la unidad mínima para la exhibición de la actividad se representa por Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, puede mostrar un efecto excelente de la extensión del epitelio corneal, y, asimismo, un efecto excelente para promover la curación de las heridas cutáneas.

35 Los aminoácidos que componen el péptido de SSSR se encuentran en las formas L, formas D y en formas DL, comprendidas en su totalidad en el alcance de la invención. Un modo más preferido es un péptido compuesto de aminoácidos, todos en forma L.

40 Los aminoácidos que componen la sustancia P y FGLM, se encuentran en forma L, forma D y forma DL. Están comprendidas en su totalidad en el alcance de la invención. Un modo más preferible es un péptido compuesto de aminoácidos, todos en forma L.

45 Según la invención, sus sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales clorhidrato, sales sulfato, sales fosfato, sales lactate, sales maleato, sales fumarato, sales oxalato, sales metanosulfonato y sales p-toluensulfonato.

50 Según la invención, la administración conjunta de SSSR y FGLM muestra acciones de extensión del epitelio corneal y de promoción de la curación de las heridas cutáneas. Cualquier tipo de SSSR y de FGLM que exhiban estas acciones son satisfactorias, sin limitaciones específicas. La administración conjunta de SSSR como la unidad mínima de exhibición de la actividad de IGF-I y de FGLM como la unidad mínima de la exhibición de la actividad de la sustancia P, es aplicable para llevar a cabo la invención.

55 El agente para ser utilizado en el tratamiento de los trastornos corneales y el agente para promover la cicatrización de las heridas cutáneas, según la invención puede prepararse utilizando técnicas habituales SSSR o sus sales farmacéuticamente aceptables y FGLM o sus sales farmacéuticamente aceptables se formulan individualmente en formulaciones simples o lo hacen en formulaciones de mezcla, que pueden administrarse parenteral y oralmente. Su administración parenteral resulta más preferida.

60 Las formas de dosificación preferidas del agente para tratar los trastornos corneales, incluyen, por ejemplo gotas y pomadas oculares. Éstas pueden prepararse utilizando técnicas habituales. Por ejemplo, las gotas oculares pueden prepararse utilizando agentes isotónicos tales como cloruro sódico, tampones tales como fosfato sódico y conservantes tales como cloruro de benzalconio. El pH es satisfactorio si se encuentra dentro de un intervalo oftalmológicamente aceptable. El pH preferido es de entre 4 y 8.

65 La dosis del agente para tratar las alteraciones se selecciona apropiadamente dependiendo de los síntomas, edad del paciente, forma de dosificación y similares. Para las gotas oculares, la concentración de SSSR o de sus sales farmacéuticamente aceptables, está en un porcentaje de 0,001 a 10 peso/vol %, preferentemente entre 0,01 y 1

peso/vol %, para administrarlo en los ojos una o varias veces al día. La concentración de FGLM o de sus sales farmacéuticamente aceptables es de 0,00001 a 0,1 peso/vol %, preferentemente de 0,0001 a 0,01 peso/vol % para administrarlo en los ojos una o varias veces al día.

- 5 Debe apreciarse que los dos principios activos están mezclados, para preparar las formulaciones tales como las gotas oculares.

Las formas preferidas de la formulación del agente para promover la curación de las heridas cutáneas, incluyen, por ejemplo, una pomada, una gelatina, una cataplasma, un parche, una loción, una crema, un espray, un aerosol, un esparadrapo, una suspensión y una emulsión. Además, puede prepararse un líquido seleccionando un disolvente apropiado. De forma que para preparar el agente para promover la cura de las heridas cutáneas, pueden añadirse los agentes siguientes, dependiendo de la forma de dosificación: rellenos, excipientes, bases o vehículos, extensores, ajustadores del pH, solubilizadores, agentes de suspensión, tampones, estabilizadores, conservantes, surfactantes, antioxidantes, dispersantes, emulsionantes, disolventes y agentes auxiliares para disolución.

