

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02824164.9

[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)

[45] 授权公告日 2006 年 7 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1263770C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

C07K 14/65 (2006.01)

[22] 申请日 2002.12.3 [21] 申请号 02824164.9

[30] 优先权

[32] 2001.12.3 [33] JP [31] 368103/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/012632 2002.12.3

[87] 国际公布 WO2003/048192 日 2003.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.2

[71] 专利权人 参天制药株式会社

地址 日本大阪府

共同专利权人 西田辉夫

[72] 发明人 西田辉夫 干 诚 中村雅胤

审查员 林峻凯

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 杨宏军

权利要求书 2 页 说明书 22 页

[54] 发明名称

新型肽及其药物用途

[57] 摘要

本发明公开了一种新型肽及其药物用途。本发明的目的在于寻找胰岛素样生长因子 - I 的最小活性表达单元，开发其在眼科及皮肤科领域内的药物用途。并用含有作为胰岛素样生长因子 - I 的最小活性表达单元的用 Ser - Ser - Ser - Arg 表示的氨基酸序列的肽和含有用 Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 表示的氨基酸序列的肽对角膜疾病的治愈有效，并显著促进皮肤的创伤愈合。

1、一种肽或其可药用盐类，所述肽为氨基酸序列用 Ser - Ser - Ser - Arg、Ser - Ser - Ser - Arg - Arg、Gyl - Ser - Ser - Ser - Arg、
5 Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg、Ala - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg - Ala - Pro、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Ala - Ala - Pro、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg - Ala - Pro 或 Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Ala - Ala - Ala - Pro 表示的肽。

2、一种药物组合物，所述药物组合物含有肽或其可药用盐类为
10 有效成分，与可药用的添加物配合而成，所述肽为氨基酸序列用 Ser - Ser - Ser - Arg、Ser - Ser - Ser - Arg - Arg、Gyl - Ser - Ser - Ser - Arg、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg、Ala - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg - Ala - Pro、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Ala - Ala - Pro、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg - Ala - Pro 或 Gly - Ser - Ser - Ser - Arg -
15 Ala - Ala - Ala - Pro 表示的肽。

3、一种角膜疾病治疗剂，所述角膜疾病治疗剂含有下述成分：1) 肽或其可药用盐类，所述肽为氨基酸序列用 Ser - Ser - Ser - Arg、Ser - Ser - Ser - Arg - Arg、Gyl - Ser - Ser - Ser - Arg、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg、Ala - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg - Ala - Pro、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Ala - Ala - Pro、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg - Ala - Pro 或 Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Ala - Ala - Ala - Pro 表示的肽，2) 肽或其可药用盐类，所述肽为氨基酸序列用 Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Gly - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Tyr - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Gln - Phe -
25 Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Arg - Pro - Lys - Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 或 Tyr - Arg - Pro - Lys - Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 表示的肽。

4、如权利要求 3 所述的角膜疾病治疗剂，其中，角膜疾病为角膜溃疡、角膜上皮剥离、角膜炎或干眼症。

5、如权利要求 3 所述的角膜疾病治疗剂，其中，剂型为滴眼剂。

6、一种皮肤创伤愈合促进剂，所述皮肤创伤愈合促进剂含有下述成分：1) 肽或其可药用盐类，所述肽为氨基酸序列用 Ser - Ser - Ser - Arg、Ser - Ser - Ser - Arg - Arg、Gyl - Ser - Ser - Ser - Arg、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg、Ala - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg - Ala - Pro、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Ala - Ala - Pro、Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Arg - Ala - Pro 或 Gly - Ser - Ser - Ser - Arg - Ala - Ala - Ala - Pro 表示的肽，2) 肽或其可药用盐类，所述肽为氨基酸序列用 Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Gly - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Tyr - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Arg - Pro - Lys - Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 或 Tyr - Arg - Pro - Lys - Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 表示的肽。

7、如权利要求 6 所述的皮肤创伤愈合促进剂，其中，皮肤创伤为裂伤、擦伤、外科手术的切开创口、皮肤溃疡或烧伤。

8、如权利要求 6 所述的皮肤创伤愈合促进剂，其中，剂型为软膏剂或贴付剂。

新型肽及其药物用途

5 技术领域

本发明涉及一种含有用 Ser - Ser - Ser - Arg 表示的氨基酸序列的新型肽、以同一肽为有效成分的药物组合物、及以含有用 Ser - Ser - Ser - Arg 表示的氨基酸序列的肽与含有用 Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 表示的氨基酸序列的肽为有效成分的角膜疾病治疗剂或皮肤创伤愈合促进剂。

