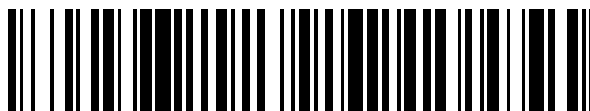


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 243**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/08** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2003** **E 03786242 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014** **EP 1586324**

54 Título: **Uso del pentapéptido PHSRN en formulaciones oftálmicas**

30 Prioridad:

**27.12.2002 JP 2002381131**

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

**10.07.2014**

73 Titular/es:

**NISHIDA, TERUO (100.0%)  
6-8-4, Asutopia, Ube-shi  
Yamaguchi 755-0152, JP**

72 Inventor/es:

**NISHIDA, TERUO;  
UETAKE, Y. y  
IWATA, HIROAKI**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia**

**ES 2 475 243 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

5 **Uso del pentapéptido PHSRN en formulaciones oftálmicas**

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención se refiere a un uso específico del péptido PHSRN.

## ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 La presente invención se refiere a la secuencia de aminoácidos prolina-histidina-serina-arginina-asparagina, que es un sitio de expresión de la actividad de la fibronectina, y a una sustancia química, con la que se modifican ambos terminales de la anterior secuencia de aminoácidos (denominándose estos de aquí en adelante PHSRN y Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>).

20 La córnea es un tejido fino de 0,52 mm a 1,0 mm de espesor. La córnea está situada en la parte más destacada del globo ocular y es un tejido altamente diferenciado, que tiene una propiedad de transmisión y una potencia de refracción apropiada para guiar la luz desde el exterior hacia los receptores de la retina. La córnea tiene funciones fisiológicas muy importantes. La estructura de la córnea es comparativamente simple. Es decir, la córnea tiene una estructura de cinco capas microscópica muy ordenada que comprende la capa epitelial, la membrana de Bowman, el estroma corneal, la membrana de Descemet y la capa de células endoteliales.

25 La fibronectina es una glucoproteína con un peso molecular de aproximadamente 440.000 que participa en la adhesión y propagación celular, y desempeña un papel importante en las acciones de cicatrización de heridas, así como en la morfogénesis, el desarrollo y otros fenómenos biológicos. Dicha fibronectina es un dímero en el que están unidas dos subunidades de un peso molecular de 220 a 250.000 cada una. La fibronectina tiene una estructura de dominio. La fibronectina participa en la adhesión celular y se une específicamente con diversas matrices extracelulares y puentes con los receptores de fibronectina (integrinas) en las superficies celulares.

30 El trastorno de la córnea es inducido por la úlcera corneal, la erosión epitelial corneal, la queratitis, la sequedad ocular y otras diversas enfermedades. Dicho trastorno se repara de forma natural si no hay infección mixta concurrente. Los principios de la reparación son: (1) la aparición de la fibronectina en partes del estroma corneal expuesto en zonas epiteliales defectuosas resultantes del trastorno de la córnea; (2) la unión de dicha fibronectina sobre una matriz; y (3) la difusión y el movimiento de las células epiteliales sobre dicha matriz. Como se cura la córnea, la fibronectina desaparece de las partes dañadas de la córnea.

35 Por alguna razón, el proceso de reparación se puede retrasar o el defecto epitelial puede persistir sin repararse. En dicho caso, la estructuración normal del epitelio se ve afectada negativamente, pudiéndose deteriorar incluso las estructuras y funciones del estroma y del endotelio. Los métodos de tratamiento convencionales son métodos pasivos en los que se protege la superficie de la córnea de la irritación externa con el fin de permitir que el epitelio se extienda de forma natural y vuelva a cubrir las partes defectuosas. Con los desarrollos recientes realizados en el campo de la biología celular, se han aclarado los factores implicados en la división, el movimiento, la adhesión, la propagación, etc., de las células. En lo que se refiere a la reparación de los defectos epiteliales corneales, se ha hecho hincapié en los compuestos que estimulan la difusión del epitelio de la córnea.

40 Los componentes tales como la fibronectina, el EGF (factor de crecimiento epidérmico) y el ácido hialurónico son conocidos como agentes terapéuticos de las heridas epiteliales de la córnea. La fibronectina, que se encuentra en el plasma humano, se puede purificar y usar como producto sanguíneo para su instilación. Se sabe que dicha formulación oftálmica potencia el recubrimiento de los defectos epiteliales de la córnea y la cicatrización de las heridas epiteliales.