15 El transportador para la formulación incluye, por ejemplo, vaselina blanca, parafina líquida, hidrocarburos gelificados, alcohol cetílico, polietilenglicol, gelatina, almidón de maíz, alginato sódico, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, plastibase hidrófila, gelatina, dextrina, alcohol estearílico, alcohol polivinílico, copolímero metoxietileno-anhídrido maleico, éter polivinílico y polímeros y copolímeros con un componente constitucional de vinilpirrolidona, estearato sódico, estearato magnésico, cloruro de benzalconio, grasas y aceites tales como aceite de oliva, aceite de camelia, y aceite de soja, lactosa y agua.

El agente para promover la curación de las heridas cutáneas, según la invención, puede administrarse de varias formas, dependiendo del lugar de la herida y del nivel de ésta. En el caso de que el agente vaya a utilizarse como una preparación externa, el agente preferentemente se reviste, se une o se pulveriza directamente sobre el sitio apropiado (una lesión), tal como la piel.

La dosis del agente para promover la curación de las heridas cutáneas, según la invención, puede seleccionarse apropiadamente, según los síntomas, edad de los pacientes, forma de dosificación y similares. La dosis del SSSR o de sus sales farmacéuticamente aceptables es generalmente de 0,001 a 1.000 mg, preferentemente de 0,01 a 500 mg por día, en una vez o en varias. Además, la dosis de FGLM o de sus sales farmacéuticamente aceptables es generalmente de 0,01 a 5.000 mg, preferentemente de 0,1 a 1.000 mg por día, en una vez o varias.

No hace falta decir que los dos principios activos se mezclan conjuntamente, para preparar formulaciones tales como pomadas.

Los ejemplos de preparaciones, de formulaciones y los resultados de un ensayo farmacológico, se dan a conocer a continuación. Son necesarios para un mejor entendimiento de la invención.

#### 40 **Mejor modo de poner en práctica la invención**

<Ejemplo de preparación>

Un ejemplo representativo de la preparación del SSSR, para utilizarlo en la invención, se muestra a continuación.

##### 45 1. Preparación del SSSR.

Utilizando un sintetizador 430A automático de péptidos (fabricado por Applied Biosystems), y de acuerdo con un programa existente, se sintetizó una resina peptídica protectora mediante el procedimiento del butiloxycarbonilo terciario (BOC). Como material en bruto inicial, se utilizó el transportador resínico 4-(oximetil)fenilacetoamida metilo [Boc-Arg(Tos)PAM] (a escala de 0,5 mmol). En este procedimiento de síntesis, se utilizaron ácido trifluoroacético al 30% (TFA)/diclorometano y TFA al 70%/diclorometano para eliminar el grupo Boc como un grupo protector N-amino. Para el enjuague se utilizó el N-metil-2-pirrolidona (NMP)/diclorometano. El N,N'-diclorohexil-carbodiimida (DCC) y el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) se utilizaron como agentes de condensación, y el derivado Boc-Ser (OBzl), como un aminoácido N-prottegido se utilizó a 4 equivalentes por grupo amino, respectivamente, mientras que el dimetilsulfóxido (DMSO)-NMP (8:2), se utilizó como un disolvente reactivo. Después de finalizar la condensación, la generación de péptidos defectuosos se evitó con anhídrido acético/N,N-diisopropil etilamina (DIEA) para bloquear completamente los grupos aminoácidos restantes. La eliminación del grupo Boc y la condensación de Boc-Ser (OBzl) se repitieron para construir el péptido protegido final. El recorte del péptido a partir de la resina peptídica protegida resultante y la eliminación de la totalidad de los grupos protectores se llevó a cabo mediante un procedimiento con fluoruro de hidrógeno anhidro, (HF)(HF : p-cresol = 8 : 2 (v/v); -2 o 5°C; 60 minutos). Después de la reacción, se destiló HF, extrayéndose el péptido con ácido trifluoroacético acuoso al 0,1%. Se obtuvo un producto en bruto como un polvo liofilizado, para la separación se preparativa y la purificación. La separación preparativa y la purificación se llevaron a cabo en un gradiente de entre el 0,5 al 2% de un sistema acetónitrilo/agua (que contenía TFA al 0,1%), utilizando HPLC 8A (fabricado por Shimadzu Corporation) (columna: ODS 30 x 240 mm fabricados por YMC) (80 minutos). Después de recuperar fracciones muy purificadas del material objetivo resultante y destilar

## ES 2 422 081 T3

acetonitrilo a partir del material, el material resultante se liofilizó para obtener la sal TFA del compuesto diana (70 mg; rendimiento del 32%). Análisis aminoácido (condiciones para hidrólisis: 6N HCl, 110°C, 22 horas).