背景技术

角膜是直径约 1cm、厚度约 1mm 的透明无血管的组织。角膜的透明性对视觉功能有很重要的影响，角膜的各种生理生化现象主要是以维持角膜透明性为目的的功能。

对于由角膜溃疡、角膜上皮剥离、角膜炎或干眼症等各种疾病引起的角膜上皮缺损，如果未并发混合感染，则能够自然修复。但是，如果因某种原因导致修复延迟，或没有进行修复，导致上皮缺损加重，则不仅对上皮的正常结构产生不良影响，而且能损伤至实质或内皮的结构或功能。现有治疗方法的原理为保护角膜表面免受外界刺激从而使上皮自然伸展，以便再覆盖缺损部，为被动性方法。近年来，随着细胞生物学的发展，逐渐明确了与细胞分裂·移动·粘合·伸展等有关的因子，有报道称在角膜上皮缺损的修复中，促进角膜上皮伸展的化合物起着重要的作用（临眼，46，738 - 743（1992），眼科手术，5，719 - 727（1992））。

胰岛素样生长因子与表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子、转换生长因子等同样是调节正常人体细胞生长的生长因子之一，其中，包括胰岛素样生长因子 - I（以下称为“IGF - I”）和胰岛素样生长因子 - II（以下称为“IGF - II”）。最近也有报道称 IGF

- I 能够刺激甲状腺细胞增殖 (J. Biol. Chem., 264, 18485 ~ 18488(1989)) 以及 IGF - II 能够调节肌肉的生长或分化 (Hum. Mol. Genet., 3, 1117 ~ 1121(1994)) 等。在眼科领域内, IGF - I、IGF - II 及其功能性衍生物促进视网膜神经元的生存 (特表平 7 - 500839 号公报), IGF - II 对以角膜移植时的损伤为代表的广范围的所有损伤的治疗有效 (特开昭 63 - 233925 号公报), 通过使用含有上述生长因子的溶液, 即使在低温状态下, 也能够使用于移植的角膜等眼组织保持新鲜的组织状态 (特开平 5 - 25001 号公报、特开平 6 - 48901 号公报)。而且, 也公开了通常含有生长因子的凝胶配合物对前眼部为代表的创伤愈合有效 (特开平 2 - 112 号公报) 的内容。

另一方面, P 物质是由显示血管扩张、平滑肌收缩、促进唾液腺分泌、利尿作用等的 11 个氨基酸构成的多肽。对于 P 物质而言, 在眼科领域内, 也公开了其对眼科疾病中结膜杯状细胞异常分泌的改善作用 (国际专利 WO95/13087 号公开公报), 报道了角膜炎等炎症时 P 物质的动态 (日本眼科学会杂志, 91, 982 ~ 987(1987)、日本眼科学会杂志, 92, 448 ~ 452(1988)) 等, 进行了各种研究。另外, 在特开平 10 - 17489 号公报中记载了如下内容: 如果将作为 P 物质 C 末端侧的四肽的 Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ (以下称为“FGLM”) 与 IGF - I 并用, 则能够促进角膜上皮的创伤愈合, 且 FGLM 是表现出这一作用的 P 物质的肽段的最小单元。但是, IGF - I 是由 70 个单氨基酸键合而成的多肽, IGF - I 的哪一个氨基酸序列部位有助于表现出这一效果并未完全明确。

皮肤创伤为裂伤、擦伤、外科手术的切开创口、皮肤溃疡、烧伤等表皮组织的损伤。这些皮肤创伤的治疗通常为在对受伤部位实施应急处理后, 凭借生物体自身的恢复力来自然愈合, 在这类自然愈合中, 到恢复为止需要很长时间, 另外, 由于疼痛也在持续, 因此希望通过对受伤部位给予创伤治疗剂等方式积极地促进创伤愈合。

创伤的愈合过程中, 通过细胞的移动或增殖, 形成新的上皮组织或结缔组织, 因此与创伤愈合有关的促进或刺激细胞移动·分化·增

殖的药剂能够成为创伤治疗剂。作为此类创伤治疗剂，已知有氯化溶菌酶、素高捷疗眼膏（Solcoceryl）等。

但是，现有的创伤治疗剂对创伤愈合的促进作用不够充分，存在无法在短期内治愈创伤的问题。存在上述问题的原因在于这些创伤治疗剂对作为创伤愈合过程中的重要因素的表皮再覆盖、胶原合成、末梢循环改善、肉芽形成、血管形成等的作用小。