45 Sin embargo, en la actualidad, la fibronectina se debe purificar a partir de un plasma autólogo del paciente, usando un kit especial de purificación. Por lo tanto, la obtención de la fibronectina es muy complicada y supone muchas molestias para el paciente. Por esta razón, a pesar de ser clínicamente eficaz, la fibronectina no recibe un uso adecuado.

50 El EGF (factor de crecimiento epidérmico) es un polipéptido con un peso molecular de 6.000 conocido por sus acciones como factor de crecimiento promotor de la mitosis para el epitelio de la córnea. Se sabe que cuando están presentes los factores que inhiben la mitosis del epitelio, los efectos del EGF no se pueden presentar fácilmente. Además, en los casos en que acompañan a la inflamación y en los casos de queratopatía diabética, se produce angiogénesis como efecto secundario del EGF.

55 El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano con un peso molecular de varios millones que tiene *N*-acetil-D-

glucosamina y ácido D-glucurónico como azúcares constituyentes. Se sabe que el ácido hialurónico presenta efectos terapéuticos significativos como agente terapéutico para la sequedad ocular. En lo que se refiere a sus acciones, el ácido hialurónico actúa en la adhesión, la propagación y el movimiento de las células epiteliales, pero sus efectos de proliferación de las células epiteliales son bajos. El ácido hialurónico tiene la desventaja de ser difícil de usar como formulación oftálmica debido al aumento de la viscosidad a alta concentración.

El péptido PHSRN es un pentapéptido desvelado en la publicación internacional WO98/22617 y en "The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice", *The Journal of Clinical Investigation*, 105(11), pág. 1537-1545, 2000. En estas referencias bibliográficas de la técnica anterior, se indica que el péptido PHSRN presenta efectos de cicatrización de heridas externas, así como efectos supresores de la invasión y la proliferación contra las células cancerosas. Sin embargo, no se conocen informes que se refieran al péptido PHSRN en relación con los campos oftalmológicos.

Por lo tanto, no se conocen composiciones satisfactorias para el tratamiento del trastorno de la córnea, y se desean enormemente mejores composiciones.

Como se ha mencionado anteriormente, la fibronectina es reconocida como clínicamente eficaz en los campos oftalmológicos. Sin embargo, debido a problemas inherentes al producto sanguíneo (por ejemplo, problemas de saneamiento, la gran molestia de tener que extraer muestras de sangre autóloga de un paciente, la problemática de purificar la fibronectina del plasma, etc.), el uso de la fibronectina no está extendido. Además, dado que el sitio activo de la fibronectina no se había aclarado adecuadamente, quedaba mucho por investigar y desarrollar para poder usar la fibronectina como un componente eficaz de un agente terapéutico para el trastorno de la córnea.

En *Journal of Biomaterials Science* vol.13, Nº 4, 2002, Aucoin L. *et al.*, se describe la modificación de superficies de polidimetilsiloxano (PDMS) mediante uniones covalentes de combinaciones de adhesión celular y péptidos sinérgicos obtenidos de laminina y fibronectina para facilitar la adhesión de las células epiteliales de la córnea a un sustrato de PDMS. Los péptidos estudiados incluían YIGSR y su péptido sinérgico PDSGR de laminina, y RGDS y PHSRN derivados de fibronectina. En dicho estudio, se pudo demostrar que la modificación de la superficie con combinaciones apropiadas de péptidos de adhesión celular y péptidos sinérgicos se traduce en mejores interacciones de la superficie celular.

Livan D. L. *et al.* describieron en *Journal of Clinical Investigation*, vol. 105, Nº 11, junio de 2000 que la secuencia de PHSRN del dominio de unión celular de la fibronectina plasmática induce a los queratinocitos y fibroblastos humanos a invadir las matrices extracelulares libres de suero de manera natural de embriones de erizos de mar. Se ha demostrado el aumento significativo de la potencia del PHSRN acetilado y amidado (Ac-PHSRN-NH<sub>2</sub>). El tratamiento con el mismo estimula la repitelialización y contracción de las heridas dérmicas en ratones diabéticos obesos con problemas de cicatrización. Además, un solo tratamiento con Ac-PHSRN-NH<sub>2</sub> estimula la migración de los queratinocitos y los fibroblastos a las heridas, aumenta la fibroplasia y la vascularización en la matriz, y estimula la formación de fibras prominentes.