Ser(3) 2,74, Arg (1) 1,00

5 Análisis HPLC [Columna: YMC Pak ODS-A (4,6 mm I.D. x 150 mm); Eluyente: 1-60% CH<sub>3</sub>CN/5 mM CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>COOH (25 min); Temperatura: 25°C, Velocidad de flujo: 1,0 ml/min; Detector: 220 nm].

Pureza (HPLC): 98,5%

10 Análisis de masa (ESI-MS)

MH<sup>+</sup> = 436,2 (teórico = 436,2 mono isotópico)

15 <Ejemplo de preparación de referencia>

2. Preparación del análogo SSSR.

20 Los mismos procedimientos para SSSR se repitieron para preparar GSSSR, SSSRR, GSSSRR, GSSSRRAP, ASSSRRAP, GSSSRAAP y GSSSRAAAP. Las propiedades físicas de los péptidos representativos se muestran a continuación.

(1)GSSSR

25 Análisis de aminoácidos (condiciones para la hidrólisis : 6N HCl, 110°C, 22 horas)

Ser(3) 2,76, Gly (1) 1,00, Arg (1) 1,00

30 Análisis HPLC [Columna: YMC Pak ODS-A (4,6 mm I.D. x 150 mm);

Eluyente: 1-60% CH<sub>3</sub>CN/5 mM CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>COOH (25 min), Temperatura: 25°C; Velocidad de flujo : 1,0 ml/min; Detector: 220 nm]

35 Pureza (HPLC): 98,5%

Análisis de masa (ESI-MS)

Peso molecular = 492,3 (teórico = 492,5)

40 (2) SSSRR

Análisis de aminoácidos (condiciones para la hidrólisis : 6N HCl, 110°C, 22 horas)

Ser(3) 2,76, Arg (2) 2,00

45 Análisis HPLC [Columna: YMC Pak ODS-A (4,6 mm I.D. x 150 mm);

Eluyente: 1-60% CH<sub>3</sub>CN/0,1 % CF<sub>3</sub>COOH (25 min), Temperatura: 25°C; Velocidad de flujo : 1,0 ml/min; Detector: 220 nm].

50 Pureza (HPLC): 99,7%

Análisis de masa (ESI-MS)

55 Peso molecular = 591,5 (teórico = 591,6)

(3) GSSSRR

Análisis de aminoácidos (condiciones para la hidrólisis : 6N HCl, 110°C, 22 horas)

60 Ser(3) 2,73, Gly(1) 0,98, Arg (2) 2,00

Análisis HPLC [Columna: YMC Pak ODS-A (4,6 mm I.D. x 150 mm);

65 Eluyente: 1-60% CH<sub>3</sub>CN/0,1 % CF<sub>3</sub>COOH (25 min), Temperatura: 25°C; Velocidad de flujo : 1,0 ml/min; Detector: 220 nm].

Pureza (HPLC): 99,3%

Análisis de masa (ESI-MS)

5

Peso molecular = 648,5 (teórico = 648,7)

(4) GSSSRRAP

10 Análisis de aminoácidos (condiciones para la hidrólisis : 6N HCl, 110°C, 22 horas)

Ser(3) 2,68, Gly(1) 0,99,Ala(1) 1,01, Arg (2) 2,00

Análisis HPLC [Columna: YMC Pak ODS-A (4,6 mm I.D. x 150 mm);

15

Eluyente: 1-60% CH<sub>3</sub>CN/0,1% CF<sub>3</sub>COOH (25 min), Temperatura: 25°C; Velocidad de flujo : 1,0 ml/min: Detector: 220 nm].

Pureza (HPLC): 98,6%

20

Análisis de masa (ESI-MS)

Peso molecular = 816,7 (teórico = 816,9)

25 <Ejemplos de formulación>

A continuación, se muestran ejemplos representativos de formulación.