然而，还没有与 IGF-I 的最小活性表达单元有关的报道，也没有与含有用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的肽有关的报道。另外，也没有说明将含有用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的肽与含有用 Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ 表示的氨基酸序列的肽并用对角膜损害的作用或对皮肤疾病的作用。

通常情况下，如果将由多种氨基酸构成的肽给予生物体，则经代谢等作用容易将肽键切断，另外，在为了作为药物使用而进行制剂的阶段，容易发生分解。因此，虽然希望肽链尽可能短，但是必须维持药理活性，因此寻找长链肽的最小活性表达单元是药物开发中的重要课题。IGF-I 是由 70 个单氨基酸构成的长链肽，寻找 IGF-I 的最小活性表达单元在开发更有用的药品方面是非常重要的课题。另外，使用这一最小活性表达单元，就具体的药理作用、即对角膜疾病的作用或皮肤创伤的作用进行研究也是非常有意义的课题。

发明内容

本发明人等合成了 IGF-I 的各种肽段，将肽段与 P 物质或 FGLM 并用，实施与角膜上皮伸展有关的药理试验，由此发现 IGF-I 的最小活性表达单元为用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列（以下称为“SSSR”）。另外，还发现如果并用含有用 SSSR 表示的氨基酸序列的肽与 P 物质或 FGLM，则能够促进角膜疾病的治愈及皮肤的创伤愈合。即，发现（1）含有用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的肽或其类似物或其可药用盐类与（2）含有用 Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ 表示的氨基酸序列的肽或其类似物或其可药用盐类的组合物因各种因

素的作用，可以有效地用作角膜疾病状态下的角膜溃疡、角膜上皮剥离、角膜炎或干眼症等角膜疾病的治疗剂或裂伤、擦伤、外科手术切开创口、皮肤溃疡、烧伤等皮肤创伤或以此为起因的坏死等疾病的治疗剂。需要说明的是本发明的角膜疾病治疗剂及皮肤创伤愈合促进剂
5 可以与已经确认具有创伤愈合效果的抗坏血酸、抗坏血酸酯、抗坏血酸的盐、泛酸、泛酸的盐等配合使用。

IGF-I 由 A、B、C 及 D 的各结构域构成，由于 A 结构域及 B 结构域具有与胰岛素或 IGF-II 相类似的结构，因此本发明人等着眼于 IGF-I 的 C 结构域及 D 结构域研究角膜上皮伸展作用。将构成 C 结
10 构域的肽或构成 D 结构域的肽与 P 物质并用，实施角膜上皮伸展试验时，确认作为构成 C 结构域的肽的 Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr（以下称为“GYGSSSRRAPQT”）有活性。接下来，由于即使从 GYGSSSRRAPQT 的两个末端分别切去 2 个氨基酸也能够维持活性，因此使用丙氨酸扫描（alanine scanning）
15 方法，合成 Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro（以下称为“GSSSRRAP”）的氨基酸依次转换为丙氨酸的物质，在 P 物质或 FGLM 共存下，实施角膜上皮伸展试验时，由于含有用 SSSR 表示的氨基酸序列的肽全部表现出活性，因此判断 SSSR 是表现出角膜上皮伸展作用所必需的最小的 IGF-I 的肽段。

20 本发明人等主要完成了以下 4 个发明。

第一个发明涉及含有用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的新型肽或其衍生物或其可药用盐类。

该第一个发明的特征为发现了作为 IGF-I 最小活性表达单元的新型肽，即含有用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的新型肽。含有用
25 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的肽或其衍生物（以下将该肽与其衍生物总称为“SSSR 衍生物”）只要是含有用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的新型肽即可，没有特别的限定。该肽的衍生物是指在含有用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的肽上结合了对肽的活性表达没有影响的 1 个或多个氨基酸的物质，N 末端用酰基等广泛用于肽的保护基

