



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 245**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04713248 .5**
96 Fecha de presentación : **20.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1602665**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **Péptidos fisiológicamente activos y fármacos que contienen los mismos.**

30 Prioridad: **21.02.2003 JP 2003-45166**
21.05.2003 JP 2003-142845

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2010

73 Titular/es: **SEIKAGAKU CORPORATION**
6-1, Marunouchi, 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005, JP

72 Inventor/es: **Takata, Takashi;**
Kitagawa, Shoji y
Kaneda, Yuji

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 347 245 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 fisiológicamente activos y fármacos que contienen los mismos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo péptido biológicamente activo. La presente invención se refiere además a un agente que contiene dicho péptido biológicamente activo como un ingrediente activo. El péptido y el agente de la presente invención resultan útiles en el campo farmacéutico y otros.

10 **Antecedentes de la técnica**

Sheathlin es una proteína que existe en la matriz del esmalte y también se denomina ameloblastina o amelina. Las secuencias de aminoácidos de las sheathlins en porcinos, seres humanos, bovinos, ratones y ratas ya son conocidas (ameloblastina derivada de incisivo de rata: Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozack CA, Yamada K y Yamada Y, Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth specific gene., J. Biol. Chem., 271: 4431-4435, 1996; amelina derivada de molar de rata: Cerny R, Slaby I, Hammarström L y Wuitz T: A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains., J. Bone Miner. Res., 11: 883-891, 1996; sheathlin derivado de porcino: Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M y Simmer JP: Sheathlin: Cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins., J. Dent. Res., 76: 648-657, 1997; sheathlins derivados de seres humanos, bovinos y ratones: Toyosawa S, Fujiwara T, Ooshima T, Shintani S, Sato A, Ogawa Y, Sobue S y Ijuhin N: Cloning and characterization of the human ameloblastin gene., Gene, 256: 1-11, 2000).

Además, se ha dado a conocer un anticuerpo que reconoce la secuencia de los residuos aminoácidos nº 27 a nº 47 de sheathlin (derivado de rata, correspondiente a la secuencia SEC ID nº 6) (The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 45(10), 1329-1340 (1997)). Sin embargo, esta publicación únicamente da a conocer que un anticuerpo particular determinado reconoce dicha secuencia de aminoácidos, y no da a conocer ni sugiere la producción de un péptido que presente dicha secuencia de aminoácidos o la utilización del péptido con fines farmacéuticos y otros.

Además, se ha informado de diversos usos farmacéuticos de un tetrapéptido derivado de amelina y diversos usos farmacéuticos de la misma (tratamientos terapéuticos y profilácticos de enfermedades periodontales, reparaciones de lesiones de dientes, unión de elementos óseos, estimulación o inducción de la mineralización de tejidos duros, incorporación efectiva de un implante en el hueso, mejora de la biocompatibilidad de los instrumentos para la implantación, etc.) (solicitud de patente japonesa no examinada publicada (Kohyo) nº 11-510377). Sin embargo, el péptido de la presente invención indicado posteriormente, el uso farmacéutico del mismo y otros no han sido dados a conocer ni sugeridos.

40 **Exposición de la invención**

Los diversos usos farmacéuticos son conocidos para sheathlin tal como se ha indicado anteriormente. En el caso de que una secuencia de aminoácidos en el sheathlin biológicamente activo sea identificada, y un péptido que presente dicha secuencia de aminoácidos pueda ser obtenido, puede proporcionarse a un coste más bajo un material farmacéutica que puede mostrar más eficazmente la actividad biológica del sheathlin.

La presente invención se llevó a cabo a partir del punto de vista anteriormente mencionado, y un objetivo de la misma es proporcionar un péptido derivado de sheathlin y que presente una actividad biológica, y un fármaco que contenga el péptido como ingrediente activo.

Los inventores de la presente invención realizaron asiduamente estudios con el fin de alcanzar el objetivo anteriormente mencionado. Como resultado, identificaron una secuencia de aminoácidos en el sheathlin que presentaba una actividad biológica, produjeron un péptido que presentaba dicha secuencia de aminoácidos, encontraron que el péptido mostraba diversas actividades biológicas, y de esta manera llevaron a cabo la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos siguiente (SEC ID nº 4) (en lo sucesivo denominado "péptido de la presente invención"):

60 **Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala
Ser Leu (SEC ID nº 4)**

Además, la presente invención también proporciona un agente que contiene el péptido de la presente invención como ingrediente activo (en lo sucesivo denominado "agente de la presente invención"). El agente de la presente invención es preferentemente un compuesto farmacéutico.

Además, el agente de la presente invención también es preferentemente un agente para estimular el crecimiento celular o la diferenciación celular. La "célula" de la que se estimula el crecimiento o la diferenciación preferentemente es un osteoblasto, condroblasto, cementoblasto, célula madre mesenquimal derivada de la médula ósea o célula derivada de ligamento periodontal.

5

Además, el agente de la presente invención también es preferentemente un agente para estimular la formación o regeneración de hueso o cartílago, o un agente para estimular la formación o regeneración del tejido periodontal.

Además, la presente invención proporciona una composición que contiene por lo menos el péptido de la presente invención y ácido hialurónico, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos (en lo sucesivo denominada "composición de la presente invención").

10

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra los efectos de estimulación del crecimiento celular del péptido de la presente invención (derivado de porcinos) sobre las células PDL (derivadas de células humanas).

15

La fig. 2 muestra los efectos de estimulación del crecimiento celular de los péptidos de la presente invención (derivados de porcinos y de seres humanos) sobre las células MC3T3 (derivadas del ratón).

20

La fig. 3 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular del péptido de la presente invención (derivada de porcinos) sobre las células PDL (derivadas de seres humanos).

La fig. 4 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular sobre los péptidos de la presente invención (derivados de porcinos y seres humanos) sobre las células PDL (derivadas de seres humanos).

25

La fig. 5 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular de los péptidos de la presente invención (derivados de porcinos y seres humanos) sobre las células PDL (derivadas de seres humanos).

La fig. 6 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular de los péptidos de la presente invención (derivados de porcinos y seres humanos) sobre las células ST2 (derivadas del ratón).

30

La fig. 7 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular de los péptidos de la presente invención (derivados de porcinos y seres humanos) sobre las células BMSSC (derivadas de la rata).

35

La fig. 8 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular de los péptidos de la presente invención (derivados de porcinos y seres humanos) sobre las células MC3T3 (derivadas del ratón).

La fig. 9 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular de los péptidos de la presente invención (derivados de porcinos y seres humanos) sobre las células MC3T3 (derivadas del ratón).

40

La fig. 10 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular de los péptidos de la presente invención (derivados de porcinos) sobre las células OCCM30 (derivadas del ratón).

La fig. 11 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular de los péptidos de la presente invención (incluyendo la delección, derivado de seres humanos) sobre las células MC3T3 (derivadas del ratón).

45

La fig. 12 muestra los efectos de estimulación de la diferenciación celular de los péptidos de la presente invención (incluyendo la adición o la sustitución de varios residuos aminoácidos, derivados de seres humanos) sobre las células ST2 (derivadas del ratón).

50

Mejor modo de poner en práctica la invención

A continuación en la presente memoria se explica la presente invención en detalle.

55

<1> *Péptido de la presente invención*

(1) *Péptido de la presente invención*

El péptido de la presente invención es un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos (SEC ID n° 4). El péptido de la presente invención se diseñó basándose en la secuencia de aminoácidos que existe en el lado del extremo N-terminal de la proteína sheathlin.

60

65

**Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala
Ser Leu (SEC ID n° 4)**

(3) Producción de péptido de la presente invención

Debido a que la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención se da a conocer en la presente invención, el péptido de la presente invención puede producirse basándose en dicha secuencia mediante un método de síntesis química conocido para péptidos (por ejemplo el método de síntesis en fase líquida, el método de síntesis en fase sólida, y otros, ver Izumiya N, Kato T., Aoyagi H., Waki M., "Basics and experiments of peptide synthesis", Maruzen, 1985). Por ejemplo, en el caso de que se produzca un péptido que presente la secuencia de aminoácidos (A), Val Pro Ala Phe Pro Arg Gln Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ser Leu (SEC ID n° 3) mediante el método de síntesis en fase sólida, debido a que el extremo C-terminal (posición 16ª) de la secuencia de aminoácidos es un residuo de leucina, el péptido que presenta la secuencia de aminoácidos anteriormente indicada (A) (SEC ID n° 3) puede producirse mediante la unión de un grupo carboxilo de una leucina (N α)-protegida de grupo α -amino a una resina insoluble que presenta grupos clorometilo u oximetilo de manera directa o mediante espaciador, según sea el caso, eliminando después el grupo protector del N α , sucesivamente uniendo los residuos aminoácidos 15º a los 1º de la secuencia de aminoácidos utilizando los aminoácidos protegidos correspondientes (el aminoácido en el que el N α y el grupo funcional de cadena lateral se encuentran protegidos se denomina simplemente "aminoácido protegido") según el método de síntesis en fase sólida, eliminando posteriormente la resina insoluble y los grupos protectores de los grupos funcionales de N α y de cadena lateral de los residuos aminoácidos.

La resina insoluble que presenta grupos clorometilo o grupos oximetilo, espaciador utilizado para la síntesis del péptido de la presente invención, y resina para aminoácidos protegidos que comprende un aminoácido protegido unido a la resina insoluble utilizada según el caso, y otros, puede prepararse mediante métodos conocidos, y se encuentran comercialmente disponibles de diversos tipos.

La resina insoluble anteriormente mencionada puede ser cualquier resina que pueda unirse a un grupo carboxilo de un aminoácido protegido en el extremo C-terminal de manera directa o mediante un espaciador, según el caso, y pueden eliminarse posteriormente. Entre los ejemplos preferentes de dicha resina insoluble se incluyen una resina clorometilo (copolímero de estireno clorometilado/divinilbenceno), resina oximetilo y resina 4-oximetil-Pam (fenilacetamidometilo) introducida con un espaciador para la estrategia de Boc (t-butiloxicarbonilo), resina oximetilfenoximetilo (resina de Wang), derivados de los mismos y otros para la estrategia de Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo).

Un aminoácido protegido es un aminoácido del que el grupo funcional se encuentra protegido con un grupo protector mediante un método conocido, y se encuentran comercialmente disponibles diversos tipos de aminoácidos protegidos.

Puede unirse un aminoácido protegido mediante un método de condensación habitual, tal como el método de DCC (diciclohexilcarbodiimida), el método DIPCDI (diisopropilcarbodiimida) [Tartar A *et al.*, J. Org. Chem., 44, 5000 (1979)], el método de éster activo, el método de anhídrido mixto o simétrico, el método de carboniimidazol, el método DCC-HONSu (N-hidroxisuccinimida) [Weygand F *et al.*, Z. Naturforsch., B, 21, 426 (1966)], el método DCC-HOBT (1-hidroxibenzotriazol) [Koenig W *et al.*, Chem. Ber. 103, 788, 2024, 2034 (1970)], el método de difenilfosforilazida, el método BOP-HOBT utilizando un reactivo BOP (hexafluorofosfato de benzotriazolil-N-hidroxi-trisdimetilaminofosfonio) (Hudson D, J. Org. Chem., 53, 617 (1988)), el método HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio)-HOBT (Knorr R *et al.*, Tetrahedron Lett., 30, 1927, (1989)) y el método TBTU (tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio)-HOBT (Knorr, R. *et al.*, Tetrahedron Lett., 30, 1927, (1989)). De entre ellos, el método DCC, el método DCC-HOBT, el método BOP-HOBT, el método HBTU-HOBT y el método del anhídrido simétrico resultan preferentes.

Dichas reacciones de condensación habitualmente se llevan a cabo en un solvente orgánico, tal como diclorometano, dimetilformamida (DMF) o N-metilpirrolidona (NMP) o un solvente mezcla de los mismos.

Como reactivo de eliminación del grupo protector del grupo α -amino, se utiliza ácido trifluoroacético/diclorometano, HCl/dioxano, piperidina/DMF, piperidina/NMP y otros, y el reactivo puede seleccionarse convenientemente dependiendo del tipo de grupo protector.

Además, el grado de la progresión de la reacción de condensación en cada etapa de la síntesis puede examinarse mediante el método de Kaiser *et al.* [Anal. Biochem., 34, 595, (1970), el método de reacción de la ninhidrina].

De esta manera, puede obtenerse una resina de péptido protegido que presente una secuencia de aminoácidos deseada.

Pueden eliminarse simultáneamente una resina de péptido protegido y un grupo protector mediante el tratamiento de la resina con fluoruro de hidrógeno, TFMSA (ácido trifluorometanosulfónico) [editado por Gross E, Yajima H *et al.*, "The Peptides" 5, 65 (1983), Academic Press], TMSOTf (triflato de trimetilsililo) [Fuji N *et al.*, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 274 (1987)], TMSBr (bromuro de trimetilsililo) [Fujii N *et al.*, Chem. Pharm. Bull. 35, 3880 (1987)], ácido trifluoroacético o similares. El agente de eliminación anteriormente mencionado puede seleccionarse convenientemente dependiendo de la estrategia utilizada (Boc o Fmoc) y de los tipos de resina y grupo protector. El péptido de la presente invención puede producirse mediante estas series de métodos.

ES 2 347 245 T3

Además, el péptido de la presente invención también puede producirse mediante la producción de un polinucleótido (ADN o ARN) correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención y utilizando una técnica de manipulación genética utilizando el polinucleótido.

5 El péptido producido puede purificarse mediante métodos de aislamiento y de purificación para proteínas generalmente conocidos del campo de la química de las proteínas. Entre los ejemplos específicos se incluyen extracción, recristalización, eliminación de sales utilizando sulfato de amonio, sulfato sódico o similar, centrifugación, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de absorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de fase normal, cromatografía de fase reversa, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis, distribución contracorriente y similares, y combinaciones arbitrarias de los mismos, y un método utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa resulta eficaz.