1. Gotas oculares

30

Mediante un amplio procedimiento, se preparó una gota ocular con la fórmula siguiente:

Ejemplo 1 de formulación

35

SSSR	1 mg
Cloruro sódico	900 mg
Hidróxido sódico	cantidad suficiente
Ácido clorhídrico	"
Agua purificada estéril	"
en 100 ml	

40

De la misma forma que para el ejemplo 1 de formulación, pueden prepararse gotas oculares que contienen SSSR de 0,01 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg y 100 mg en 100 ml.

2. Ejemplo 2 de formulación de referencia

45

GSSSR	1 mg
FGLM	100 mg
Cloruro sódico	900 mg
Hidróxido sódico	cantidad suficiente
Ácido clorhídrico	"
Agua purificada estéril	"
en 100 ml	

50

De la misma manera que para el ejemplo 2 de formulación de referencia, pueden prepararse gotas oculares que contienen FGLM de 1 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg, 500 mg, y 1.000 mg en 100 ml.

55

Ejemplo 3 de Formulación

60

SSSR	1 mg
FGLM	100 mg
Cloruro sódico	900 mg
Hidróxido sódico	cantidad suficiente
Ácido clorhídrico	"
Agua purificada estéril	"
en 100 ml	

De la misma forma que para el ejemplo 3 de formulación, pueden prepararse gotas oculares conteniendo SSSR de 0,01 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 10 mg, 50 mg y 100 mg y FGLM de 1 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg, 500 mg y 1.000 mg en combinaciones opcionales.

5	2. Pomada	
	Ejemplo 4 de Formulación	
	SSSR	10 mg
	FGLM	100 mg
	Parafina líquida	10 g
10	Vaselina blanca	cantidad suficiente
	en 100 g	

Modificando apropiadamente las cantidades de SSSR y de FGLM que van a añadirse, pueden prepararse varias concentraciones de pomadas.

15	Ejemplo 5 de formulación de referencia	
	GSSSR	1 mg
	Sustancia P	100 mg
	Parafina líquida	10 g
20	Vaselina blanca	cantidad suficiente
	en 100 g	

Modificando apropiadamente las cantidades de GSSSR y de sustancia P que van a añadirse, igual que en el ejemplo 5 de formulación de referencia, pueden prepararse varias concentraciones de pomadas.

25	Ejemplo 6 de formulación de referencia	
	SSSRR	5 mg
	FGLM	100 mg
	Parafina líquida	10 g
30	Vaselina blanca	cantidad suficiente
	en 100 g	

Modificando apropiadamente las cantidades de SSSRR y de FGLM que van a añadirse, pueden prepararse varias concentraciones de pomadas.

35	Ejemplo 7 de formulación de referencia	
	GSSSRR	50 mg
	Sustancia P	10 mg
	Ácido ascórbico	3 mg
40	Parafina líquida	10 g
	Plastibase hidrofílica	cantidad suficiente
	en 100 g	

Modificando apropiadamente las cantidades de GSSSRR y de sustancia P que van a añadirse, pueden prepararse varias concentraciones de pomadas.

<Ensayo farmacológico>

(1) Acción para ampliar el epitelio corneal (*in vitro*)

50 Utilizando la córnea de un conejo japonés blanco, macho, y según el procedimiento de Nishida et al. (J. Cell Biol., 97, 1653-1657 (1983)), se utilizó como marcador la longitud de la extensión del epitelio corneal del corte de la córnea en un sistema de cultivo tisular, para examinar la influencia sobre la ampliación del epitelio corneal.

55 (Procedimiento experimental)

Los bloques corneales obtenidos a partir de los cortes de la córnea de conejos (6 bloques en cada grupo), se cultivaron en medio de cultivo (TC-199) que contenía un compuesto de prueba bajo condiciones de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 24 horas. Después del cultivo, los bloques corneales se fijaron en una solución e mezcla de etanol-ácido acético glacial (relación volumétrica: 95:5), incluyéndose entonces en parafina para preparar los cortes. Después de que la parafina se eliminara de los cortes, éstos se tiñeron con hematoxilina-eosina para examinar la ampliación de la longitud de la capa celular epitelial corneal con un microscopio. Como control, se utilizaron los bloques cultivados de la misma forma que en el medio de cultivo sin ningún compuesto de prueba.