保护的物质, C 末端用酯、酰胺等广泛用于肽的保护基保护的物质等, 另外, 也包括 Ser 残基的羟基经广泛使用的保护基保护的物质或 Arg 残基的氨基用广泛使用的保护基保护的物质。更具体而言, 作为 SSSR 衍生物, 例如以 SSSR、GSSSRRAP 为代表, 可以举出 Ser-Ser-Ser-Arg-Arg (以下简记为“SSSRR”)、Gly-Ser-Ser-Ser-Arg (以下简记为“GSSSR”)、Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg (以下简记为“GSSSRR”)、Ala-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro (以下简记为“ASSSRRAP”)、Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Ala-Ala-Pro (以下简记为“GSSSRAAP”)、Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Ala-Ala-Ala-Pro (以下简记为“GSSSRAAAP”) 等。构成上述肽的氨基酸中存在 L-体、D-体、DL-体, 均包含在本发明内。如在各项药理试验中的具体结果所示, 肽链中含有用 SSSR 表示的氨基酸序列的 SSSR 衍生物通过与 P 物质或 FGLM 并用, 全部表现出角膜上皮伸展效果及皮肤创伤愈合促进效果。

15 本发明的 SSSR 衍生物可以使用肽自动合成机、按照公知的方法进行制造, 其详细内容在实施例中叙述。

第二个发明涉及以含有用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的新型肽或其衍生物或其可药用盐类作为有效成分、配合有可药用的添加物的药物组合物。

20 第三个发明涉及以 (1) 含有用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的肽或其类似物或其可药用盐类与 (2) 含有用 Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ 表示的氨基酸序列的肽或其类似物或其可药用盐类作为有效成分的角膜疾病治疗剂。

25 第四个发明涉及含有以上述成分 (1) 与上述成分 (2) 作为有效成分的皮肤创伤愈合促进剂。

第三及第四个发明的特征为通过并用最小活性表达单元用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的肽与最小活性表达单元用 Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ 表示的肽, 表现出优良的角膜上皮伸展效果及促进皮肤创伤愈合促进效果。

在第三及第四个发明中，含有用 Ser - Ser - Ser - Arg 表示的氨基酸序列的肽或其类似物（以下将该肽与其类似物总称为“SSSR 类似物”）只要是含有用 Ser - Ser - Ser - Arg 表示的氨基酸序列的肽即可，没有特别的限定。该肽的类似物是指在含有用 Ser - Ser - Ser - Arg 表示的氨基酸序列的肽上结合了对其活性表达没有影响的 1 个或多个氨基酸的物质，N 末端用酰基等广泛用于肽的保护基保护的物质，C 末端用酯、酰胺等广泛用于肽的保护基保护的物质等，另外，也包括 Ser 残基的羟基经广泛使用的保护基保护的物质或 Arg 残基的氨基用广泛使用的保护基保护的物质。更具体而言，作为 SSSR 类似物，例如，除了上述的 SSSR 衍生物以外，可以举出 GYGSSRRAPQT 等。构成 SSSR 类似物的肽的氨基酸中存在 L - 体、D - 体、DL - 体，均包含在本发明内。更优选的方式为全部由 L - 体的氨基酸构成的肽。

另外，含有用 Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 表示的氨基酸序列的肽或其类似物（以下将该肽与其类似物总称为“FGLM 类似物”）只要是含有用 Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 表示的氨基酸序列的肽即可，没有特别的限定。该肽的类似物是指在含有用 Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 表示的氨基酸序列的肽上结合了对其活性表达没有影响的 1 个或多个氨基酸的物质，或 N 末端用酰基等广泛用于肽的保护基保护的物质。更具体而言，作为 FGLM 类似物，例如以 P 物质、FGLM 为代表，可以举出作为美国专利 3862114 号中具体公开的由 4 ~ 12 个氨基酸构成的多肽的 Tyr - Arg - Pro - Lys - Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Tyr - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂、Gly - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ 等。作为更优选的具体例，有 P 物质、FGLM。构成上述物质的氨基酸中也存在 L - 体、D - 体、DL - 体，均包含在本发明内。本发明中更优选的方案为全部由 L - 体的氨基酸构成的肽。

在本发明中，作为可药用盐类，例如可以举出盐酸盐、硫酸盐、

磷酸盐、乳酸盐、马来酸盐、富马酸盐、草酸盐、甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐等。

在本发明中，并用 SSSR 类似体与 FGLM 类似体表现出促进角膜上皮伸展及皮肤创伤愈合的作用。表现出这些作用的 SSSR 类似物的种类及 FGLM 类似物的种类没有特别限定，作为更优选的实施方案，可以举出将作为 IGF-I 的最小活性表达单元的 SSSR 与作为 P 物质的最小活性表达单元的 FGLM 组合使用的方案。