15 La composición de aminoácidos del péptido producido de la presente invención puede examinarse mediante un método conocido tras la hidrólisis del péptido con un ácido, tal como ácido hidroclicórico o ácido metanosulfónico, y si el péptido de la presente invención ha sido producido correctamente o no puede estimarse mediante dicho examen.

Más estrictamente, si el péptido de la presente invención ha sido producido correctamente o no puede confirmarse mediante la determinación de la secuencia de aminoácidos del péptido producido mediante un método de secuenciación de aminoácidos conocido (por ejemplo el método de degradación Edman, etc.).

20 El péptido en forma de una sal también cae dentro del alcance de la presente invención. Tal como se describe posteriormente, debido a que el péptido de la presente invención también resulta útil para la utilización como compuesto farmacéutico, las sales del péptido de la presente invención preferentemente son sales médicamente aceptables.

25 El péptido de la presente invención puede formar una sal mediante adición de un ácido. Entre los ejemplos de dicha sal se incluyen, por ejemplo, sales con un ácido inorgánico (ácido hidroclicórico, ácido hidrobromico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfurico y otros) u ácidos orgánicos carboxílicos (ácido acético, ácido propiónico, ácido maleico, ácido succínico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido salicílico, ácido trifluoroacético, etc.), sacárido ácido, tal como ácido glucurónico, ácido galactourónico, ácido glucónico y ácido ascórbico, polisacárido ácido, tal como ácido hialurónico, condroitín sulfato, heparán sulfato, heparina, heparina 6-o-desulfatada, heparina 2-O-desulfatada, heparina N-desulfatada y ácido alginico, ácido orgánico sulfónico (ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, etc.) y otros. Entre dichas sales, resultan preferentes las sales médicamente aceptables.

35 Además, el péptido de la presente invención puede formar una sal con una sustancia básica. Entre los ejemplos de este tipo de sal se incluyen sales médicamente aceptables entre las sales con una base inorgánica, tales como sales de metal alcalino (sales de sodio, sales de litio, sales de potasio, etc.), sales de metal alcalino-térreo y sales de amonio, y sales con una base orgánica, tales como sales dietanolamina y sales ciclohexilamina.

40 Además, un péptido obtenido mediante la modificación del péptido de la presente invención también cae dentro del alcance del péptido de la presente invención. Entre los ejemplos de dicho péptido se incluyen un péptido en el que el grupo α -amino o el grupo α -carboxilo ha sido modificado, un péptido en el que el grupo funcional de cadena lateral ha sido modificado y otros. Entre los ejemplos de la modificación se incluyen la modificación con un grupo de modificación o un grupo protector utilizado comúnmente en el campo de la química de los péptidos, la sustitución con un D-aminoácido, que es un isómero óptico, y otros.

45 La relación entre una serie de secuencias de aminoácidos (A) a (G) de los péptidos de la presente invención se muestra en la Tabla 1. Además, la relación entre las secuencias de aminoácidos (H) a (K) que no son de la invención se muestra en la Tabla 2.

50 Los residuos aminoácidos se representan mediante la utilización de códigos de una sola letra. Además, "-" en las secuencias de aminoácidos indica la ausencia de un residuo aminoácido. Por ejemplo, para (A), se indica que el octavo residuo aminoácido es "P", y que éste se encuentra unido al noveno residuo aminoácido (G) mediante un enlace peptídico para formar un péptido que comprende 16 residuos aminoácidos en total. Además, también se muestran los animales que presentan las moléculas de sheathlin que presentan cada secuencia de aminoácidos (orígenes).

TABLA 1

55	(A)	VPAFPRQP----GTPGVASL	(SEC ID nº 3)	Porcino
60	(B)	VPFFPQQS----GTPGMASL	(SEC ID nº 4)	Humano
	(C)	VPAFPQQP----GIPGMASL	(SEC ID nº 5)	Bovino
	(D)	VPAFPQQPGAQGMAPPGMASL	(SEC ID nº 6)	Ratón, rata
	(E)	VPAFPQRPGGQGMAPPGMASL	(SEC ID nº 7)	Rata
65	(F)	QPGLKPFLQPTAATGVQVTPQ	(SEC ID nº 8)	Rata
	(G)	VPFFPQQS----GTPGGASL	(SEC ID nº 9)	

TABLA 2

(H)	NKAQQPQIKRDAWRF	(SEC ID nº 10)	Porcino
(I)	NKAQEPMMHDAWHF	(SEC ID nº 15)	Humano
(J)	NKAQQPQIKHDAWHF	(SEC ID nº 16)	Bovino
(K)	NKVHQPQV-HNAWRF	(SEC ID nº 17)	Ratón, rata

Tal como se muestra en los ejemplos descritos posteriormente, debido a que el péptido de la presente invención presenta un efecto de estimulación del crecimiento celular y el efecto de estimular la diferenciación celular, en particular el efecto de estimular el crecimiento celular y el efecto de estimular la diferenciación celular de osteoblastos, células periodontales y otras, puede utilizarse como ingrediente activo de agentes tales como un agente para estimular el crecimiento celular, un agente para estimular la diferenciación celular, un agente para estimular la formación o regeneración de hueso o cartílago, un agente para estimular la formación o regeneración de tejido periodontal y otros, tal como se describe en detalle posteriormente.

<2> *Agente de la presente invención*

El agente de la presente invención es un agente que contiene el péptido de la presente invención como ingrediente activo. Aunque el agente de la presente invención puede ser un compuesto farmacéutico o un reactivo para experimentos o ensayos, preferentemente es un compuesto farmacéutico.

El agente de la presente invención preferentemente es un agente para estimular el crecimiento celular o la diferenciación celular. La "célula" de la que debe estimularse el crecimiento o la diferenciación preferentemente es un osteoblasto, condroblasto, cementoblasto, célula madre mesenquimal derivada de médula ósea o célula derivada de ligamento periodontal. Estos agentes para estimular el crecimiento celular y agente para estimular la diferenciación celular muestran un efecto superior de estimulación del crecimiento celular o de la diferenciación celular mediante la acción del péptido de la presente invención como el ingrediente activo de los mismos.

Además, el agente de la presente invención también puede utilizarse como agente para estimular la formación o regeneración de hueso o cartílago, o como agente para estimular la formación o regeneración del tejido periodontal mediante la utilización de dicho efecto del péptido de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente.

El péptido de la presente invención utilizado como ingrediente activo del agente de la presente invención es el mismo que se ha descrito en la sección anteriormente mencionada "<1> Péptido de la presente invención". Específicamente, la secuencia SEC ID nº 4, mostrada a continuación:

**Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala
Ser Leu (SEC ID nº 4)**

El péptido de la presente invención que constituye el agente de la presente invención puede consistir de un único tipo de péptido o de dos o más tipos de péptido.

La pureza del péptido de la presente invención como el ingrediente activo del agente de la presente invención puede seleccionarse convenientemente dependiendo del propósito del agente de la presente invención. Por ejemplo, en el caso de que el agente de la presente invención se utilice como compuesto farmacéutico, preferentemente se utiliza el péptido de la presente invención purificado a alta pureza y que de esta manera sustancialmente no contiene sustancias de las que la contaminación no resulta aceptable en un compuesto farmacéutico.

En el caso de que se utilice el agente de la presente invención como medicamento, puede seleccionarse convenientemente una vía de administración del mismo dependiendo del propósito de entre, por ejemplo, la inyección (subcutánea, intracutánea, intravenosa, inyecciones intraperitoneales, etc.), la instilación, la infusión, el implante, la administración percutánea, la administración oral y la inhalación. Además, la forma de dosificación del mismo puede seleccionarse convenientemente de entre, por ejemplo, inyección (solución, suspensión, emulsión, sólido que debe disolverse para la utilización, etc.), tableta, cápsula, gránulo, polvos, solución, agente encapsulado en liposomas, pomada, gel, polvos para uso externo, spray, polvos para inhalación, gotas oculares, pomadas para ojos, supositorio, pesario y otros, y prepararse dependiendo del método de administración.

En el caso de que se utilice el agente de la presente invención como medicamento, las concentraciones de endotoxina del mismo preferentemente son de 0,3 EU/ml o inferiores como agente en forma de una solución. La concentración de endotoxina puede determinarse mediante la utilización de un método de medición de endotoxinas bien conocido y utilizado comúnmente por el experto en la materia, y el ensayo de *Limulus* utilizando lisado de amebocitos de *Limulus* resulta preferente. Las concentraciones en términos de EU (unidad de endotoxina) pueden medirse y calcularse según el estándar industrial japonés, reglas generales para reactivos bioquímicos (JIS K8008), farmacopea US o similar.

ES 2 347 245 T3

Además, pueden utilizarse para el agente de la presente invención otros ingredientes farmacéuticamente activos (por ejemplo ácido hialurónico) o ingredientes utilizados habitualmente para compuestos farmacéuticos, tales como estabilizadores convencionales, emulsionantes, reguladores osmóticos, modificadores del pH, tampones, agentes isotónicos, conservantes, agentes calmantes, materiales colorantes, excipientes, ligantes, lubricantes y agentes desintegrantes, con la condición de que el péptido de la presente invención y el efecto de la presente invención no resulten negativamente afectados.

En el caso de que se utilice el agente de la presente invención como medicamento, la dosis debería seleccionarse para cada caso individual dependiendo del propósito de la administración (tratamiento profiláctico, mantenimiento (prevención de la exacerbación), mejora (mejora de los síntomas) o tratamiento terapéutico), tipo de enfermedad, síntomas, edad, sexo, edad y peso corporal de los pacientes, sitio de aplicación, método de administración y otros, y no se encuentra particularmente limitado. Sin embargo, para un adulto, pueden administrarse generalmente en cada ocasión entre 1 µg y 30 mg del péptido de la presente invención en cada sitio de aplicación. Además, la frecuencia de administración puede ser, por ejemplo, aproximadamente una vez al día, ó 2 a 3 veces al día para una dosis dividida, o aproximadamente una vez en 1 a 3 días.

En el caso de que se utilice el agente de la presente invención como medicamento, el sujeto que recibe la administración del mismo no se encuentra particularmente limitado, aunque preferentemente es un vertebrado, más preferentemente un mamífero, en particular preferentemente un ser humano.

En el caso de que el agente de la presente invención se utilice como medicamento, puede administrarse en, por ejemplo, los animales o seres humanos indicados posteriormente, dependiendo de la utilización.

En el caso de que se utilice el agente de la presente invención como agente para estimular el crecimiento celular, puede administrarse en un animal en una condición en la que se desee el crecimiento celular. En particular, preferentemente se administra en un animal en una condición en que se desea el crecimiento de osteoblastos, condroblastos, cementoblastos, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea o células derivadas de ligamento periodontal. Entre los ejemplos de dicha condición en que se desea el crecimiento celular se incluyen sufrir de enfermedades periodontales, fractura ósea, pérdida ósea, osteoporosis, enfermedades articulares, enfermedades ortopédicas (osteocondritis dissecans, gonartrosis, etc.), tumor o similar, condiciones inmediatamente posteriores al tratamiento dental (tratamiento periodontal, etc.), tratamiento ortopédico (injertación de cultivo celular, perforación de hueso, injertación de pilar osteocartilaginoso, etc.), injertación ósea en tumorectomía o incremento óseo y similares.

En el caso de que se utilice el agente de la presente invención como agente para estimular la diferenciación celular, puede administrarse en un animal en una condición en que se desee la diferenciación celular. En particular, preferentemente se administra en un animal en una condición en que se desee la diferenciación de osteoblastos, condroblastos, cementoblastos, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea o células derivadas de ligamento periodontal. Los ejemplos de dicha condición en que se desee la diferenciación celular son similares a los indicados para el agente anteriormente mencionado para estimular el crecimiento celular.

En el caso de que se utilice el agente de la presente invención como agente para estimular la formación o regeneración de hueso o cartílago, puede administrarse en un animal en una condición en que se desee la estimulación de la formación o regeneración de hueso o cartílago. Los ejemplos de dicha condición en que se desee la estimulación de la formación o regeneración de hueso o cartílago son similares a los indicados para el agente anteriormente mencionado para estimular el crecimiento celular.

En el caso de que se utilice el agente de la presente invención como agente para estimular la formación o regeneración del tejido periodontal, puede administrarse en un animal en una condición en que se desee la estimulación de la formación o regeneración del tejido periodontal. Los ejemplos de dicha condición en que se desee la estimulación de la formación o regeneración del tejido periodontal son similares a los indicados para el agente anteriormente mencionado para estimular el crecimiento celular.

Además, el péptido de la presente invención puede adherirse a una superficie de un portador insoluble apropiado o mezclarse con un material apropiado para formar un agente con el fin de estimular el crecimiento o la diferenciación celulares, estimular la formación o regeneración de hueso, tejido de cartílago o tejido periodontal, mejorar la biocompatibilidad o similares. A modo de dicho portador o material insoluble, pueden utilizarse aquellos en diversas formas, tales como perla, película, placa, monofilamento, tejido no tejido, esponja, tela, tejido de punto, fibra corta, tubo y fibra hueca. Específicamente, el péptido de la presente invención puede utilizarse para un material compuesto médico, tal como un implante, cemento óseo, sustituto óseo, material de relleno de canal dentario, placa de fractura ósea, articulación artificial y otros. El péptido de la presente invención también puede aplicarse para agentes en el campo de la medicina regenerativa.