Por otra parte, Ki-San Kim *et al.* han demostrado que el tratamiento de pacientes que sufren defectos epiteliales en la córnea mediante gotas oculares de homólogos de fibronectina produjo una total repitelialización (*Korean J. Ophthalmol*; 1992, pág. 12-18).

La presente invención se ha realizado en vista de las circunstancias anteriores, y un objeto de la misma consiste en encontrar el sitio de expresión de la actividad de la fibronectina, siendo otro objeto de la misma el de proporcionar una composición con la que el sitio de expresión de la actividad de la fibronectina se pueda usar como uno o ambos de entre un fármaco de tratamiento oftalmológico y un fármaco preventivo oftalmológico.

#### DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Con el fin de conseguir los objetos anteriores, los presentes inventores se centraron en los péptidos contenidos en la fibronectina y examinaron sus acciones sobre el trastorno de la córnea. Como resultado de ello, los presentes inventores encontraron que el PHSRN, que es el sitio de expresión de la actividad de la fibronectina, estimula la cicatrización de las heridas epiteliales de la córnea.

Es decir, los presentes inventores (1) encontraron una nueva aplicación del PHSRN en una composición oftalmológica; y (2) encontraron que hay una composición, usando PHSRN o una sal del mismo que sea admisible como fármaco médico, disponible como uno o ambos de entre un agente preventivo y un agente terapéutico para la úlcera corneal, la erosión epitelial corneal, la queratitis, la sequedad ocular y otros trastornos de la córnea en los que esta esté dañada, llegando de este modo a completar básicamente la presente invención.

Así pues, de acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso del péptido PHSRN o una sal del mismo

en la preparación de una formulación oftálmica de acuerdo con la reivindicación 1, y el péptido PHSRN para estimular la cicatrización de heridas del epitelio de la córnea de acuerdo con la reivindicación 10. La composición oftalmológica resultante presenta potentes efectos terapéuticos contra el trastorno de la córnea en pequeñas cantidades, tiene un bajo peso molecular y es excelente en términos de seguridad.

5

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Uso del péptido PHSRN o una sal del mismo en la preparación de una formulación oftálmica para estimular la cicatrización de las heridas en el epitelio de la córnea.

10

(2) El péptido PHSRN para estimular la cicatrización de las heridas en el epitelio de la córnea.

En la presente memoria descriptiva, se usarán las siguientes abreviaturas para los restos de aminoácidos. Es decir, Asn o N indicarán asparagina, Arg o R indicarán arginina, His o H indicarán histidina, Pro o P indicarán prolina, y Ser o S indicarán serina. Además, Ac indicará el grupo acetilo y NH<sub>2</sub> indicará el grupo amino.

15

El péptido PHSRN para su uso en la estimulación de la cicatrización de heridas es el pentapéptido que es el sitio activo de la fibronectina y tiene la estructura Pro-His-Ser-Arg-Asn. En el caso de que estos aminoácidos puedan generar una serie de enantiómeros, la totalidad de dichos enantiómeros y sus mezclas se incluyen dentro de la presente invención. Se ha de interpretar que las composiciones formadas con el péptido PHSRN para su uso en la estimulación de la cicatrización de heridas en forma de un motivo están dentro del alcance de los equivalentes, estando, por lo tanto, dentro del alcance de las reivindicaciones de la presente invención. Además, se prefiere una sustancia con la que se acetile el terminal N y se amide el terminal C del péptido PHSRN para su uso en la estimulación de la cicatrización de heridas, es decir, Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>.

20

25

Con la presente invención, uno o ambos de entre la prevención y el tratamiento se refieren a uno o ambos de entre la prevención de la aparición de una enfermedad por anticipado (prevención) y la curación de un paciente afectado por una enfermedad (tratamiento) mediante la administración a un animal, incluyendo un ser humano.

30

Con la presente invención, el trastorno de la córnea se refiere a úlcera corneal, erosión epitelial corneal, queratitis, sequedad ocular, etc., en el que la córnea está dañada por cualquiera de diversas causas.

Los ejemplos de las sales del péptido PHSRN que son admisibles como fármaco médico incluyen cloruros, sulfatos, fosfatos, lactatos, maleatos, fumaratos, oxalatos, metanosulfonatos, paratoluenosulfonatos, etc.