本发明的角膜疾病治疗剂及皮肤创伤愈合促进剂可以使用广泛使用的技术进行调制，将 SSSR 类似物或其可药用盐类、与 FGLM 类似物或其可药用盐类分别制成单独制剂或制成配合制剂，可以采用非经口途径或经口途径给药，更优选由非经口途径给药。

作为角膜疾病治疗剂的优选给药剂型，可以举出滴眼剂、眼膏等。上述剂型可以采用广泛使用的技术进行调制。例如，滴眼剂可以使用氯化钠等等渗剂、磷酸钠等缓冲剂、苯扎氯铵等防腐剂等进行调制。pH 只要在眼科制剂允许的范围内即可，优选在 4~8 的范围内。

角膜疾病治疗剂的给药量可以根据症状、年龄、剂型等进行适当选择，如果是滴眼剂，则 SSSR 类似物或其可药用盐类的量可以为 0.001~10% (w/v) (优选为 0.01~1% (w/v))，1 日滴眼 1 次~数次即可。另外，FGLM 类似物或其可药用盐类的量可以为 0.00001~0.1% (w/v) (优选为 0.0001~0.01% (w/v))，1 日滴眼 1 次~数次即可。

当然，也可以将上述两成分同时配合制成滴眼剂等制剂。

另外，作为皮肤创伤愈合促进剂的优选制剂形式，可以举出软膏剂、凝胶剂、巴布剂、贴付剂、洗剂、霜剂、喷雾剂、气雾剂、硬膏剂、悬浮剂、乳剂等，另外，可以选择适当的溶剂调制液体剂型。另外，为了调制皮肤创伤愈合促进剂，可以根据剂型添加填充剂、赋形剂、基质、增量剂、pH 调整剂、可溶化剂、悬浮化剂、缓冲剂、稳定剂、保存剂、表面活性剂、抗氧化剂、分散剂、乳化剂、溶解剂、助溶剂等。

作为上述制剂的载体，例如，可以举出白色凡士林、液体石蜡、凝胶化烃、十六烷醇、聚乙二醇、明胶、玉米淀粉、藻酸钠、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、亲水性液体石蜡、明胶、糊精、十六烷醇、硬脂醇、聚乙二醇、聚乙烯醇、甲氧基乙烯-马来酸酐共聚物、聚乙烯基醚、以乙烯基吡咯烷酮为构成成分的聚合物·共聚物、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯扎氯铵、橄榄油、山茶油、大豆油等油脂类、乳糖、水等。

本发明的皮肤创伤愈合促进剂可以根据创伤部位或创伤的程度采用各种形式进行给药。例如，作为外用药使用时，优选将本药直接涂布、喷雾或贴附在皮肤等所需要的部位（患部）上。

本发明的皮肤创伤愈合促进剂的给药量可以考虑症状、年龄、剂型等因素进行适当选择。SSSR 类似物或其可药用盐类的给药量通常为每日 0.001 ~ 1000mg，优选为 0.01 ~ 500mg，每日给药 1 次或分数次给药。另外，FGLM 类似物或其可药用盐类的给药量通常为每日 0.01 ~ 5000mg，优选为 0.1 ~ 1000mg，每日给药 1 次或分数次给药。

当然，可以将上述两成分同时配合制成软膏等制剂。

下面，给出制造例、制剂例及药理试验结果，这些具体例用于更好地理解本发明，本发明的范围并不限于此。

20 具体实施方式

[制造例]

本发明中使用的 SSSR 类似物的代表性制造例如下所述。

1、SSSR 的制造

使用肽自动合成机 430A（Applied Biosystems 公司生产），按已经设定的软件、根据叔丁氧羰基（BOC）法合成保护肽树脂。起始原料使用 N-甲基-（4-甲氧基苯基）乙酰胺[Boc-Arg（Tos）PAM]树脂载体（0.5mmol（scale））。在本合成方法中，为了除去作为 Na-氨基保护基的 Boc 基，使用 30% 三氟乙酸（TFA）/二氯甲烷、70% TFA/二氯甲烷，洗涤时使用 N-甲基-2-吡咯烷酮（NMP）/二氯