En el caso de que el péptido de la presente invención se adhiera a una superficie de dichos materiales, el método de adhesión no se encuentra particularmente limitado, y pueden utilizarse métodos utilizados comúnmente como método para preparar enzimas inmovilizados, tales como métodos que utilizan la adsorción física, el enlace iónico, el enlace covalente o la encapsulación (ver Immobilized Enzyme, 1975, páginas 9 a 75, Kodansha).

ES 2 347 245 T3

Por ejemplo, el péptido de la presente invención puede adherirse físicamente a un portador insoluble de tipo poliestireno o polipropileno. Además, el péptido de la presente invención puede adherirse químicamente a, por ejemplo, un portador insoluble poliamida, celulosa, agarosa, poli(acrilamida), dextrano o de tipo polímero del vinilo. Entre los ejemplos de adhesión química (unión) se incluyen el método de diazotización, en el que el acoplamiento de diazo se lleva a cabo mediante la utilización de un grupo amino aromático para formar un enlace peptídico; el método de azida
5 ácida, en el que un grupo hidroxilo de un portador insoluble se activa con portador soluble CNBr o similar; el método de alquilación, en el que se forma un enlace peptídico mediante la utilización de un derivado hidrazina de un portador insoluble o similar; el método de alquilación, en el que se alquila un péptido mediante la utilización de un grupo funcional altamente reactivo de un portador insoluble, tal como un halógeno; un método de entrecruzamiento de un
10 portador insoluble y un grupo amino libre de un péptido mediante la utilización de un agente de entrecruzamiento que reaccionar con un grupo amino libre, tal como glutaraldehído; el método carbodiimida; el método de activación epoxi; un método de unión del péptido mediante un espaciador utilizando cualquier de dichos métodos, y otros. El método para la unión del péptido de la presente invención puede seleccionarse convenientemente de entre dichos métodos conocidos dependiendo del tipo de portador insoluble.

15 Además, en el caso de que se utilice el agente de la presente invención como reactivo para experimentos o ensayos, el péptido de la presente invención puede utilizarse sin modificación o en forma de una mezcla con otros ingredientes, dependiendo de la utilización.

20 <3> Composición de la presente invención

La composición de la presente invención se caracteriza porque contiene por lo menos el péptido de la presente invención y ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 El péptido de la presente invención como constituyente de la composición de la presente invención es igual al indicado en la sección anteriormente indicada “<1> Péptido de la presente invención”. Específicamente, la secuencia SEC ID nº 4, mostrada a continuación:

30 **(B) Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala
Ser Leu (SEQ ID NO: 4)**

35 El péptido de la presente invención que constituye la composición de la presente invención puede consistir de un único tipo de péptido o de dos o más tipos de péptido.

40 El origen del “ácido hialurónico o sal farmacéuticamente aceptable del mismo” como constituyente de la composición de la presente invención no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, puede utilizarse cualquiera de los ácidos hialurónicos aislados y purificados a partir de cresta de pollo, cordón umbilical, microorganismos productores de ácido hialurónico y otros, y el ácido hialurónico producido mediante síntesis (por ejemplo síntesis química o síntesis enzimática). El tamaño molecular del ácido hialurónico no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, se ejemplifica el ácido hialurónico que presenta un peso molecular medio en peso de entre 600.000 y 1.200.000. Por ejemplo, el ácido hialurónico que presenta un peso molecular de entre aproximadamente 800.000 y 1.000.000 es un ejemplo preferente.

45 Como “sal farmacéuticamente aceptable” del ácido hialurónico, pueden utilizarse sales farmacéuticamente aceptables entre las sales con una base inorgánica, tal como sales de metal alcalino (sales sódicas, sales de litio, sales potásicas, etc.), sales de metal alcalino-térreo y sales amónicas y sales con una base orgánica, tales como sales de dietanolamina, sales de ciclohexilamina y sales de aminoácido. Entre ellas, resultan preferentes las sales sódicas.

50 La composición de la presente invención puede producirse mediante la mezcla apropiada del péptido de la presente invención y dicho “ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo”. La proporción de mezcla (proporciones de contenidos de la composición) de estos ingredientes tampoco se encuentra particularmente limitada. La expresión “que contiene por lo menos el péptido de la presente invención y ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo” comprende la utilización de sales de adición de ácido hialurónico como el péptido de
55 la presente invención.

60 La composición de la presente invención puede encontrarse en cualquier forma de entre solución, congelada o seca (liofilizada, etc.).

El contenido de impurezas y otros en la composición de la presente invención también puede definirse convenientemente dependiendo del propósito de la utilización y no se encuentra particularmente limitado. Sin embargo, resulta preferente que la composición no contenga sustancialmente sustancias de las que la contaminación no resulte aceptable en compuestos farmacéuticos.

65 Por ejemplo, la concentración de endotoxina en la composición de la presente invención preferentemente es 0,3 EU/ml o inferior, en forma de solución. La concentración de endotoxina en la composición de la presente invención puede medirse y calcularse mediante un método de medición de endotoxinas bien conocido y utilizado convencional-

mente por el experto en la materia tal como se ha indicado anteriormente. Además, el contenido de hierro preferentemente es 20 ppm o inferior.

Además, en la composición de la presente invención, con la condición de que el péptido de la presente invención y el efecto de la presente invención no resulten afectados negativamente, también pueden utilizarse otros ingredientes farmacéuticamente activos (por ejemplo ácido hialurónico) o ingredientes utilizados comúnmente para compuestos farmacéuticos, tales como estabilizantes convencionales, emulsionantes, reguladores osmóticos, modificadores del pH, tampones, agentes isotónicos, conservantes, agentes calmantes, materiales colorantes, excipientes, ligantes, lubricantes y agentes desintegrantes.

Dicha composición de la presente invención preferentemente se destina a la utilización médica.

En el caso de que la composición de la presente invención se utilice como medicamento, puede utilizarse con los mismos fines que los del agente anteriormente mencionado de la presente invención utilizado como medicamento, y en particular, preferentemente se utiliza para enfermedades en las que el péptido de la presente invención debe retenerse en cierto grado, por ejemplo para lesiones de enfermedades periodontales, fractura ósea, pérdida ósea, enfermedades articulares, enfermedades ortopédicas, etc., durante el periodo de fusión intervertebral, y similares.

Ejemplos

La presente invención se explica más específicamente haciendo referencia a los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

Producción del péptido de la presente invención

Los péptidos siguientes (a) a (e) se produjeron mediante síntesis en fase sólida encargada a Peptide Institute Inc. El péptido (a) es un péptido diseñado basándose en la secuencia de aminoácidos existente en el lado N-terminal de una proteína sheathlin derivada de porcino, (b) es un péptido diseñado basándose en la secuencia de aminoácidos de una parte de una proteína sheathlin derivada de un ser humano correspondiente a (a), (c) es un péptido diseñado basándose en la secuencia de aminoácidos existente en el lado C-terminal de la proteína sheathlin derivada de porcino, y tanto (d) como (e) son péptidos diseñados basándose en la secuencia de aminoácidos existente en una región interna entre el lado N-terminal y el lado C-terminal de la proteína sheathlin derivada de porcino. El péptido (b) es el péptido de la presente invención. Los péptidos (a), (c), (d) y (e) son ejemplos comparativos (a) Val Pro Ala Phe Pro Arg Gln Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ser Leu (secuencia SEC ID n° 3)

(b) Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala Ser Leu (SEC ID n° 4)

(c) Asn Lys Ala Gln Gln Pro Gln Ile Lys Arg Asp Ala Trp Arg Phe (SEC ID n° 10)

(d) Glu His Glu Thr Gln Gln Tyr Glu Tyr Ser (secuencia SEC ID n° 11)

(e) Ala Arg Gly Pro Ala Gly Arg Ser Arg Gly Pro Pro Gly (SEC ID n° 12)

Los resultados del análisis de aminoácidos de los péptidos producidos (a) y (b) (condiciones de hidrólisis: HCl 6 N, 110°C, 22 horas) se muestran posteriormente. Los números entre paréntesis representan los valores teóricos.

Péptido (a): Thr (1) 0,94, Ser (1) 0,89, Glu (1) 1,00, Gly (2) 2,05, Ala (2) 2,07, Val (2) 2,01, Leu (1) 1,02, Phe (1) 0,99, NH₂ (1) 1,13, Arg (1) 0,98, Pro (4) 4,00.

Péptido (b): Thr (1) 0,94, Ser (2) 1,77, Glu (2) 2,00, Gly (2) 1,97, Ala (1) 1,00, Val (1) 0,97, Met (1) 0,98, Leu (1) 0,99, Phe (2) 1,96, NH₂ (2) 2,12, Pro (3) 2,99.

Además, los resultados del ensayo de pureza de los péptidos producidos (a) y (b) (determinados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento) se muestran posteriormente. Ambos péptidos mostraron un único pico en el patrón de elución de la cromatografía líquida de alto rendimiento (cromatografía en fase reversa).

Péptido (a): 97,3%

Péptido (b): 96,4%

ES 2 347 245 T3

Las condiciones de la cromatografía líquida de alto rendimiento fueron las siguientes.

- Columna: Zorbax 300SB-C18 (4,6 mm D.I. x 150 mm) (Agilent Technologies)
- Eluyente: acetonitrilo al 10%-60%/ácido trifluoroacético al 0,1% (25 minutos)
- Caudal: 1,0 ml/minuto
- Temperatura: 25°C para el péptido (a) y 50°C para el péptido (b)
- Longitud de onda de detección: 220 nm

Además, los resultados del análisis del peso molecular de los péptidos producidos (a) y (b) utilizando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) fueron los siguientes:

Péptido (a): 1.593,6 (valor teórico: 1.593,8)

Péptido (b): 1.663,6 (valor teórico: 1.663,9)

Los resultados anteriores sugieren que los péptidos (a) y (b) habían sido correctamente producidos.

Además, los péptidos producidos (c) a (e) se analizaron de manera similar. Como resultado, la totalidad de ellos presentaba una pureza de 98,0% o superior y mostraban un único pico en la cromatografía líquida de alto rendimiento (cromatografía en fase reversa), y se descubrió que los resultados del análisis de los aminoácidos y el análisis de los pesos moleculares concordaban con los valores teóricos. Esto sugiere que los péptidos (c) a (e) también habían sido correctamente producidos. La totalidad de los péptidos producidos (a) a (e) se encontraba en forma de sustancia liofilizada de color blanco.

Además, se produjeron mediante síntesis en fase sólida de la misma manera que la indicada anteriormente los péptidos correspondientes al péptido (b) anteriormente mencionado, parte del cual se delecionó (péptidos (f) a (j), mostrados posteriormente), péptidos correspondientes al péptido (b) anteriormente mencionado con la adición de varios residuos aminoácidos al extremo N-terminal y/o C-terminal (péptidos (k) a (m), mostrados posteriormente) y los péptidos correspondientes al péptido (b) anteriormente mencionado, parte de los residuos aminoácidos del cual se sustituyó por otros residuos aminoácidos (péptido (n) mostrado posteriormente).

(f) Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly (SEC ID nº 18)

(g) Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser (SEC ID nº 19)

(h) Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly (SEC ID nº 20)

(i) Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala Ser Leu (SEC ID nº 21)

(j) Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala Ser Leu (SEC ID nº 22)

**(k) Met Ser Phe Ala Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr
Pro Gly Met Ala Ser Leu (SEC ID nº 23)**

(l) Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala Ser Leu Ser Leu Glu Thr (SEC ID nº 24)

**(m) Phe Ala Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly
Met Ala Ser Leu Ser Leu (SEC ID nº 25)**

**(n) Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Gly Ala
Ser Leu (SEC ID nº 9)**

Los péptidos (f) a (n) producidos se analizaron de manera similar. Como resultado, la totalidad de ellos presentaba una pureza de 98,0% o superior y mostraba un único pico en la cromatografía líquida de alto rendimiento (cromatografía en fase reversa), y se descubrió que los resultados del análisis de los aminoácidos y el análisis de los pesos moleculares concordaban con los valores teóricos. Esto sugiere que los péptidos (f) a (n) habían sido correctamente producidos. La totalidad de los péptidos (f) a (n) producidos se encontraba en forma de sustancia liofilizada de color blanco.

Ejemplo 2

*Estudio farmacológico con células*5 (1) *Preparación de las células*(i) *Células de ligamento periodontal (células PDL) derivadas de seres humanos*

Las células PDL se aislaron a partir de un premolar sano extraído cuidadosamente de un paciente (16,24 años de edad) que había acudido a un hospital a extraerse dientes para un tratamiento ortodóncico, de manera que el ligamento periodontal no debía resultar dañado en lo posible, y se sometió a cultivo. El diente extraído se lavó con solución salina fisiológica esterilizada y solución salina tamponada con fosfato (PBS, Nissui) y después el ligamento periodontal existente en 1/3 de la raíz del diente en el centro de raspó con una cuchilla afilada. Los trozos del ligamento periodontal se transfirieron a una placa de plástico y se trituraron en fragmentos pequeños utilizando una cuchilla redonda. Se dejaron los fragmentos de tejido en una placa de diámetro 35 mm (FALCON) y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Nissui) que contenía antibióticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 250 µg/ml de gentamicina) y suero fetal bovino al 10% (FBS, EQUITECH-BIO) a 37°C bajo 5% de CO₂. A continuación, las células de los fragmentos de tejido de ligamento periodontal liberadas se subcultivaron bajo las mismas condiciones y se utilizaron las células de las generaciones tercera a quinta para los experimentos.

(ii) *Osteoblastos derivados de ratón*

Se utilizaron osteoblastos derivados de ratón, células de la cepa celular MC3T3 o de la cepa ST2 (obtenidas de Riken Cell Bank).