60



(Compuestos de prueba)

En la Tabla 1, se muestran ejemplos representativos de los péptidos utilizados en el experimento.

5 (Resultados)

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 1. En ésta, la proporción de la extensión es la media de seis cortes por grupo, calculada cuando el alargamiento de la longitud del grupo de control se definió como línea basal (100%).

10

**TABLA 1**

Sustancias de prueba	Proporción de la extensión (%)
Control	100
SSSR (1 nM)	101
GSSSR (1 nM)	101
SSSRR (1 nM)	98
GSSSRR (1 nM)	94
GSSSRRAP (1 nM)	97
GSSSRAAAP (1 nM)	100
GYGSSSRRAPQT (1 nM)	104
Sustancia P (20 µM)	94
FGLM (20 µM)	99
SSSR (1 nM) + sustancia P (20 µM)	138
GSSSR (1 nM) + sustancia P (20 µM)	135
SSSRR (1 nM) + sustancia P (20 µM)	136
GSSSRR (1 nM) + sustancia P (20 µM)	142
GSSSRRAP (1 nM) + sustancia P (20 µM)	140
ASSSRRAP (1 nM) + sustancia P (20 µM)	134
GSSSRAAP (1 nM) + sustancia P (20 µM)	150
GSSSRAAAP (1 nM) + sustancia P (20 µM)	139
GYGSSSRRAPQT (1 nM) + sustancia P (20 µM)	134
SSSR (1 nM) + FGLM (20 µM)	145

15 Tal como se muestra en la Tabla 1, no se observó que los análogos SSSR aislados, la sustancia P aislada y el FGLM aislado, tuvieran alguna influencia sobre la extensión del epitelio corneal; sin embargo, se observó que se promovió significativamente la ampliación del epitelio corneal, cuando éste se cultivó en un medio de cultivo que contenía tanto el análogo SSSR como la sustancia P (o el FGLM).

20 (2) Acción sobre la curación de las heridas cutáneas

La acción de cura sobre las heridas cutáneas puede someterse a prueba mediante el procedimiento siguiente.

25 Se anestesiaron ratas haciéndolas inhalar éter dietílico; entonces, se afeitó el pelo dorsal con cortadores de pelo, eliminándose entonces con una crema depiladora. Tras 24 horas, utilizando un instrumento cortante para incisión de 5 mm de diámetro, empleado en las biopsias dérmicas, se dispusieron en un idéntico intervalo sobre la dermis dorsal cinco sitios en los que se practicaron heridas, a través de la totalidad de las capas epidérmicas y dérmicas. Después de confirmar la hemóstasis, se aplicaron una vez al día, individualmente, una pomada conteniendo SSSR, una pomada conteniendo FGLM y una pomada conteniendo SSSR y FGLM. Antes de la aplicación de las pomadas individuales, las heridas dorsales de las ratas se fotografiaron, midiéndose la extensión que ocupaban. Para  
30 examinar el efecto de la curación de las heridas cutáneas, se compararon entre ellas las áreas de las heridas individuales después de que se aplicaran sobre ellas la pomada que contenía SSSR, la pomada que contenía FGLM y la que contenía SSSR y FGLM.

**Aplicabilidad industrial**

35 Basándose en los resultados del ensayo farmacológico, la administración conjunta de SSSR formado por la secuencia aminoácida representada por Ser-ser-Ser-Arg como unidad mínima para la exhibición de la actividad de IGF-I, y de FGLM, formado por la secuencia aminoácida representada por Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, promueve significativamente la ampliación del epitelio corneal, y la curación de las heridas cutáneas. De este modo, SSSR y  
40 FGLM cuando se administran combinadamente, actúan sinérgicamente para mostrar efectos como agentes terapéuticos de trastornos corneales, tales como úlceras de la córnea, erosión corneal, queratitis y sequedad ocular, o efectos como agentes de curación de heridas cutáneas tales como desgarros, abrasiones, incisiones quirúrgicas, úlceras dérmicas y quemaduras y patologías a ellas debidas, tales como gangrena.