甲烷。作为缩合剂的 N,N' -二环己基碳二亚胺 (DCC) 及 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 与 N -保护氨基酸的 Boc-Ser (OBzl) 衍生物相对于氨基分别使用 4 当量, 反应溶剂使用二甲亚砜 (DMSO) - NMP (8:2)。缩合反应结束后, 作为完全封闭残留氨基的操作, 使用乙酸酐/ N,N' -二异丙基乙胺 (DIEA) 防止生成缺陷肽。除去 Boc 基, 反复进行 Boc-Ser (OBzl) 的缩合, 构筑最终保护肽。利用无水氢氟酸 (HF) 处理 (HF: 对甲酚 = 8: 2 (V/V), $-2 \sim -5^{\circ}\text{C}$, 60 分钟), 从得到的保护肽树脂上切去肽, 并脱离全部的保护基。反应后, 蒸馏除去 HF, 用 0.1% 三氟乙酸水溶液萃取肽, 将粗产物制成冻干粉末后, 用于分离提取精制。使用岛津制作所生产的 HPLC LC8A (柱: YMC 生产 ODS $30 \times 240\text{mm}$), 用乙腈/水 (含有 0.1% TFA)、以 0.5~2% 的梯度 (80 分钟) 进行分离提取精制。收集得到的目标物质的高纯度馏分, 蒸馏除去乙腈后, 进行冻干, 得到目标化合物的 TFA 盐 70mg (收率 32%)。

15 氨基酸分析 (水解条件: 6N HCl, 110°C , 22 小时)

Ser (3) 2.74, Arg (1) 1.00

HPLC 分析 [Column: YMC Pak ODS - A ($4.6\text{mm I.D.} \times 150\text{mm}$), Eluent: 1 - 60% $\text{CH}_3\text{CN}/5\text{mM } \text{CF}_3\text{CF}_2\text{COOH}$ (25min), Temp.: 25°C , Flow rate: 1.0ml/min, Detector: 220nm]

20 纯度 (HPLC): 98.5%

质谱 (ESI-MS)

$\text{MH}^+ = 436.2$ (Theor. = 436.25, mono isotopic)

2、SSSR 类似物的制造

进行与 SSSR 同样的操作, 制造 GSSSR、SSSRR、GSSSRR、
25 GSSSRRAP、ASSSRRAP、GSSSRAAP、GSSSRAAAP。以下给出代表性肽的物性。

(1) GSSSR

氨基酸分析 (水解条件: 6N HCl, 110°C , 22 小时)

Ser (3) 2.76, Gly (1) 1.00, Arg (1) 1.00

HPLC 分析[Column: YMC Pak ODS – A (4.6mmI.D. × 150mm) ,
Eluent: 1 ~ 60 % CH₃CN/5mM CF₃CF₂COOH (25min) , Temp.: 25
℃ , Flow rate: 1.0ml/min, Detector: 220nm]

纯度 (HPLC) : 98.5 %

5 质谱 (ESI – MS)

MW = 492.3 (Theor. = 492.5)

(2) SSSRR

氨基酸分析 (水解条件: 6N HCl, 110℃ , 22 小时)

Ser (3) 2.76, Arg (2) 2.00

10 HPLC 分析[Column: YMC Pak ODS – A (4.6mmI.D. × 150mm) ,
Eluent: 1 – 60 % CH₃CN/0.1 % CF₃COOH (25min) , Temp.: 25℃ ,
Flow rate: 1.0ml/min, Detector: 220nm]

纯度 (HPLC) : 99.7 %

质谱 (ESI – MS)

15 MW = 591.5 (Theor. = 591.6)

(3) GSSSRR

氨基酸分析 (水解条件: 6N HCl, 110℃ , 22 小时)

Ser (3) 2.73, Gly (1) 0.98, Arg (2) 2.00

20 HPLC 分析[Column: YMC Pak ODS – A (4.6mmI.D. × 150mm) ,
Eluent: 1 – 60 % CH₃CN/0.1 % CF₃COOH (25min) , Temp.: 25℃ ,
Flow rate: 1.0ml/min, Detector: 220nm]

纯度 (HPLC) : 99.3 %

质谱 (ESI – MS)

MW = 648.5 (Theor. = 648.7)

25 (4) GSSSRRAP

氨基酸分析 (水解条件: 6N HCl, 110℃ , 22 小时)

Ser (3) 2.68, Gly (1) 0.99, Ala (1) 1.01, Arg (2) 2.00

HPLC 分析[Column: YMC Pak ODS – A (4.6mmI.D. × 150mm) ,
Eluent: 1 – 60 % CH₃CN/0.1 % CF₃COOH (25min) , Temp.: 25℃ ,