(iii) *Células madre mesenquimales derivada de médula ósea de fémur de rata (BMMSC)*

Se utilizaron células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de fémur de rata (BMMSC). La cepa celular de las células se obtuvo según el método de Maniopoulos *et al.* (Maniopoulos C, Sodek J y Melcher AH, Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats, Cell Tissue Res., 254: 317-330, 1988). Se extrajo el fémur asépticamente, y se eliminaron los tejidos blandos circundantes en lo posible. Se recortó la epífisis mesodistal del fémur, y se inyectó el tejido de médula ósea en 5 ml de medio alfa medio esencial mínimo que contenía 15S (α-MEM, GIBCO) en 10 ml del mismo caldo de cultivo mediante la utilización de una jeringa. El tejido obtenido se cultivó en αMEM que contenía 15S a 37°C, y se utilizaron las células de las generaciones tercera a quinta para los experimentos.

(iv) *Cementoblastos derivados de ratón*

Se utilizaron como cementoblastos derivados de ratón, células de la cepa celular OCCM30 (Bone, julio de 1999, 25(1):39-47). Esta cepa celular fue proporcionada por el profesor Somerman, del School of Dentistry University of Washington.

(2) *Efectos del péptido de la presente invención sobre el crecimiento celular*

Las células PDL preparadas en (1) se inocularon en una placa de cultivo de 24 pocillos (FALCON) a una proporción de 5x10³ células/pocillo. Tras la inoculación, las células se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10% durante 1 día. El día 0, el día siguiente de la inoculación, se añadió el péptido (a) preparado anteriormente a un medio d cultivo (DMEM que contenía FBS al 2%) a diversas concentraciones. Los días 4 y 6, las células se separaron y se dispersaron mediante la utilización de PBS que contenía tripsina al 0,08% y ácido etilendiamintetraacético (EDTA) al 0,04% y se realizó un recuento del número de células mediante la utilización de un contador Coulter (COULTER Z1, Coulter Electronics).

Además, también se examinaron de manera similar el péptido (a) y el anticuerpo anti-SPN16 (anticuerpo que se une a la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 3 existente en una molécula de sheathlin, proporcionada por el profesor Uchida de Hiroshima University) preincubados a 37°C durante 30 minutos.

Además, a modo de control, también se examinó de manera similar DMEM que contenía FBS al 2%.

Los resultados se muestran en la fig. 1. En la fig. 1, el gráfico de columnas en la parte izquierda muestra los resultados del día 4, y el gráfico de columna en la parte derecha muestra los resultados del día 6. El símbolo “cont” en la fig. 1 indica los resultados para las células cultivadas en DMEM que contenía FBS al 2% solo. “PN” indica los resultados para las células cultivadas en medio añadido únicamente con el péptido (a) y “(anti)PN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio añadido con el producto de preincubación del péptido (a) y el anticuerpo anti-SPN16. En la fig. 1, “pg” y “ng” representan “pg/ml” y “ng/ml”, respectivamente.

Como resultado, al añadir el péptido (a), las células PDL se incrementaron significativamente, y este efecto resultó inhibido por el anticuerpo anti-SPN16 (que se une al péptido (a)). De esta manera, se demostró que el péptido (a) presentaba un efecto estimulante del crecimiento celular.

Además, también se examinó de manera similar el péptido (c). Se muestran los resultados en la fig. 2. En la fig. 2, el gráfico de columna en la parte izquierda muestra los resultados del día 4, y el gráfico de columnas en la parte derecha muestra los resultados el día 6. El símbolo “cont” en la fig. 2 indica los resultados para las células cultivadas en DMEM que contenía FBS al 2% solo, “PC” indica los resultados para las células cultivadas en el medio añadido únicamente con el péptido (c), y “(anti)PC” indica los resultados para las células cultivadas en el medio añadido con el producto de preincubación del péptido (c) y el anticuerpo anti-SPEC15. En la fig. 2, “pg” y “ng” representan “pg/ml” y “ng/ml”, respectivamente.

Como resultado, se observó una tendencia a que, al añadir el péptido (c), las células PDL se incrementaba significativamente el número de células, y este efecto resultó inhibido por el anticuerpo anti-SPC15 (que se une al péptido (c)). Por lo tanto, se demostró que el péptido (c) presentaba un efecto estimulante del crecimiento celular.

Además, los péptidos (a) y (b) se examinaron de manera similar para el efecto estimulante del crecimiento celular sobre las células MC3T3. Se muestran los resultados en la fig. 3. En la fig. 3, el gráfico de columnas indica los resultados para las células cultivadas en α MEM que contenía FBS al 2% solo, “B” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que sólo se había añadido BMP2 (proteína morfogenética ósea 2, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), “HN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido el péptido (b), y “PN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido el péptido (a). En la fig. 3, las unidades de los valores numéricos mostrados después de “B”, “HN” y “PN” son “ng/ml”.

Como resultado, al añadir el péptido (a) o (b), las células MC3T3 se incrementaron significativamente el día 6. Por lo tanto, se demostró que los péptidos (a) y (b) presentaban un efecto estimulante del crecimiento celular.

(3) Efectos del péptido de la presente invención sobre la diferenciación celular

Como índice de la diferenciación celular, se determinó la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de las células. Se inocularon las células en una placa de cultivo de 24 pocillos a una proporción de 5×10^3 células/pocillo, se les añadió el péptido (a) a diversas concentraciones y se cultivaron en DMEM o α MEM que contenía FBS al 2%. Una semana después del punto temporal en que las células alcanzaban un estado de confluencia, se determinó la actividad de ALP mediante el método enzimológico siguiente (método de Bessey-Lowry, Bessey OA, Lowry OH y Brock MJ, A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeter of serum, J. Biol. Chem., 164:321-329, 1946).

Método para determinar la actividad de ALP

Las células cultivadas se lavaron con PBS y después se sonicaron en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,4, 500 μ l) durante 40 segundos mediante la utilización de un homogeneizador ultrasónico (Handi Sonic modelo UR-20P, Tomy Seiko) y se agitaron. A continuación, se añadieron 25 μ l de esta muestra líquida a 125 μ l de tampón de ALP (tampón carbonato 0,1 M, pH 9,8, fosfato de p-nitrofenilo 6,7 mM, MgCl₂, 2 mM) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Se terminó la reacción mediante la adición de 125 μ l de NaOH 0,2 N y se midió la absorbancia a 405 nm mediante la utilización de un lector de microplacas (modelo 550, Bio-Rad Laboratories).

Además, también se examinó de manera similar la actividad de ALP en DMEM que contenía FBS al 2% y DMEM o α MEM que contenía FBS al 2% añadido con el péptido (c) a diversas concentraciones. Se muestran los resultados en la fig. 4. El símbolo “cont” en la fig. 4 indica los resultados para las células cultivadas en DMEM que contenía FBS solo, “PN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido péptido (a), y “PC” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que se había añadido únicamente el péptido (c). En la fig. 4, “pg” y “ng” representan “pg/ml” y “ng/ml”, respectivamente.

Como resultado, al añadir el péptido (a) o (c), la actividad de ALP de las células PDL se incrementó significativamente. Por lo tanto, se demostró que los péptidos (a) y (c) presentaban un efecto estimulador de la diferenciación celular.

Adicionalmente, además del péptido (a) (derivado de porcino), se examinaron de manera similar el péptido (b) derivado de ser humano y BMP. Los resultados de la medición de la actividad de ALP realizados al alcanzar las células un estado de confluencia, se muestran en la fig. 6. El símbolo “cont” en las figuras indica los resultados para las células cultivadas en DMEM que contenía FBS al 2% solo, “B” indica los resultados para las células en el medio al que únicamente se había añadido BMP2, “PN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido el péptido (a), y “HN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido el péptido (b). En las figuras, las unidades de los valores numéricos mostrados después de “B”, “PN” y “HN” son “ng/ml”.

Como resultado, al añadir el péptido (a) o (b), la actividad de ALP de las células PDL se incrementó significativamente. Además, este efecto fue comparable o superior al de BMP2. Estos resultados demuestran que los péptidos (a) y (b) presentan un efecto estimulante de la diferenciación celular extremadamente alto.

Además, los péptidos (a) y (b) y BMP2 se examinaron de manera similar mediante la utilización de las células ST2 y las células BMMSC. Las actividades de ALP determinadas al alcanzar un estado confluyente las células ST2 y

ES 2 347 245 T3

BMMSC se muestran en las figs. 7 y 8, respectivamente. El símbolo “cont” en las figuras indica los resultados para las células cultivadas en α MEM que contenía FBS al 2% solo, “B” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido BMP2, “HN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido el péptido (b), y “PN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido el péptido (a). En las figuras, las unidades de los valores numéricos mostrados después de “B”, “HN” y “PN” es “ng/ml”.

Como resultado, los péptidos (a) y (b) mostraron un efecto estimulantes de la diferenciación celular significativo no sólo sobre las células PDL sino también sobre las células ST2 y las células BMSSC. Además, este efecto fue comparable o superior al de BMP2. Estos resultados también demostraron que los péptidos (a) y (b) presentaban un efecto estimulante de la diferenciación celular extremadamente alto.

Además, se examinaron de manera similar los péptidos (a) y (b) mediante la utilización de las células MC3T3. La actividad de ALP determinada al alcanzar las células un estado confluyente se muestra en la fig. 9, y la actividad de ALP determinada una semana después de alcanzar la actividad de ALP se muestra en la fig. 10. El símbolo “cont” en las figuras indica los resultados para las células cultivadas en α MEM que contenía FBS al 2% solo, “PN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido el péptido (a), y “HN” indica los resultados para las células cultivadas en el medio al que únicamente se había añadido el péptido (b). Además, “ng” en las figuras representa “ng/ml”.

Como resultado, los péptidos (a) y (b) mostraban un efecto estimulante de la diferenciación significativo sobre las células MC3T3 con buena reproducibilidad.

Además, se examinó de manera similar el péptido (a) mediante la utilización de las células OCCM30. Se muestran los resultados en la fig. 11. El símbolo “cont” en la figura indica los resultados para las células cultivadas en DMEM que contenía FBS al 2% solo, y “PN” indica los resultados para las células cultivadas en medio al que únicamente se había añadido el péptido (a). Además, “ng” en la figura representa “ng/ml”.

Como resultado, el péptido (a) mostraba un efecto estimulante de la diferenciación celular significativo también sobre las células OCCM30.

Además, los péptidos (b) y (f) a (j) se examinaron de manera similar a una concentración final de 100 ng/ml mediante la utilización de la cepa celular MC3T3. Se muestran los resultados en la fig. 12. El símbolo “cont” en la figura indica los resultados para las células cultivadas en DMEM que contenía FBS al 2% sólo.

Como resultado, se demostró que el péptido (b) mostrar un efecto estimulante de la diferenciación alto sobre la cepa celular MC3T3, y los péptidos (f) a (j) también mostraban un efecto estimulante de la diferenciación celular más alto que el control, aunque la diferencia era reducida.

Además, de manera similar se examinaron los péptidos (b) y (k) a (n) a una concentración final de 100 ng/ml mediante la utilización de la cepa celular ST2. Se muestran los resultados en la fig. 13. El símbolo “cont” en la figura indica los resultados para las células cultivadas en DMEM que contenía FBS al 2% sólo.

Como resultado, se demostró que todos los péptidos mostraban un efecto estimulante de la diferenciación celular significativamente elevado sobre la cepa celular ST2. Estos resultados revelaron que incluso los péptidos obtenidos mediante la adición de varios residuos aminoácidos en el extremo N-terminal y/o C-terminal del péptido (b) y los péptidos obtenidos mediante la sustitución de una parte de los residuos aminoácidos en el péptido (b) mostraron un efecto estimulante de la diferenciación celular alto.

Efecto del péptido sobre la capacidad de formación de producto de calcificación de las células

Se llevó a cabo el experimento siguiente para examinar el efecto del péptido sobre la capacidad de formación de producto de calcificación de las células.

Para evaluar la capacidad de de calcificación de las células, se llevó a cabo una tinción de calcio de Dahl. Se inoculó una placa de cultivo de 24 pocillos con células PDL a una proporción de 5×10^3 células/pocillo y se cultivaron en DMEM que contenía 2S añadido al péptido (a) o (c) a diversas concentraciones y ajustado mediante la adición de β -glicerofosfato sódico 10 mM. Tres semanas después, las células alcanzaron un estado confluyente, las células se lavaron con PBS, se fijaron con formalina tamponada neutramente y se tiñeron con rojo de alizarina S (Wako Pure Chemical Industries).

Como resultado, al añadir el péptido (a) o (c), se incrementó significativamente la capacidad de calcificación de las células PDL. Por lo tanto, se demostró que los péptidos (a) y (c) presentaban un efecto estimulante de la diferenciación celular.

Además, se examinó de manera similar el péptido (a), BMP2 y TGF β mediante la utilización de las células MC3T3. Como resultado de la evaluación dos semanas después de alcanzar un estado confluyente, el péptido (a) mostró un efecto estimulante de la diferenciación celular significativo no sólo sobre las células PDL sino también sobre las

ES 2 347 245 T3

células MC3T3. Además, este efecto era comparable o superior al de BMP2. Estos resultados también demuestran que el péptido (a) presentaban un efecto estimulante de la diferenciación celular extremadamente alto.

Ejemplo 3

5 *Estudio farmacológico 1 utilizando animales*

El experimento siguiente se llevó a cabo con el fin de examinar la acción del péptido de la presente invención sobre un modelo de enfermedad periodontal.

10 (i) *Preparación del modelo de enfermedad periodontal*

Se anestesiaron sistemáticamente ratas Wistar de 8 semanas de edad con una solución de 0,5 ml de carbamato de etilo por cada 100 gramos de peso corporal, y después se seccionaron verticalmente las encías mesiales de cada primer molar del maxilar superior. Se levantó el colgajo periostial gingival para exponer el hueso alveolar mesial del primer molar. A continuación, se formó un defecto que presentaba una longitud de aproximadamente 2 mm y un diámetro bucolingual de aproximadamente 1 mm desde la cresta ósea alveolar del mismo sitio hacia el lado del ápice de raíz, mediante la utilización de una fresa de fisura mientras se vertía solución salina para exponer la cara mesial de la raíz del primer molar del maxilar superior. Se extrajo el cemento de la raíz y la superficie de dentina conjuntamente con el ligamento periodontal unido a la cara expuesta de la raíz, de manera que se formase una cavidad de poca profundidad.