35

El péptido PHSRN o una sal de este péptido que sea admisible como fármaco médico se puede administrar por vía oral o no oral. Las formas de dosificación incluyen pastillas, cápsulas, gránulos, polvos, soluciones inyectables, formulaciones oftálmicas, etc. Entre ellas, se prefiere una formulación oftálmica, tal como una gota ocular, una pomada ocular, etc. Estas se pueden preparar mediante técnicas usadas en general. Por ejemplo, en el caso de las píldoras, las cápsulas, los gránulos, los polvos y otros agentes orales, se puede añadir, si es necesario, un excipiente tal como lactosa, celulosa cristalina, almidón o aceite vegetal; un lubricante tal como estearato de magnesio o talco; un aglutinante tal como hidroxipropilcelulosa o polivinilpirrolidona; un disgregante tal como carboximetilcelulosa cálcica o hidroxipropilmetilcelulosa con bajo grado de sustitución; un agente de recubrimiento tal como hidroxipropilmetilcelulosa, macrogol o resina de silicona; un agente filmógeno tal como una membrana de gelatina, etc. Las gotas oculares se pueden preparar usando un agente de tonicidad tal como cloruro de sodio, un agente tampón tal como fosfato de sodio, un conservante tal como cloruro de benzalconio, etc. Aunque basta con que el pH de dicho fármaco médico esté dentro de un intervalo permisible para una formulación oftalmológica, el pH está preferentemente dentro del intervalo de 4 a 8. Las pomadas oculares se pueden preparar usando un material de base usado en general, tal como vaselina blanca o parafina líquida.

40

45

50

El agente terapéutico del trastorno de la córnea de la presente invención se administra preferentemente por vía tópica y, en especial, se administra preferentemente como una formulación oftálmica. Aunque la concentración del péptido PHSRN en la formulación oftálmica se puede ajustar de acuerdo con los síntomas, la edad, etc., y no se restringe a ninguna en particular, se encuentra preferentemente en el intervalo del 0,00001 % al 1 %. En el caso de una gota ocular, se administra de una a varias gotas a la vez de una a varias veces al día. Además de una gota ocular normal, la formulación oftálmica puede adoptar la forma de una gota ocular de tipo disolver solo en uso o de una pomada ocular. Para la formulación, se pueden emplear técnicas conocidas, es decir, se puede preparar una formulación oftálmica mediante un método usado normalmente y la adición de un agente de tonicidad tal como cloruro de sodio o cloruro de potasio; un agente tampón tal como hidrógenofosfato de sodio o dihidrógenofosfato de sodio; un estabilizante tal como edetato de sodio; un conservante tal como etilparabeno, butilparabeno o cloruro de benzalconio; un ajustador del pH tal como hidróxido de sodio o ácido clorhídrico diluido; una base de pomada ocular tal como vaselina blanca o parafina líquida, y otros aditivos según sea necesario.

55

60

65

El péptido PHSRN se puede producir de forma sencilla y barata mediante un método en fase sólida de crecimiento de la cadena peptídica a partir del terminal C sobre un vehículo polimérico insoluble, un método en

fase líquida que no use vehículo u otro método que se use normalmente para la síntesis de péptidos.

El uso del péptido PHSRN para potenciar la cicatrización de heridas de acuerdo con la presente invención sirve para producir la preparación oftalmológica a nivel comercial.

5

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA(S) FIGURA(S)

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los efectos del péptido PHSRN en la migración de las células epiteliales de la córnea. El eje de abscisas indica la concentración del péptido PHSRN (0 (control), 51,2 nM, 102,5 nM, 153,7 nM, 256,2 nM y 512,3 nM) y el de ordenadas indica la longitud de la migración ( $\mu\text{m}$ ) del epitelio de la córnea.

10

#### MEJOR MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

15

Para examinar la disponibilidad del péptido PHSRN para su uso en la estimulación de la cicatrización de heridas, los presentes inventores examinaron los efectos del péptido PHSRN en el trastorno de la córnea. La información detallada se indica en el apartado que figura más adelante relativo a los ensayos farmacológicos. Los presentes inventores han encontrado que la instilación oftálmica del péptido PHSRN proporciona (1) un efecto de migración del epitelio de la córnea en un sistema de cultivo de órganos de la córnea; y (2) un efecto de estimulación de la cicatrización de heridas tras la abrasión del epitelio de la córnea. Por lo tanto, se ha dilucidado que el péptido PHSRN está disponible para el tratamiento del trastorno de la córnea (es decir, úlcera corneal, erosión epitelial corneal, queratitis, sequedad ocular y otro trastorno en el que la córnea esté dañada debido a diversas causas y, en especial, la erosión del epitelio de la córnea) y la sequedad ocular.