Flow rate: 1.0ml/min, Detector: 220nm]

纯度 (HPLC): 98.6%

质谱 (ESI-MS)

MW = 816.7 (Theor. = 816.9)

5 [制剂例]

本发明中使用的代表性制剂例如下所示。

1、滴眼剂

使用广泛使用的方法调制以下处方的滴眼剂。

10 处方例 1

100ml 中

SSSR	1mg
氯化钠	900mg
氢氧化钠	适量
盐酸	适量
灭菌精制水	适量

可以与处方例 1 同样地调制 100ml 中含有 SSSR 0.01mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、5mg、10mg、50mg、100mg 的滴眼液。

处方例 2

100ml 中

GSSSR	1mg
FGLM	100mg
氯化钠	900mg
氢氧化钠	适量
盐酸	适量
灭菌精制水	适量

15 可以与处方例 2 同样地调制 100ml 中含有 FGLM 1mg、5mg、10mg、50mg、500mg、1000mg 的滴眼液。

处方例 3

100ml 中

SSSR	1mg
FGLM	100mg
氯化钠	900mg
氢氧化钠	适量
盐酸	适量
灭菌精制水	适量

可以与处方例 3 同样地调制 SSSR(0.01mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、10mg、50mg、100mg) 与 FGLM (1mg、5mg、10mg、50mg、500mg、1000mg) 任意组合而成的滴眼液。

5 2、软膏剂

处方例 4

100g 中

SSSR	10mg
FGLM	100mg
液体石蜡	10g
白色凡士林	适量

通过适当改变 SSSR 的添加量及 FGLM 的添加量，可以调制各种浓度的软膏。

10 处方例 5

100g 中

GSSSR	1mg
P 物质	100mg
液体石蜡	10g
白色凡士林	适量

与处方例 5 同样地通过适当改变 GSSSR 的添加量及 P 物质的添加量，可以调制各种浓度的软膏。

处方例 6

100g 中	
SSSRR	5mg
FGLM	100mg
液体石蜡	10g
白色凡士林	适量

通过适当改变 SSSRR 的添加量及 FGLM 的添加量，可以调制各种浓度的软膏。

5 处方例 7

100g 中	
GSSSRR	50mg
P 物质	10mg
抗坏血酸	3mg
液体石蜡	10g
亲水性液体石蜡	适量

通过适当改变 GSSSRR 的添加量及 P 物质的添加量，可以调制各种浓度的软膏。

[药理试验]

(1) 对角膜上皮伸展的作用 (体外)

- 10 使用雄性的日本白色家兔的角膜，基于 Nishida 等的方法 (J. Cell Biol., 97, 1653 ~ 1657(1983))，以在角膜片的组织培养体系中的角膜上皮伸展长度为指标，研究药物对角膜上皮伸展的影响。

(实验方法)

- 15 将从家兔角膜片上切下的角膜块 (1 组 6 个) 在含有待检化合物的培养液 (TC-199) 中，在 37℃ · 5% CO₂ 的条件下培养 24 小时。培养后，将角膜块在乙醇-冰醋酸 (容积比 95: 5) 混合液中固定，用石蜡包埋，制成切片。将切片脱石蜡后，进行苏木精-曙红染色，在显微镜下测定上皮细胞层的伸展长度。

作为对照，使用在不含待检化合物的培养液中进行同样培养得到的角膜块。

（待检化合物）

实验中使用的肽的代表例如表 1 所示。

5 （结果）

实验结果如表 1 所示。需要说明的是表中的伸展率为以对照组的伸展长度为基准（100%）算出的各 6 例的平均值。

表 1

待检药物	伸展率 (%)
对照	100
SSSR (1nM)	101
GSSSR (1nM)	101
SSSRR (1nM)	98
GSSSRR (1nM)	94
GSSSRRAP (1nM)	97
GSSSRAAAP (1nM)	100
GYGSSSRRAPQT (1nM)	104
P 物质 (20 μ M)	94
FGLM (20 μ M)	99
SSSR (1nM) + P 物质 (20 μ M)	138
GSSSR (1nM) + P 物质 (20 μ M)	135
SSSRR (1nM) + P 物质 (20 μ M)	136
GSSSRR (1nM) + P 物质 (20 μ M)	142
GSSSRRAP (1nM) + P 物质 (20 μ M)	140
ASSSRRAP (1nM) + P 物质 (20 μ M)	134
GSSSRAAP (1nM) + P 物质 (20 μ M)	150
GSSSRAAAP (1nM) + P 物质 (20 μ M)	139
GYGSSSRRAPQT (1nM) + P 物质 (20 μ M)	134
SSSR (1nM) + FGLM (20 μ M)	145