20 (ii) *Método de ensayo*

En el defecto anteriormente mencionado, se aplicó sobre la cara expuesta de la raíz una muestra preparada con solución de PBS al 1% de hialuronato sódico (peso molecular medio en peso: 900.000), y se reposicionó el colgajo periostial gingival y se suturó. Mediante la utilización de un grupo de los animales a los que se había aplicado solución de PBS al 1% de hialuronato sódico que contenía el péptido (a) (concentración del péptido (a): 0,3 mg/ml) como grupo de péptido, de un grupo de animales en los que se había aplicado únicamente solución de PBS al 1% de hialuronato sódico como grupo de ácido hialurónico, y de un grupo de animales que no había recibido ninguna sustancia antes de la sutura del colgajo periostial gingival para la restauración, como grupo de control, se compararon las condiciones de cicatrización un mes después de la operación.

Método para la preparación de especímenes histológicos

Se eutanizaron los animales con cloroformo, y se extrajo cada sitio experimental. El hueso de maxilar superior extraído se fijó mediante inmersión en formalina tamponada neutramente durante 1 día y después se descalcificó durante 2 días mediante la utilización de una solución descalcificante rápida (K-CX). Se incluyó el espécimen en parafina de un modo convencional, después se preparó una sección mesiodistal que presentaba un grosor de 4,5 mm paralela al eje longitudinal de la raíz del diente en el sitio experimental y se tiñó con hematoxilina/eosina. Se evaluó mediante microscopía óptica la condición de adhesión entre el tejido periodontal y la superficie expuesta de la raíz del diente en el sitio del defecto y la posición del ápice del hueso alveolar.

(iii) *Resultados*

Aunque se observó crecimiento hacia abajo del epitelio tanto en el grupo de control como en el grupo de ácido hialurónico, se observó en menor grado en el grupo de péptido. Además, las deposiciones de cemento y de cemento con inserción de fibras de Sharpey apenas se observó tanto en el grupo de control como en el grupo de ácido hialurónico, y con frecuencia se observó separación entre las encías y la raíz del diente. Por otra parte, no se observó dicha separación en el grupo de péptido, y sobre la superficie de la raíz expuesta, se observó deposición de cemento con fibras de Sharpey, es decir, formación de unión de tejido conectivo nuevo. Además, la regeneración ósea era más activa que en los otros dos grupos, y se observó una elevada capacidad de regeneración del hueso.

Ejemplo 4

55 *Estudio farmacológico 2 utilizando animales*

Se llevó a cabo el experimento siguiente con el fin de examinar la acción del péptido de la presente invención sobre un modelo de pérdida ósea.

60 (i) *Preparación de modelo de pérdida ósea*

Se anestesiaron sistémicamente ratas Wistar macho (de 8 semanas de edad) con una solución de 0,5 ml de carbamato de etilo por cada 100 gramos de peso corporal, y después se seccionó la piel de las tibias de las patas traseras derecha e izquierda y el periostio de las tibias, y éste se levantó para exponer las tibias. A continuación, se perforó un orificio de 2 mm de diámetro en el hueso cortical en el mismo sitio utilizando una fresa redonda mientras se vertía solución salina fisiológica para formar un defecto que alcanzase la cavidad medular (diámetro: 2 mm, profundidad: 3 mm).

(ii) *Método de ensayo*

Se rellenó el sitio de pérdida ósea con el péptido (a) (concentración: 0,3 mg/ml ó 3 mg/ml) disuelto en una preparación de hialuronato sódico (marca comercial: ARTZ (marca comercial registrada), peso molecular medio en peso de hialuronato sódico: aproximadamente 900.000, concentración de hialuronato sódico: 1%) y se reposicionaron el periostio y la piel y se suturaron. Se examinaron mediante rayos X las condiciones de cicatrización de los animales 3 semanas después de la operación en un grupo de animales que recibió relleno del péptido (grupo de péptido), un grupo de animales en los que se había aplicado solución de PBS al 1% de hialuronato sódico como vehículo solo (grupo de HA) y un grupo de animales en los que no se había aplicado ninguna sustancia antes de la sutura del colgajo de piel periostial (grupo de control).

(iii) *Resultados*

En comparación con las imágenes de rayos X blandos para los grupos, mientras que la pérdida de óseo remanente se observaba con relativa claridad en el grupo de control y en el grupo de HA, se confirmó que en el grupo de péptido (concentración: 0,3 mg/ml ó 3 mg/ml), el hueso se había regenerado en el grado de que la pérdida ósea apenas podía reconocerse. Estos resultados demuestran que el péptido de la presente invención estimuló significativamente la regeneración ósea en el sitio de pérdida ósea.

(iv) *Otros efectos del péptido de la presente invención*

De una manera similar, se llevaron a cabo experimentos con gel de colágeno (marca comercial: Koken Atelocollagen Implant, Koken) y los péptidos (a) y (b) (concentración: 3 mg/ml). Como resultado, mientras que la pérdida ósea remanente se observó con relativa claridad en el grupo de control y en el grupo de gel de colágeno, se confirmó que el hueso se había regenerado en la medida en que la pérdida ósea apenas podía reconocerse, no sólo tras utilizar el péptido (a), sino también tras utilizar el péptido (b). Estos resultados demuestran que el péptido de la presente invención estimula significativamente la regeneración ósea en el sitio de la pérdida ósea.

Ejemplo 5

Ejemplo de preparación 1

A continuación se describen ejemplos de preparación del agente de la presente invención. Sin embargo, estos son meros ejemplos, y la forma de dosificación del agente de la presente invención no se encuentra limitada a ellos.

(1) *Pomada*

Péptido (a) producido anteriormente	10 mg
Monoestearato de sorbitán	7 mg
Monoestearato de polioxietilén sorbitán	7 mg
Palmitato de isopropilo	37 mg
Vaselina	37 mg
Parafina líquida	37 mg
Cetanol	50 mg
Glicerol	70 mg
Estearato de magnesio	2 mg

Se añadió agua purificada a los ingredientes anteriormente indicados, obteniendo 1 gramo de crema.

(2) *Tableta*

Péptido (b) producido anteriormente	100 mg
Lactosa	670 mg
Almidón de patata	150 mg
Celulosa cristalina	60 mg
Ácido silícico anhidro ligero	50 mg

Se mezclaron los ingredientes anteriormente indicados, se añadieron a una solución de 30 mg de hidroxipropilcelulosa disuelta en metanol (al 10% en peso de hidroxipropilcelulosa), se amasaron y después se peletizaron. Los pellets se extrusieron a través de un tamiz con aperturas de 0,8 mm de diámetro, se formaron gránulos, se secaron y después se añadieron a 15 mg de estearato de magnesio y se comprimieron en porciones de 200 mg para obtener tabletas.

ES 2 347 245 T3

(3) Cápsula

5	Péptido (b) producido anteriormente	100 mg
	Lactosa	80 mg

Se produjo una cápsula mediante la mezcla uniforme de los ingredientes anteriormente indicados y el relleno de la mezcla en una cápsula dura.

10 (4) Inyección

15	Péptido (a) producido anteriormente	30 mg
----	-------------------------------------	-------

Se disolvió el ingrediente anteriormente indicado en 2 ml de manitol acuoso al 5% y se sometió a filtración aséptica, se utilizó para rellenar una ampolla y después se selló.

20 (5) Inyección que debe disolverse al utilizarse

25	(A) Péptido (b) producido anteriormente (liofilizado) (relleno en una ampolla)	30 mg
	(B) PBS sometido a filtración aséptica (relleno en una ampolla)	2 ml

Se produjo una inyección que debía disolverse al utilizarse con (A) y (B) mencionados anteriormente, en forma de 1 conjunto. La inyección puede utilizarse mediante la disolución de (A) en (B) al utilizarse.

Ejemplo 6

30 Ejemplo de producción 2

A continuación se describen ejemplos de producción de la composición de la presente invención. Sin embargo, son meros ejemplos, y la composición, forma y otros de la composición de la presente invención no se encuentran limitados a ellos.

35 (1) Composición en estado líquido

40	Péptido (a) producido anteriormente	3 mg
	Solución de PBS al 1% de hialuronato sódico (peso molecular medio en peso: 900.000)	10 ml

45 Se produjo la composición de la presente invención en estado líquido mediante la mezcla de los ingredientes anteriormente indicados.

(2) Composición en estado líquido

50	Péptido (a) producido anteriormente	3 mg
	Solución de PBS al 0,1% de hialuronato sódico (peso molecular medio en peso: 2.200.000)	10 ml

55 Se produjo la composición de la presente invención en estado líquido mediante la mezcla de los ingredientes anteriormente indicados.

(3) Composición en estado seco

60	Péptido (b) producido anteriormente	30 mg
	Solución de PBS al 1% de hialuronato sódico (peso molecular medio en peso: 900.000)	10 ml

65 Se produjo la composición de la presente invención en estado seco mediante la mezcla de los ingredientes anteriormente indicados y liofilizando la mezcla.

ES 2 347 245 T3

Sheathlin que presenta la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención ya ha sido utilizado como ingrediente de agentes terapéuticos para enfermedades periodontales. Además, durante la adición (o administración) de los péptidos de la presente invención en los estudios farmacológicos anteriormente mencionados, se examinaron las condiciones de las células y animales cada día, y no se observó ningún cambio particular. Basándose en dichos resultados, pudo estimarse suficientemente la seguridad del péptido de la presente invención y del agente de la presente invención. Además, debido a que el ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo ya ha sido utilizada como ingrediente activo de compuestos farmacéuticos, también puede estimarse suficientemente la seguridad de la composición de la presente invención.

10 **Aplicabilidad industrial**

Debido a que el péptido de la presente invención es un péptido parcial de la molécula de sheathlin y muestra una actividad de crecimiento celular y de estimulación de la diferenciación celular marcadamente más altas que sheathlin, resulta extremadamente útil como ingrediente activo del agente de la presente invención, en particular, como agente estimulante del crecimiento celular, agente estimulante de la diferenciación celular o agente estimulante de la formación o regeneración de hueso, cartílago o tejido periodontal. Además, el péptido de la presente invención puede utilizarse como material para la medicina regenerativa o similar, y también resulta extremadamente útil desde este punto de vista.

Además, debido a que el péptido de la presente invención muestra una actividad biológica muy alta, tal como se ha indicado anteriormente, puede reducirse la cantidad del ingrediente activo en el agente de la presente invención que contiene el péptido de la presente invención como ingrediente activo. Por lo tanto, puede proporcionarse un agente seguro y menos caro de la presente invención.

El agente de la presente invención puede utilizarse con diversos fines, tales como la estimulación del crecimiento celular, la estimulación de la diferenciación celular y la estimulación de la formación o regeneración de hueso, cartílago o tejido periodontal, y por lo tanto resulta extremadamente útil.

Con la composición de la presente invención, se obtienen los efectos de que el péptido de la presente invención se retenga en un sitio objetivo, que el péptido de la presente invención se libere gradualmente en el sitio objetivo, y similares, en virtud de las propiedades fisicoquímicas del ácido hialurónico o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por lo tanto, la composición de la presente invención resulta extremadamente útil. Además, la composición de la presente invención resultaría extremadamente útil debido a que resulta probable que puedan mostrarse efectos biológicos todavía más ventajosos mediante la adición de las propiedades biológicas del ácido hialurónico o de una sal farmacéuticamente aceptable a las del péptido de la presente invención.

40

45

50

55

60

65

ES 2 347 245 T3

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente (B):

5 (B) Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala Ser Leu (SEC ID nº 4)

2. Agente que comprende el péptido según la reivindicación 1 como ingrediente activo.

10 3. Agente según la reivindicación 2, que es un medicamento.

4. Agente según la reivindicación 2 ó 3, que es un agente estimulante del crecimiento celular.

5. Agente según la reivindicación 2 ó 3, que es un agente estimulante de la diferenciación celular.

15 6. Agente según la reivindicación 2 ó 3, que es un agente estimulante de la formación o regeneración de hueso o cartílago.

20 7. Agente según la reivindicación 2 ó 3, que es un agente estimulante de la formación o regeneración del tejido periodontal.

8. Agente según la reivindicación 4 ó 5, en el que la célula es un osteoblasto, condroblasto, cementoblasto, célula madre mesenquimal derivada de médula ósea o célula derivada del ligamento periodontal.