20

25

Aunque ahora se describirán los ejemplos de preparación de la presente invención y los resultados de los ensayos farmacológicos, el ámbito de la técnica de la presente invención no se limita a las realizaciones descritas a continuación.

30

#### 1. Ejemplos de preparación

##### 1) Gotas oculares

35

Como Formulación 1, se preparó una gota ocular que contenía 0,01 g de Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>, 0,9 g de cloruro de sodio y una cantidad adecuada de agua purificada esterilizada en una cantidad total de 100 ml. De la misma manera que la Formulación 1, se prepararon gotas oculares que contenían respectivamente 0,00001 g, 0,00003 g, 0,0001 g, 0,0005 g, 0,001 g, 0,005 g, 0,05 g y 0,1 g de Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> en una cantidad total de 100 ml.

40

Como Formulación 2, se preparó una gota ocular que contenía 0,01 g de Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>, 0,8 g de cloruro de sodio, 0,1 g de hidrógenofosfato de sodio, una cantidad adecuada de dihidrógenofosfato de sodio y una cantidad adecuada de agua purificada esterilizada en una cantidad total de 100 ml. De la misma manera que la Formulación 2, se prepararon gotas oculares que contenían respectivamente 0,00001 g, 0,00003 g, 0,0001 g, 0,0005 g, 0,001 g, 0,005 g, 0,05 g y 0,1 g de Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> en una cantidad total de 100 ml.

45

##### 2) Pomada ocular

50

Como Formulación 3, se preparó una pomada ocular que contenía 0,05 g de Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>, 90 g de vaselina blanca y una cantidad adecuada de parafina líquida en una cantidad total de 100 gramos. De la misma manera que la Formulación 3, se prepararon pomadas oculares que contenían respectivamente 0,00001 g, 0,00003 g, 0,0001 g, 0,0005 g, 0,001 g, 0,005 g, 0,05 g y 0,1 g de Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> en una cantidad total de 100 g.

55

#### 2. Ejemplos

Se sintetizó Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> mediante un método en fase sólida. Usando este compuesto, se examinaron (1) la acción de migración del epitelio de la córnea *in vitro*; y (2) la acción de estimulación de la cicatrización de las heridas de la córnea *in vivo*. La información detallada se indica en el apartado de ensayos farmacológicos.

60

En comparación con los grupos de control, los grupos en los que se había añadido Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> mostraron claramente la migración de las capas de células epiteliales de la córnea y la cicatrización rápida de las heridas corneales. De este modo, se demostró que Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> es eficaz como un agente terapéutico para el trastorno de la córnea.

65

#### 3. Ensayos farmacológicos

(1) Acción sobre la migración del epitelio de la córnea (*in vitro*)

5 Usando la córnea de conejos blancos japoneses macho, se examinaron los efectos sobre la migración del epitelio de la córnea usando la longitud de migración del epitelio de la córnea en un sistema de cultivo de órganos de la córnea como índice de acuerdo con el método de Nishida *et al.* (*J. Cell. Biol.*, 97, pág. 1653-1657 (1983)).

10 (Método experimental)

10 Se cortaron bloques de córnea (tres por grupo) de tejido corneal de conejo. Se incubaron estos bloques de córnea durante 20 horas en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % en un medio de cultivo (Medio-199) que contenía el compuesto de ensayo. Tras la incubación, se fijaron los bloques de córnea en una solución mixta de etanol y ácido acético glacial (relación en volumen de 95:5), se embebieron en parafina y se prepararon como secciones. 15 Tras la desparafinación, se tiñeron las secciones con hematoxilina-eosina y se midió la longitud de migración de la capa de células epiteliales bajo un microscopio. Como control, se usaron bloques de córnea incubados en un medio de cultivo que no contenía el compuesto de ensayo.

20 (Resultados)

20 Como se muestra en la Fig. 1, la incubación en un medio que contenía Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> presentó una estimulación significativa de la migración del epitelio de la córnea.

25 (2) Acción de estimulación de la cicatrización de heridas de la córnea 1 (*in vivo*)

25 Usando un conejo blanco japonés macho, se produjo una herida de aproximadamente 6 mm de diámetro en la córnea mediante la inducción de la abrasión del epitelio de la córnea de acuerdo con el método de Cintron *et al.* (*Ophthalmic Res.*, 11, pág. 90-96 (1979)). Se midió la superficie de la herida usando la superficie teñida con fluoresceína como índice. Se examinaron los efectos del compuesto de ensayo sobre la cicatrización de las 30 heridas de la córnea.