如表 1 所示，单独使用 SSSR 类似物、单独使用 P 物质及单独使用 FGLM 时未确认对角膜上皮伸展有影响，如果在含有 SSSR 类似物与 P 物质（或 FGLM）两者的培养液中进行培养，则确认对角膜上皮有显著的伸展促进作用。

（2）对皮肤创伤愈合的作用

皮肤创伤愈合的效果可以用以下给出的方法进行试验。

使大鼠吸入乙醚麻醉，用推子剃去背部的体毛，用脱毛膏进行脱毛。24 小时后，使用直径 5mm 的皮肤活组织检查用打孔器，在背部皮肤上等间隔地形成 5 个表皮·真皮的全层性创伤，确认止血后，每日 1 次分别涂布含有 SSSR 的软膏、含有 FGLM 的软膏及含有 SSSR 与 FGLM 的软膏。涂布各软膏前，拍摄大鼠背部创伤的照片，测定创伤面积。通过比较含有 SSSR 的软膏、含有 FGLM 的软膏及含有 SSSR 与 FGLM 的软膏涂布后的各创伤面积，能够研究对皮肤创伤愈合的效果。

- 10 根据药理试验的结果可知，如果并用含有作为 IGF-I 的最小活性表达单元的用 Ser-Ser-Ser-Arg 表示的氨基酸序列的 SSSR 类似物与含有用 Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ 表示的氨基酸序列的 FGLM 类似物，则能够显著促进角膜上皮伸展及皮肤创伤愈合。因此，如果组合给予 SSSR 类似物与 FGLM 类似物，则上述药剂协同起效，发挥作为角膜溃疡、角膜上皮剥离、角膜炎、干眼症等角膜疾病的治疗剂或裂伤、擦伤、外科手术的切开创口、皮肤溃疡、烧伤等皮肤创伤或起因于此的坏死等疾病的愈合剂的效果。
- 15

序列表

<110> 参天制药株式会社
西田辉夫

5

<120> 新型肽及其药物用途

<130> CIF042549P

10

<140> PCT/JP02/12632

<141> 2002-12-03

<150> JP 2001-368103

<151> 2001-12-01

15

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 人

25

<400> 1

Ser Ser Ser Arg

1

<210> 2

	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> 人	
5	<400> 2	
	Phe Gly Leu Met	
	1	
	<210> 3	
10	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> 人	
	<400> 3	
15	Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr	
	1 5 10	
	<210> 4	
	<211> 8	
20	<212> PRT	
	<213> 人	
	<400> 4	
	Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro	
25	1 5	
	<210> 5	
	<211> 5	
	<212> PRT	

<213> 人

<400> 5

Ser Ser Ser Arg Arg

5 1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

10 <213> 人

<400> 6

Gly Ser Ser Ser Arg

15 1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

20 <213> 人

<400> 7

Gly Ser Ser Ser Arg Arg

25 1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

	<400> 8
	Ala Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro
	1 5
5	<210> 9
	<211> 8
	<212> PRT
	<213> 人
10	<400> 9
	Gly Ser Ser Ser Arg Ala Ala Pro
	1 5
	<210> 10
15	<211> 9
	<212> PRT
	<213> 人
	<400> 10
20	Gly Ser Ser Ser Arg Ala Ala Ala Pro
	1 5
	<210> 11
	<211> 12
25	<212> PRT
	<213> 人
	<400> 11
	Tyr Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met

	1	5	10
	<210> 12		
	<211> 8		
5	<212> PRT		
	<213> 人		
	<400> 12		
	Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met		
10	1	5	
	<210> 13		
	<211> 7		
	<212> PRT		
15	<213> 人		
	<400> 13		
	Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met		
	1	5	
20	<210> 14		
	<211> 6		
	<212> PRT		
	<213> 人		
25	<400> 14		
	Gln Phe Phe Gly Leu Met		
	1	5	

	<210> 15
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人
5	
	<400> 15
	Phe Phe Gly Leu Met
	1 5
10	
	<210> 16
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人
15	
	<400> 16
	Tyr Phe Gly Leu Met
	1 5
20	
	<210> 17
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人
25	
	<400> 17
	Gly Phe Gly Leu Met
	1 5