25 9. Composición que comprende por lo menos el péptido según la reivindicación 1, y ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30

35

40

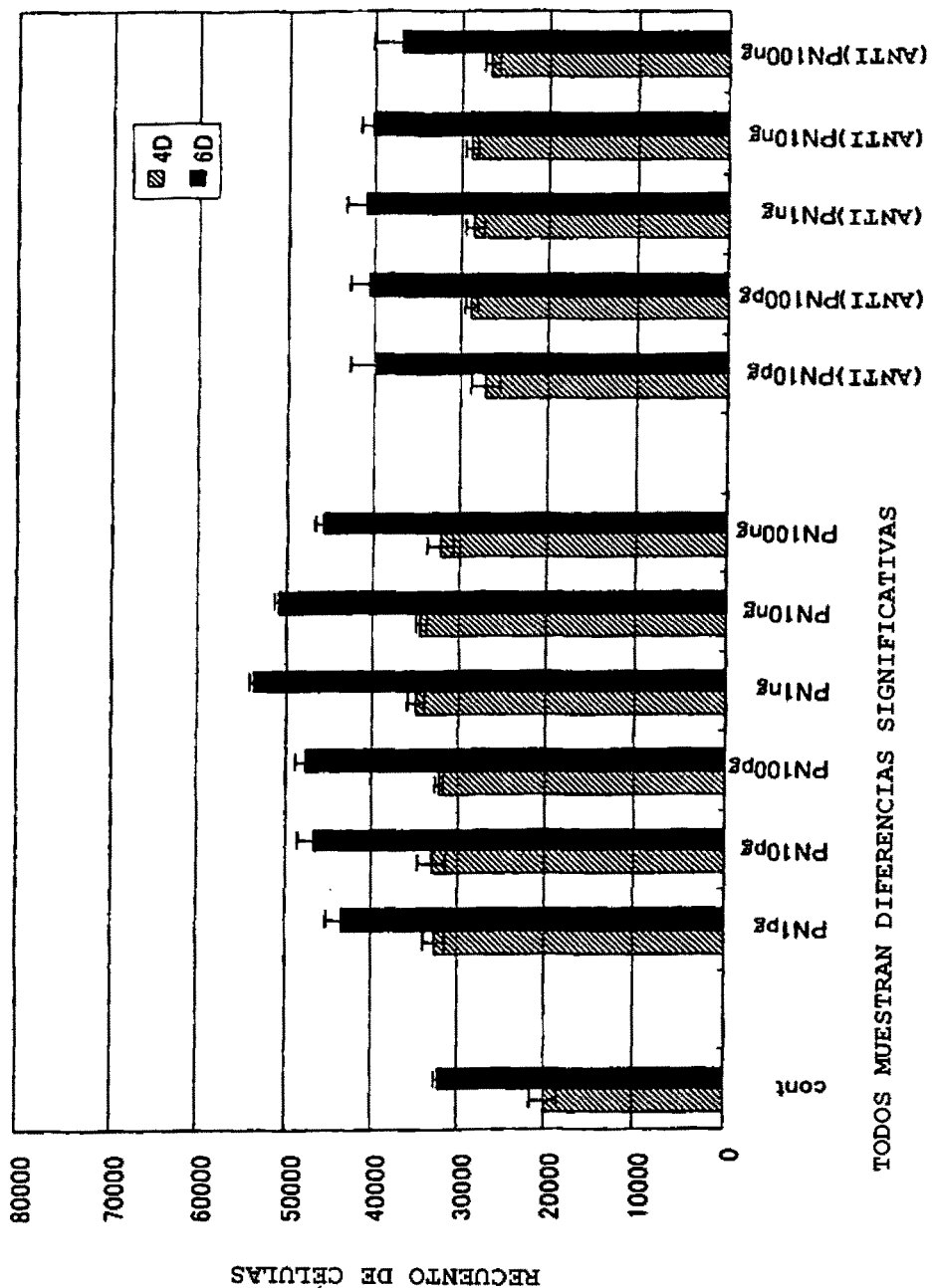
45

50

55

60

65



TODOS MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

Fig. 1

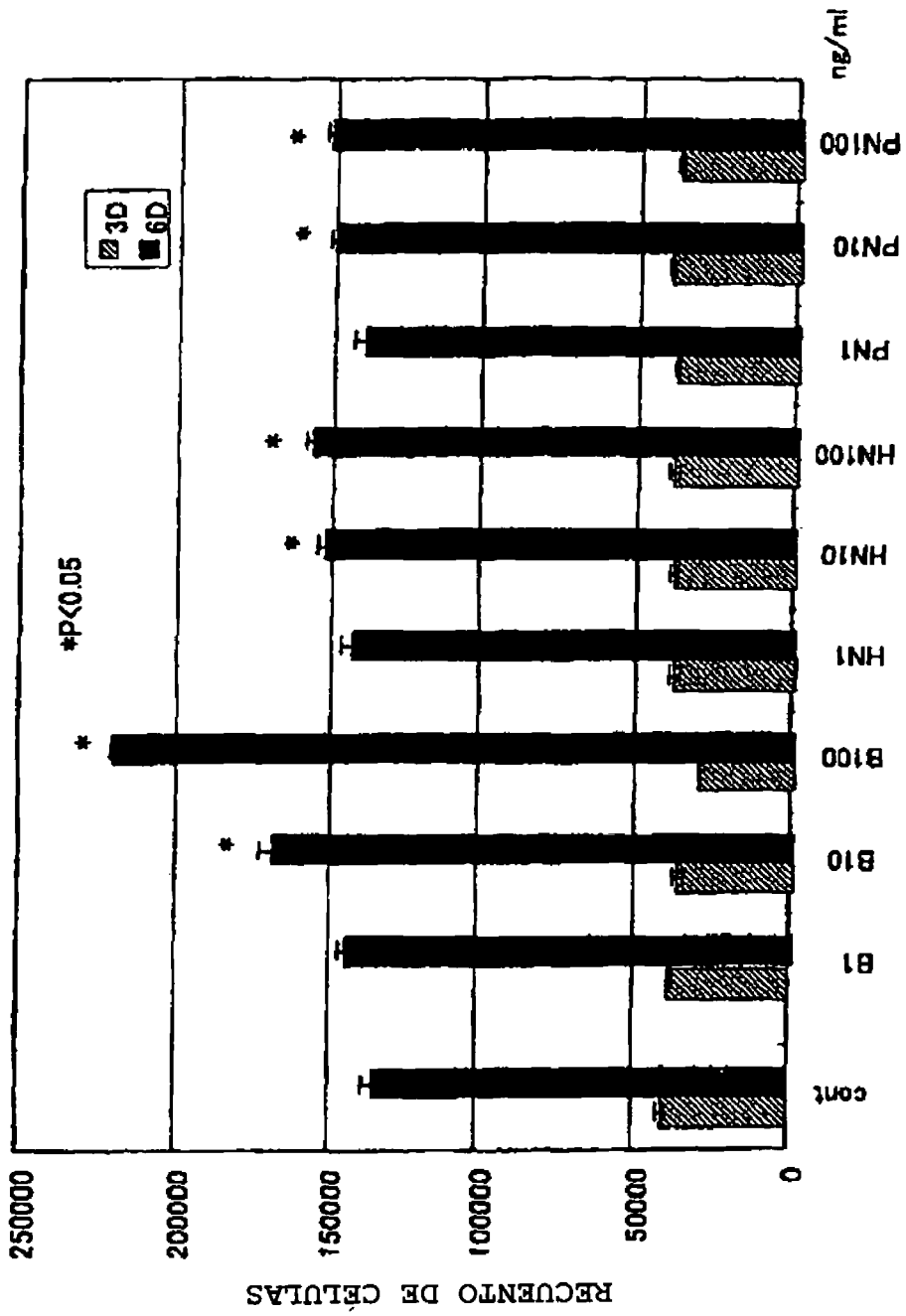
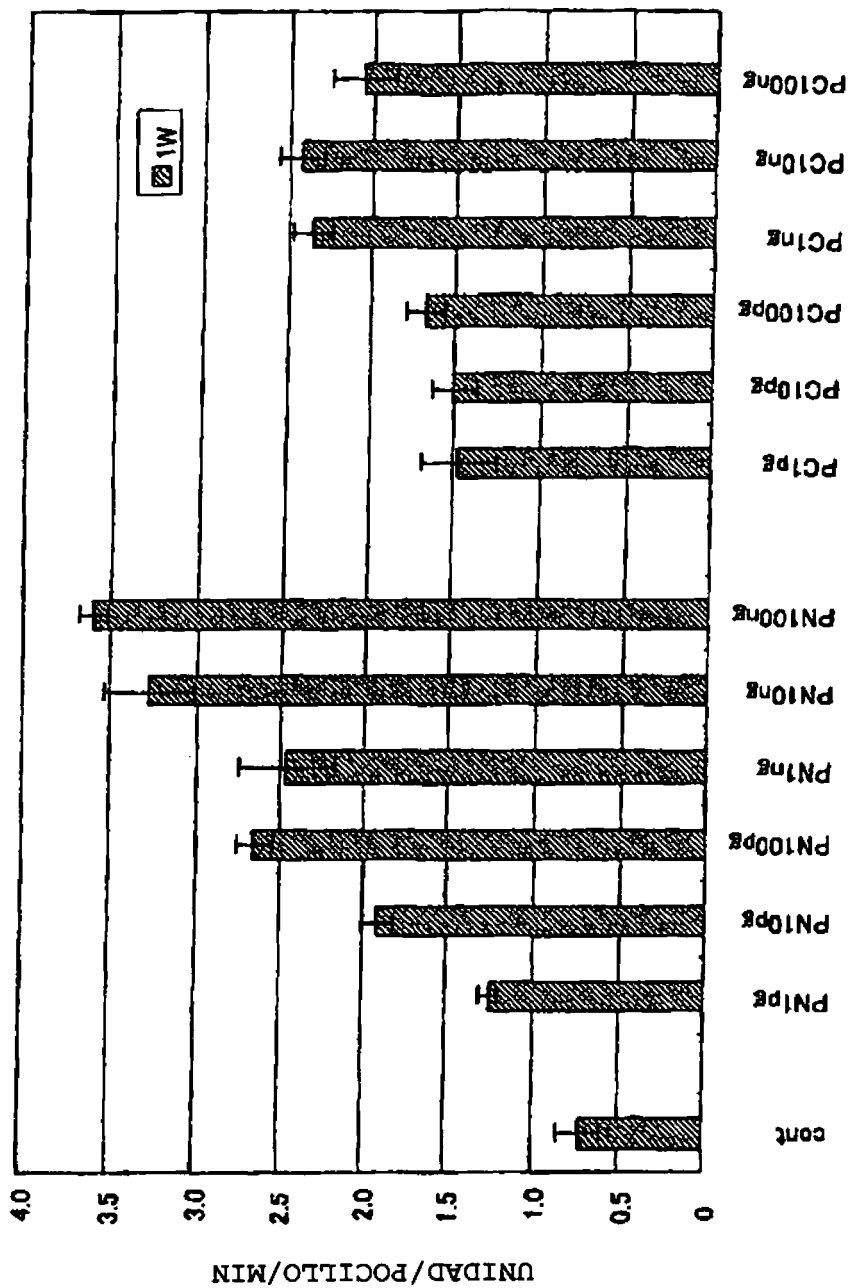