(Método experimental)

35 Se instilaron gotas oculares que contenían las respectivas concentraciones del compuesto de ensayo (30 µl cada vez) a las 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 27, 30, 33, 36, 42 y 48 horas de la inducción de la abrasión del epitelio de la córnea. En la medición de la superficie de la herida, se llevó a cabo la tinción con fluoresceína y se midió una fotografía de la córnea. La superficie teñida de fluoresceína de la córnea fotografiada se calculó usando un sistema de procesamiento de análisis de imágenes. Como control, se usó un conejo en el que se había instilado el agente de base (PBS) que no contenía el compuesto de ensayo.

40 (Resultados)

45 Las Tablas 1 y 2 que se presentan a continuación muestran los efectos posteriores al tratamiento con Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> (PHSRN) en un modelo de heridas en la córnea de conejo en forma de relación de cicatrización. Como se muestra en las Tablas 1 y 2, la instilación del péptido PHSRN generó una estimulación significativa de la cicatrización de las heridas.

50 En las Tablas 1 y 2, los respectivos valores indican el valor medio ± la desviación estándar (n = 6). El análisis estadístico se llevó a cabo usando la comparación múltiple de Dunnett con respecto a PBS, estableciéndose la superficie de la parte de la herida de la córnea inmediatamente después (0 horas después) de la abrasión epitelial de la córnea como el 100 % (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01; frente al control).

[Tabla 1]

< Efectos tras el tratamiento (relación de cicatrización) con PHSRN en un modelo de heridas en la córnea de conejo >							
Relación de cicatrización (%)	0 h	6 h		12 h		24 h	
PBS	0	4,96 ± 3,28		19,14 ± 5,04		54,36 ± 9,00	
PHSRN 2 µM	0	9,66 ± 2,21	*	26,71 ± 2,62	**	61,91 ± 3,08	
PHSRN 20 µM	0	10,73 ± 3,21	**	28,01 ± 1,92	**	64,07 ± 3,98	*
PHSRN 200 µM	0	11,06 ± 3,50	**	28,69 ± 4,10	**	67,70 ± 5,37	**
PHSRN 2.000 µM	0	11,15 ± 1,25	**	28,99 ± 2,65	**	69,49 ± 3,17	**

EGF 5 $\mu$ M	0	14,49 $\pm$ 3,42	**	31,63 $\pm$ 1,29	**	70,78 $\pm$ 6,91	**
---------------	---	------------------	----	------------------	----	------------------	----

[Tabla 2]

< Efectos tras el tratamiento (relación de cicatrización) con PHSRN en un modelo de heridas en la córnea de conejo >				
Relación de cicatrización (%)	36 h		48 h	
PBS	84,49 $\pm$ 11,60		97,09 $\pm$ 5,98	
PHSRN 2 $\mu$ M	88,08 $\pm$ 4,03		99,14 $\pm$ 1,90	
PHSRN 20 $\mu$ M	89,09 $\pm$ 6,42		99,15 $\pm$ 1,52	
PHSRN 200 $\mu$ M	94,97 $\pm$ 4,63	*	100,00 $\pm$ 0,00	
PHSRN 2.000 $\mu$ M	95,39 $\pm$ 3,06	*	100,00 $\pm$ 0,00	
EGF 5 $\mu$ M	96,41 $\pm$ 3,97	*	99,58 $\pm$ 1,03	

5 (3) Acción de estimulación de la cicatrización de heridas de la córnea 2 (*in vivo*)

Usando el mismo método que en (2) anterior, se indujo la abrasión del epitelio de la córnea en un conejo blanco japonés para producir una herida de aproximadamente 8 mm de diámetro en la córnea. La superficie de la herida se midió usando la superficie teñida de fluoresceína como índice para examinar los efectos sobre la curación de

10

(Método experimental)

Se instilaron gotas oculares que contenían las respectivas concentraciones del compuesto de ensayo (25  $\mu$ l cada vez) a las 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 y 54 horas de la inducción de la abrasión del epitelio de la córnea. En la medición de la superficie de la herida, se llevó a cabo la tinción con fluoresceína y se midió una fotografía de la córnea. La superficie teñida de fluoresceína de la córnea fotografiada se calculó usando un sistema de procesamiento de análisis de imágenes. Como control, se usó un conejo en el que se había instilado el agente de base (solución salina fisiológica) que no contenía el compuesto de ensayo.