**Listado de secuencias**

<110> SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD. NISHIDA, Teruo

5 <120> Nuevo péptido y su utilización farmacéutica

<130> 19-153-tM/hg

10 <140> PCT/JP02/12632

<141> 2002-12-03

<150> JP 2001-368103

15 <151> 2001-12-01

<160> 17

<170> Patent In Ver.2.1

20 <210>1

<211>4

<212>PRT

<213> Humano

<400> 1

Ser Ser Ser Arg

25 1

<210> 2

<221>4

<223> Humano

30 <400>2

Phe Gly Leu Met

1

35 <210>3

<211>12

<212>PRT

<213> Humano

40 <400>3

Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr

1 5 10

<210>4

45 <211>8

<212> PRT

<213> Humano

<400>4

Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro

50 1 5

<210>5

<211>5

<212>PRT

55 <213> Humano

<400> 5

Ser Ser Ser Arg Arg  
1 5

5 <210>6  
<211>5  
<212>PRT  
<213> Humano  
  
<400> 6

Gly Ser Ser Ser Arg  
1 5

10 <210>7  
<211>6  
<212>PRT  
<213> Humano  
  
15 <400> 7

Gly Ser Ser Ser Arg Arg  
1 5

20 <210>8  
<211>8  
<212>PRT  
<213> Humano  
  
25 <400> 8

Ala Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro  
1 5

30 <210>9  
<211>8  
<212>PRT  
<213> Humano  
  
35 <400> 9

Gly Ser Ser Ser Arg Ala Ala Pro  
1 5

40 <210>10  
<211>9  
<212>PRT  
<213> Humano  
  
<400> 10

Gly Ser Ser Ser Arg Ala Ala Ala Pro  
1 5

45 <210>11  
<211>12  
<212>PRT  
50 <213> Humano  
  
<400> 11

Tyr Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met  
 1 5 10

5 <210>12  
 <211>8  
 <212>PRT  
 <213> Humano

<400> 12

Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met  
 1 5

10 <210>13  
 <211>7  
 <212>PRT  
 <213> Humano

15 <400> 13

Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met  
 1 5

20 <210>14  
 <211>6  
 <212>PRT  
 <213> Humano

25 <400> 14

Gln Phe Phe Gly Leu Met  
 1 5

30 <210>15  
 <211>5  
 <212>PRT  
 <213> Humano

<400> 15

Phe Phe Gly Leu Met  
 1 5

35 <210>16  
 <211>5  
 <212>PRT  
 <213> Humano

40 <400> 16

Tyr Phe Gly Leu Met  
 1 5

45 <210>17  
 <211>5  
 <212>PRT  
 <213> Humano

50 <400> 17

Gly Phe Gly Leu Met  
 1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Péptido que consiste en la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 10 2. Agente para su utilización en el tratamiento de un trastorno corneal, comprendiendo el agente los componentes siguientes: (1) un péptido que consiste en la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg o sus sales farmacéuticamente aceptables, y (2) un péptido que consiste en la secuencia aminoácida representada por Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> o la sustancia P o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 15 3. Agente para su utilización en el tratamiento de un trastorno corneal, según la reivindicación 2, en el que el trastorno corneal es una úlcera corneal, erosión corneal, queratitis o sequedad ocular.
4. Agente para su utilización en el tratamiento de un trastorno corneal, según la reivindicación 3, en el que su forma de dosificación es una gota ocular.
- 20 5. Agente para su utilización en la promoción de la cicatrización de heridas cutáneas, conteniendo el agente los componentes siguientes:  
(1) un péptido que consiste en la secuencia aminoácida representada por Ser-Ser-Ser-Arg o sus sales farmacéuticamente aceptables; y (2) un péptido que consiste en la secuencia aminoácida representada por Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> o la sustancia P o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 25 6. Agente para su utilización en la promoción de la cicatrización de las heridas cutáneas según la reivindicación 5, en el que la herida cutánea es un desgarro, una abrasión, una incisión quirúrgica, una úlcera cutánea o una quemadura.
7. Agente para su utilización en la promoción de la cicatrización de heridas cutáneas según la reivindicación 6, en el que su forma de dosificación es una pomada o un parche.