Fig. 2



TODOS MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

Fig. 3

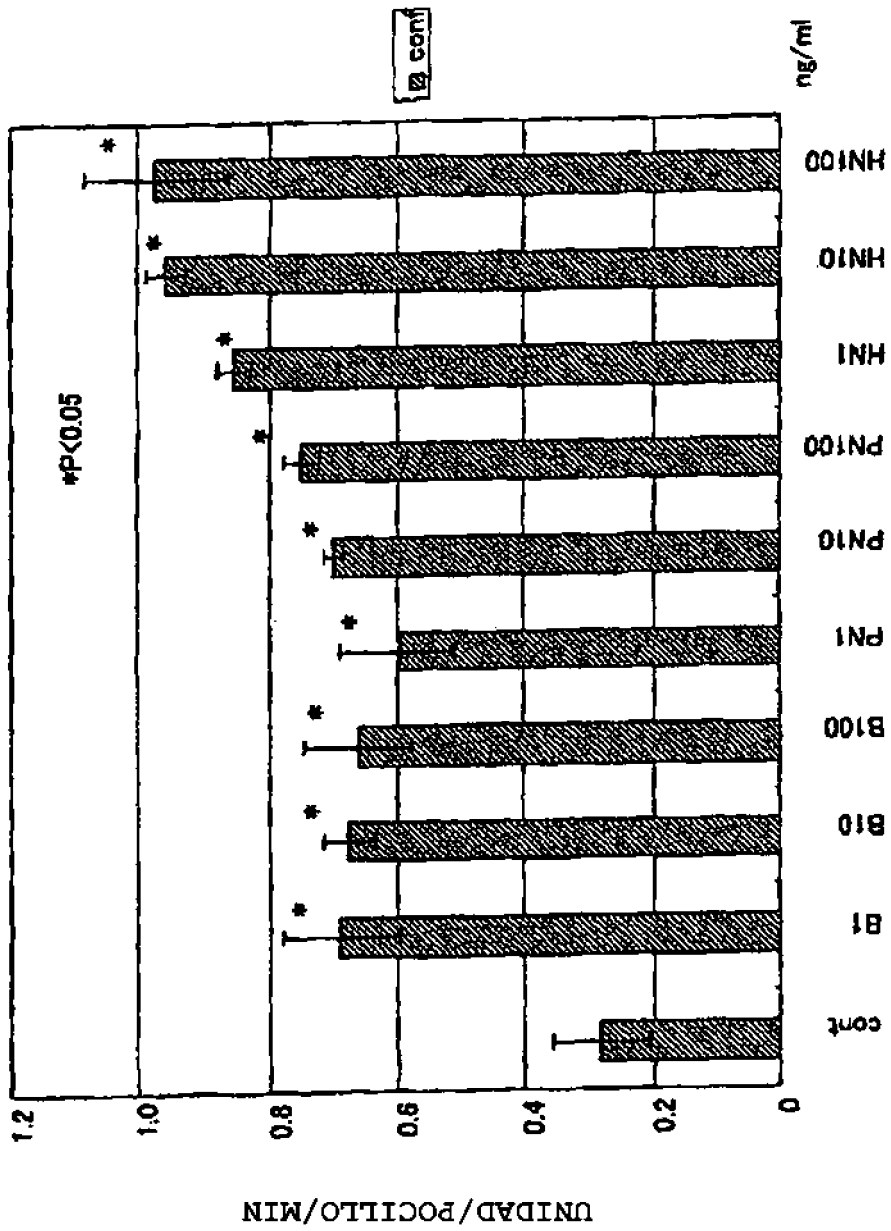


Fig. 4

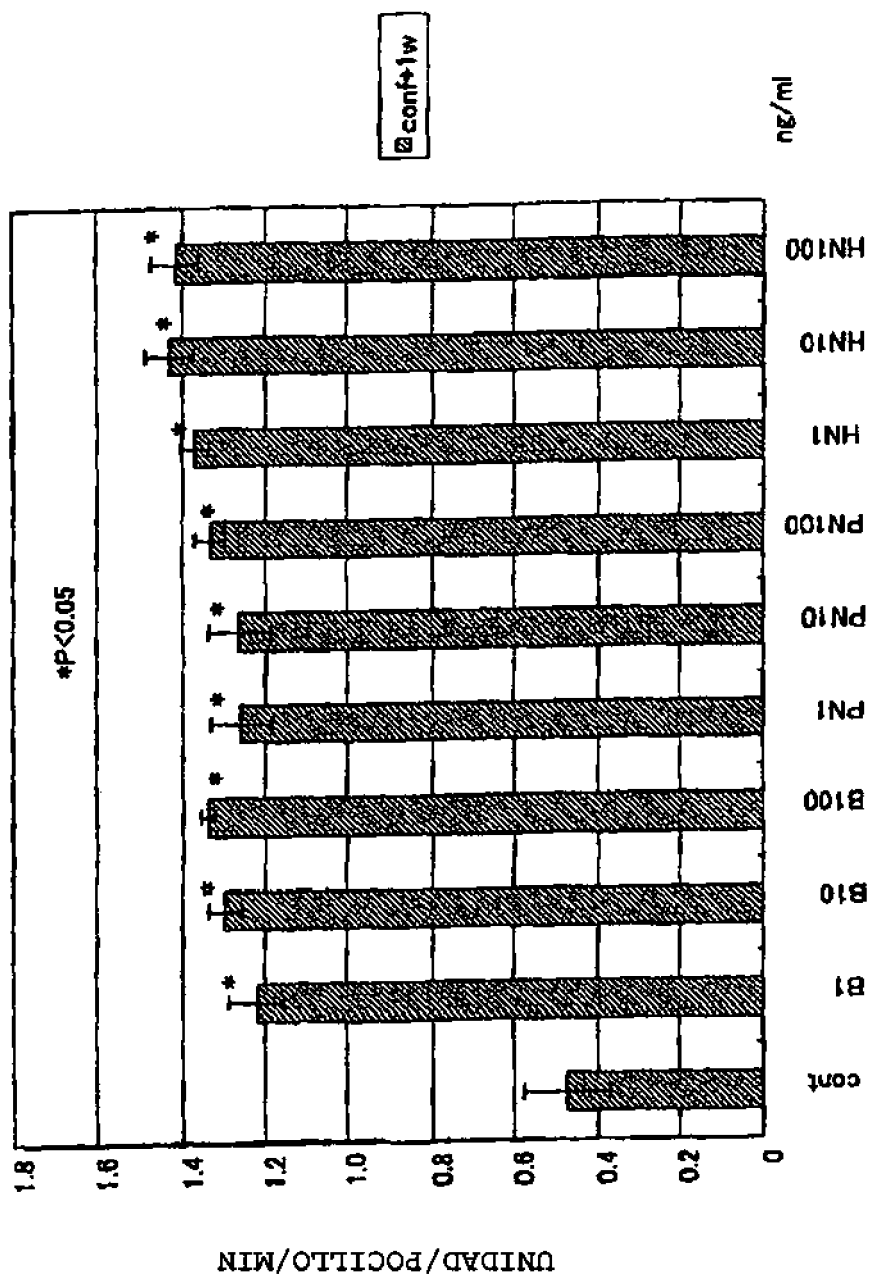


Fig. 5

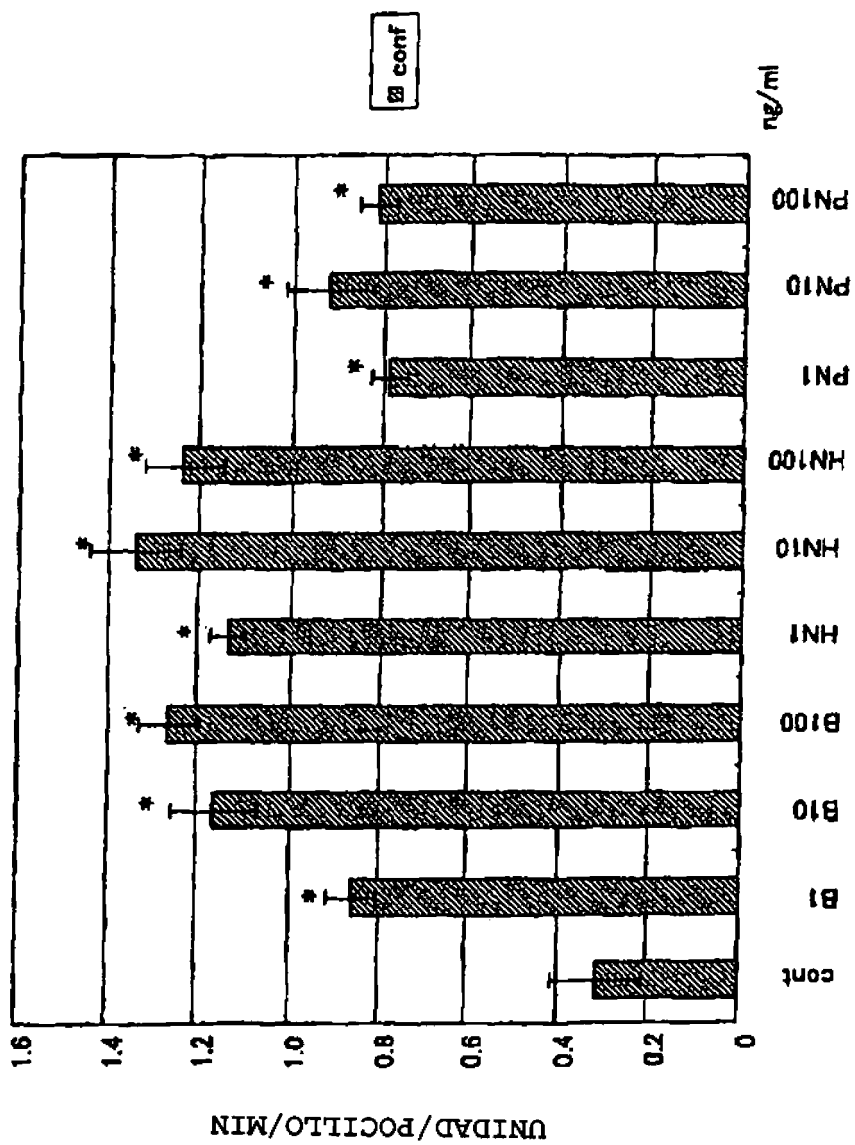


Fig. 6

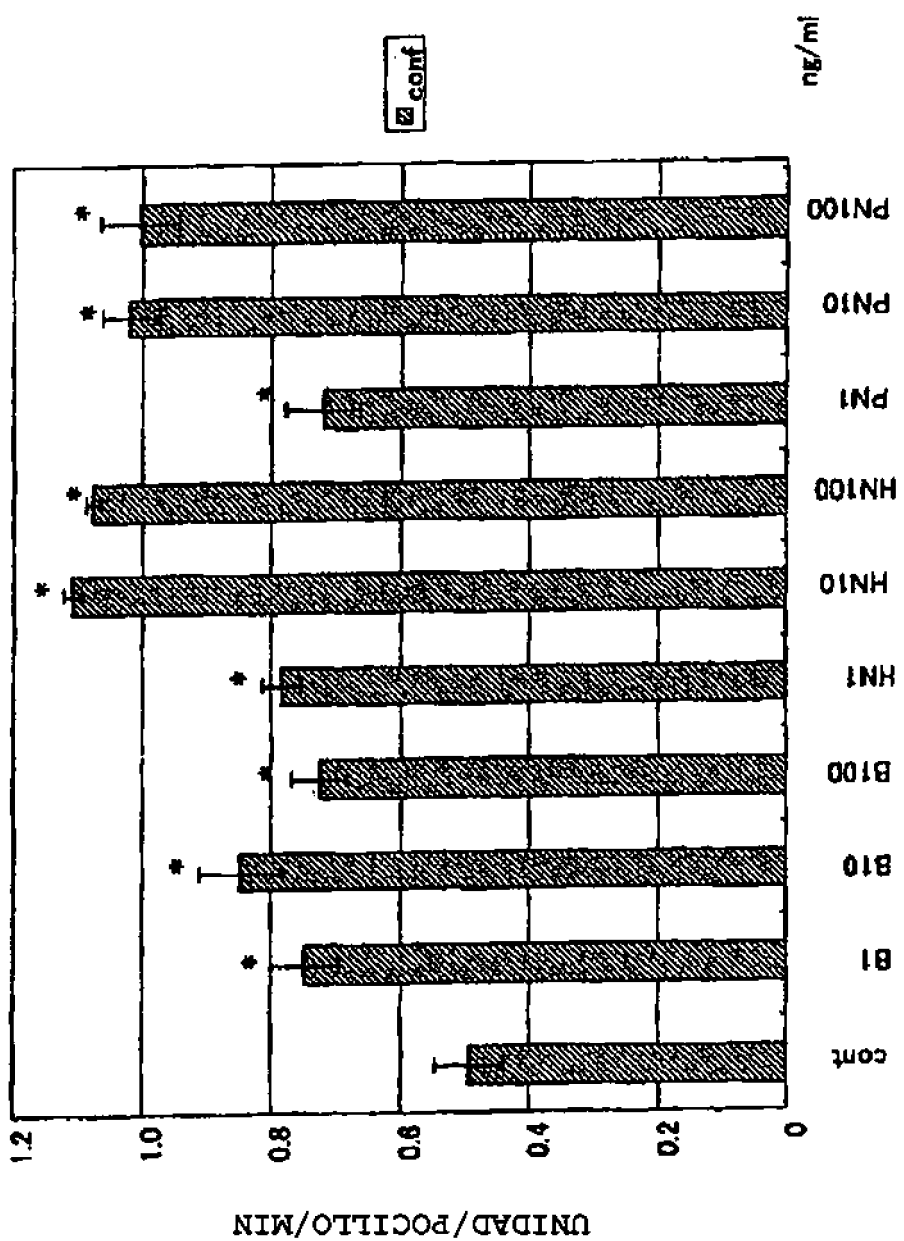


Fig. 7

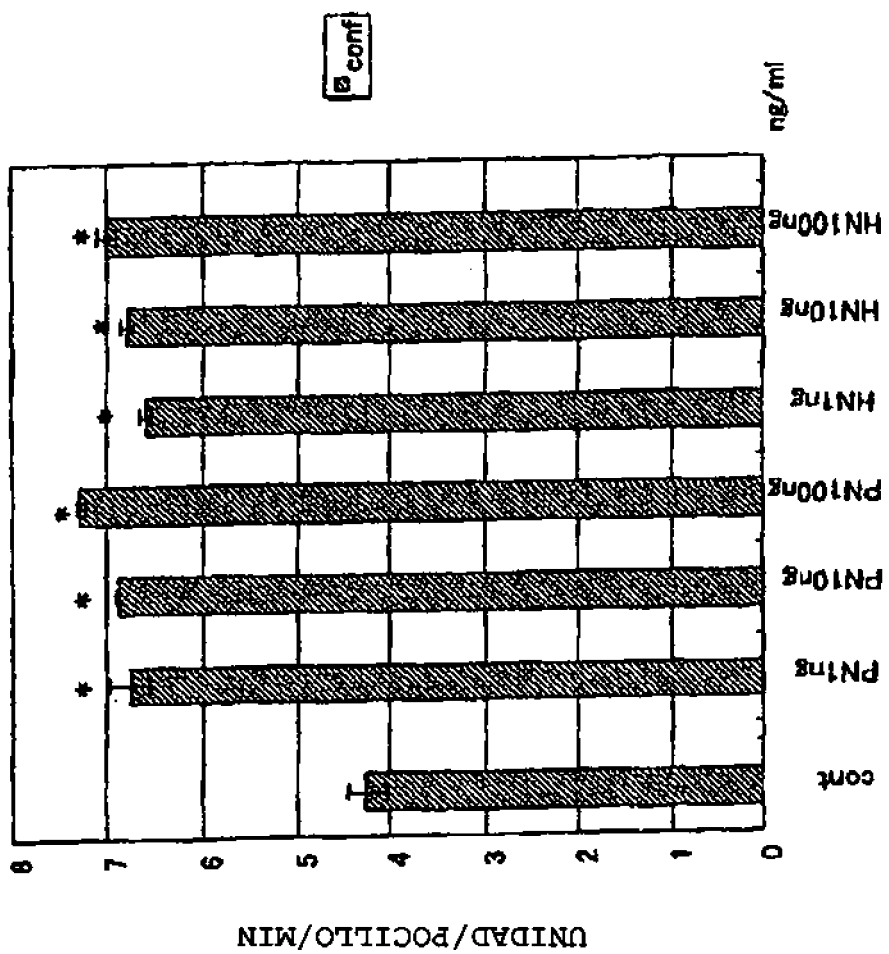


Fig. 8

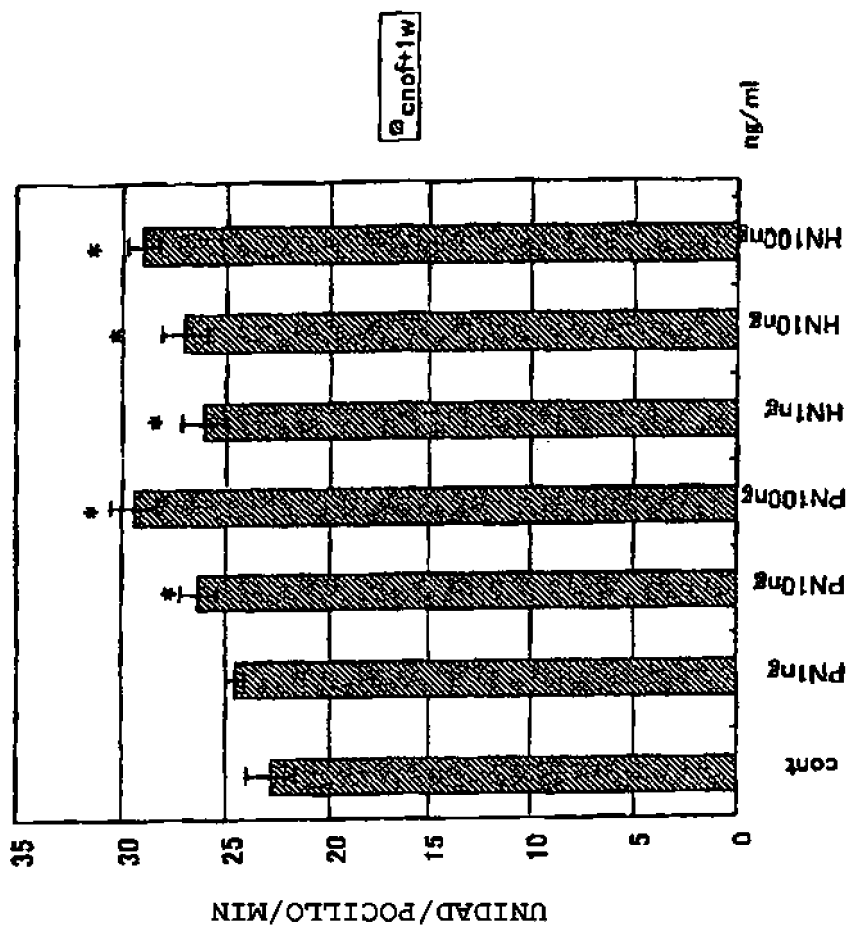


Fig. 9

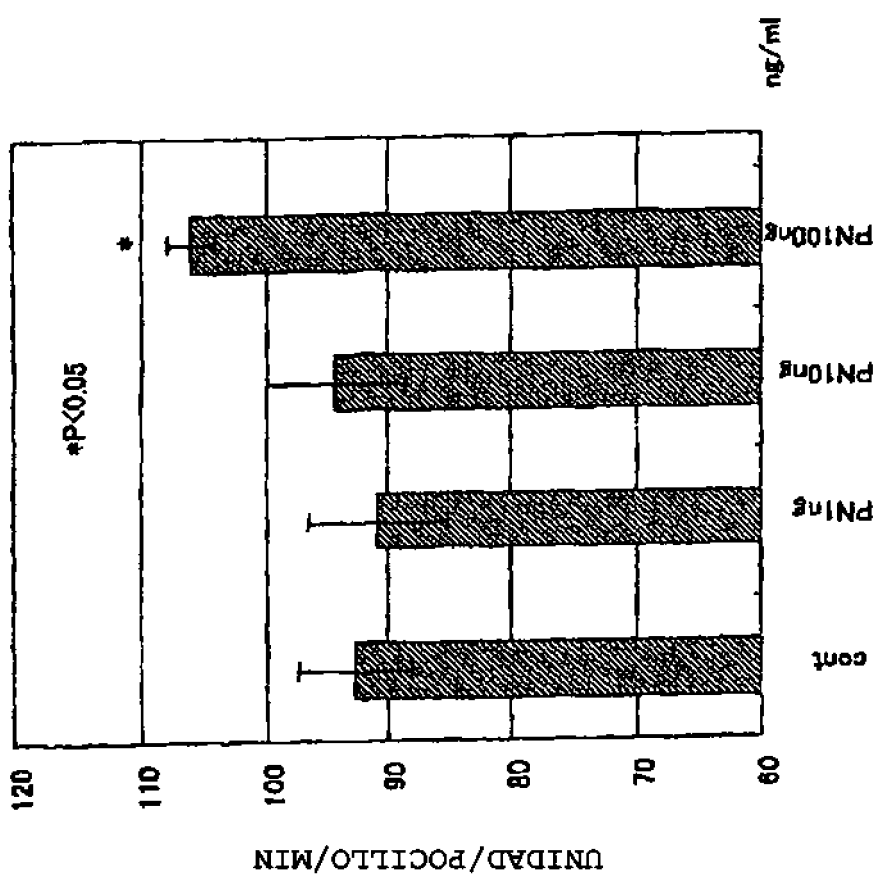


Fig. 10

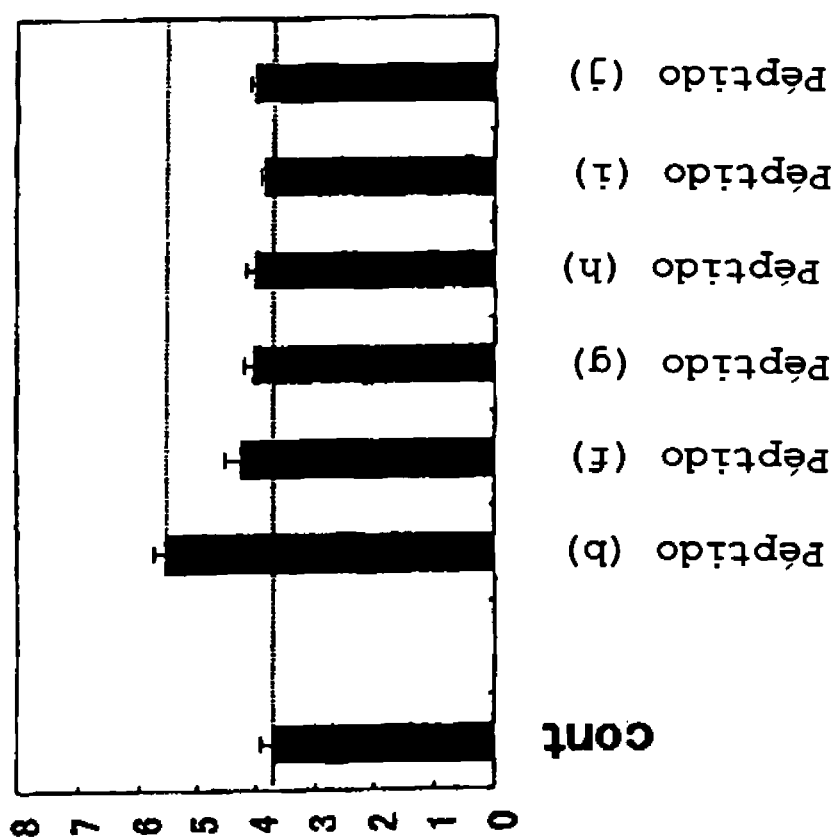


Fig. 11

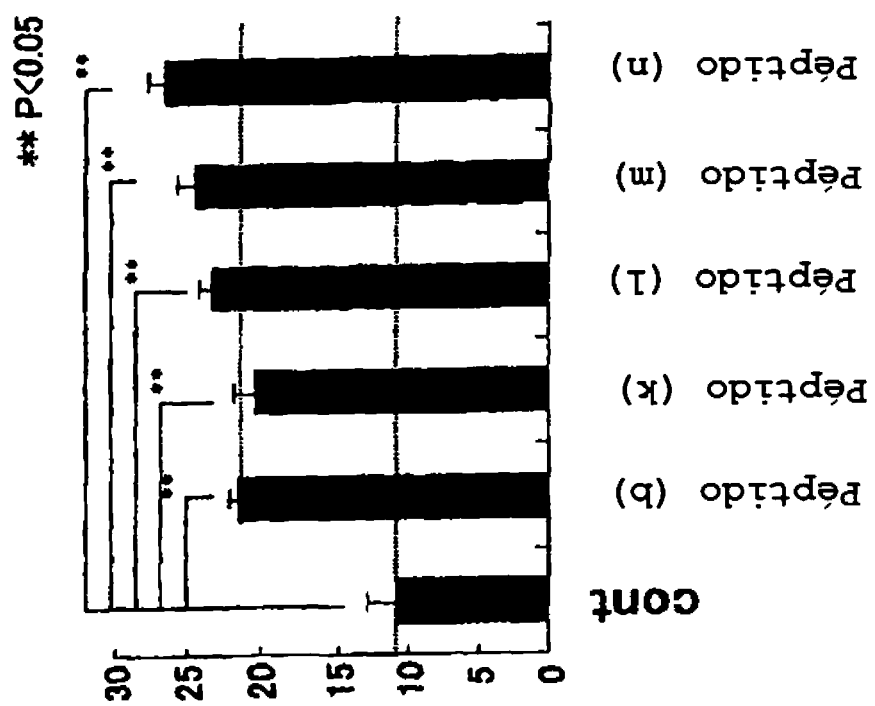


Fig. 12

ES 2 347 245 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SEIKAGAKU CORPORATION

5 <120> PÉPTIDO FISIOLÓGICAMENTE ACTIVO Y FÁRMACOS QUE CONTIENEN EL MISMO

<130> F200404C4007

10 <150> JP 2003 <45166

<151> 2003-02-21

15 <160> 25

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

20 <211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

30 <223> Péptido parcial de sheathlin en el que Xaa en la posición 1=Val o Gln, Xaa en la posición 3=Ala, Phe o Gly, Xaa en la posición 4=Phe o Leu, Xaa en la posición 5=Pro o Lys, Xaa en la posición 6=Arg, Gln o Pro, Xaa en la posición 7=Gln, Arg o Phe, Xaa en la posición 8=Pro, Ser o Leu, Xaa en la posición 9=ninguno, Gly o Gln, Xaa en la posición 10=ninguno, Ala, Gly o Pro, Xaa en la posición 11=ninguno, Gln o Thr, Xaa en la posición 12=ninguno, Gly o Ala, Xaa en la posición 13=ninguno, Met o Ala, Xaa en la posición 14=Gly, Ala o Thr, Xaa en la posición 15=Thr, Ile, Pro o Gly, Xaa en la posición 16=Pro o Val, Xaa en la posición 17=Gly o Gln, Xaa en la posición 18=Val, Met o Gly, Xaa en la posición 19=Ala o Thr, Xaa en la posición 20=Ser o Pro, y Xaa en la posición 21=Leu o Gln.

35

<400> 1

40 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

<210> 2

45 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

50 <220>

<223> Péptido parcial de sheathlin en el que Xaa en la posición 3=Ala o Phe, Xaa en la posición 6=Arg o Gln, Xaa en la posición 8=Pro o Ser, Xaa en la posición 10=Thr o Ile, y Xaa en la posición 13=Val, Met o Gly.

55 <400> 2

 Val Pro Xaa Phe Pro Xaa Gln Xaa Gly Xaa Pro Gly Xaa Ala Ser Leu

60

 1 5 10 15

<210> 3

65 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 347 245 T3

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin.

5 <400> 3

	Val	Pro	Ala	Phe	Pro	Arg	Gln	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Val	Ala	Ser	Leu
	1				5					10					15	

10 <210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin

20 <400> 4

	Val	Pro	Phe	Phe	Pro	Gln	Gln	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Met	Ala	Ser	Leu
	1				5					10					15	

25 <210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin

35

<400> 5

	Val	Pro	Ala	Phe	Pro	Gln	Gln	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Met	Ala	Ser	Leu