15

20

(Resultados)

Las Tablas 3 y 4 que se presentan a continuación muestran los efectos posteriores al tratamiento con Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> (PHSRN) en un modelo de heridas en la córnea de conejo en forma de relación de cicatrización. Como se muestra en las Tablas 3 y 4, la instilación del péptido PHSRN generó una estimulación significativa de la cicatrización de las heridas.

25

En las Tablas 3 y 4, los respectivos valores indican el valor medio  $\pm$  la desviación estándar (n = 6). El análisis estadístico se llevó a cabo usando la comparación múltiple de Dunnett con respecto a la solución salina fisiológica, estableciéndose la superficie de la parte de la herida de la córnea inmediatamente después (0 horas después) de la abrasión epitelial de la córnea como el 100 % (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01; frente al control).

30

[Tabla 3]

<Efectos tras el tratamiento (relación de cicatrización) con PHSRN en un modelo de heridas en la córnea de conejo>									
Relación de cicatrización (%)	0 h	12 h		18 h		24 h		30 h	
Solución salina fisiológica	0	8,27 $\pm$ 3,38		23,12 $\pm$ 4,05		52,71 $\pm$ 5,36		52,71 $\pm$ 5,36	
Ácido hialurónico al 0,3 %	0	13,98 $\pm$ 4,88	*	28,4 $\pm$ 63,37	*	60,78 $\pm$ 8,07	**	60,78 $\pm$ 8,07	*
PHSRN al 0,04 %	0	13,57 $\pm$ 3,74	*	29,4 $\pm$ 63,29	**	58,71 $\pm$ 6,32	**	58,71 $\pm$ 6,32	**

35

[Tabla 4]

<Efectos tras el tratamiento (relación de cicatrización) con PHSRN en un modelo de heridas en la córnea de conejo>				
Relación de cicatrización (%)	36 h	48 h	54 h	72 h

<Efectos tras el tratamiento (relación de cicatrización) con PHSRN en un modelo de heridas en la córnea de conejo>								
Relación de cicatrización (%)	36 h		48 h		54 h		72 h	
Solución salina fisiológica	65,63 ± 6,69		87,06 ± 7,72		94,46 ± 6,50		99,7 ± 20,80	
Ácido hialurónico al 0,3 %	71,62 ± 11,02		90,19 ± 9,51		95,35 ± 6,44		99,92 ± 0,22	
PHSRN al 0,04 %	70,29 ± 8,38		88,27 ± 8,74		94,24 ± 6,62		98,93 ± 2,16	

EFFECTOS DE LA INVENCION

5 Los ensayos farmacológicos anteriores muestran que el péptido PHSRN, que es el sitio de expresión de la actividad mínima de la fibronectina, presenta una acción de estimulación de la cicatrización de las heridas del epitelio de la córnea y está disponible como uno o ambos de entre un agente preventivo y un agente terapéutico para la úlcera corneal, la erosión del epitelio de la córnea, la queratitis, la sequedad ocular, etc., estando la córnea sometida a daños por cualquiera de diversas causas.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> NIHON TENGANYAKU KENKYUSHO CO., Ltd.

<120> Composición oftalmológica

20 <130> JP0305NIT

<150> JP2002-381131

<151> 27-12-2002

25 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211>5

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia parcial de la fibronectina

35

<400> 1

**Pro His Ser Arg Asn**

**1**

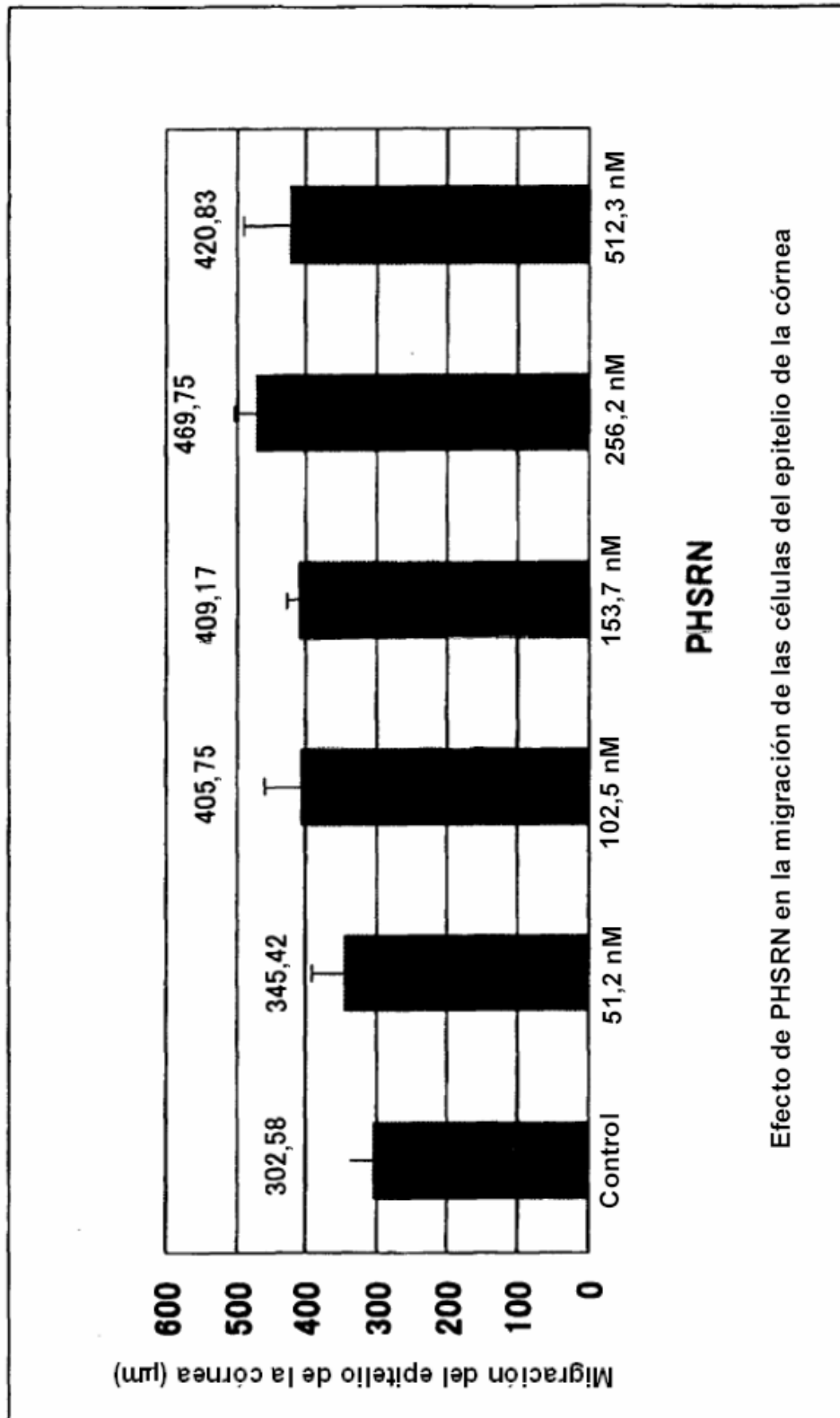
**5**



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso del péptido PHSRN o de una sal del mismo en la preparación de una formulación oftálmica para la estimulación de la cicatrización de las heridas producidas en el epitelio de la córnea.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha herida está causada por el trastorno de la córnea que es úlcera corneal, erosión del epitelio de la córnea, queratitis o sequedad ocular.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la formulación está en forma de gotas oculares o pomada ocular.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el PHSRN está presente en un intervalo de concentraciones del 0,00001 al 1 %.
- 15 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que la formulación de gotas oculares comprende además al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en un agente tampón, un agente de tonicidad y un estabilizante.
- 20 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente de tonicidad comprende además cloruro de sodio o cloruro de potasio.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que el agente tampón comprende además hidrógenofosfato de sodio y/o dihidrógenofosfato de sodio.
- 25 8. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en el que la formulación de pomada ocular comprende además una base de pomada ocular.
- 30 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la base de pomada ocular comprende además vaselina blanca y/o parafina líquida.
10. El péptido PHSRN para su uso en la estimulación de la cicatrización de heridas en el epitelio de la córnea.
- 35 11. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el PHSRN está presente en un intervalo de concentraciones del 0,00001 al 1 %.
12. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha herida está causada por el trastorno de la córnea que es úlcera corneal, erosión del epitelio de la córnea, queratitis o sequedad ocular.

FIG. 1



Efecto de PHSRN en la migración de las células del epitelio de la córnea