	1				5					10					15	

40

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

45

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin

50

<400> 6

	Val	Pro	Ala	Phe	Pro	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Gln	Gly	Met	Ala	Pro	Pro
	1				5					10					15	
		Gly	Met	Ala	Ser	Leu										
																20

55

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

65

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin

ES 2 347 245 T3

<400> 7

```

    Val Pro Ala Phe Pro Gln Arg Pro Gly Gly Gln Gly Met Ala Pro Pro
    1           5           10           15
5    Gly Met Ala Ser Leu
           20

```

<210> 8

10 <211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Péptido parcial de sheathlin

<400> 8

```

    Gln Pro Gly Leu Lys Pro Phe Leu Gln Pro Thr Ala Ala Thr Gly Val
    1           5           10           15
20   Gln Val Thr Pro Gln
           20
25

```

<210> 9

<211> 16

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Péptido parcial de sheathlin

<400> 9

```

    Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Gly Ala Ser Leu
    1           5           10           15
40

```

<210> 10

<211> 15

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> Péptido parcial de sheathlin.

<400> 10

```

    Asn Lys Ala Gln Gln Pro Gln Ile Lys Arg Asp Ala Trp Arg Phe
    1           5           10           15
55

```

<210> 11

60 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

65 <220>

<223> Péptido parcial de sheathlin.

ES 2 347 245 T3

<400> 15

```

    Asn Lys Ala Gln Glu Pro Glu Met Met His Asp Ala Trp His Phe
    1           5           10           15
  
```

5

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin.

15

<400> 16

```

    Asn Lys Ala Gln Gln Pro Gln Ile Lys His Asp Ala Trp His Phe
    1           5           10           15
  
```

20

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin.

30

<400> 17

```

    Asn Lys Val His Gln Pro Gln Val His Asn Ala Trp Arg Phe
    1           5           10
  
```

35

<210> 18

<211> 12

40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin.

45

<400> 18

```

    Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly
    1           5           10
  
```

50

<210> 19

<211> 8

55

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin.

60

<400> 19

```

    Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser
    1           5
  
```

65

ES 2 347 245 T3

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin

10

<400> 24

15 Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Glu Thr
 20

<210> 25

20 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido parcial de sheathlin

30

<400> 25

 Phe Ala Val Pro Phe Phe Pro Gln Gln Ser Gly Thr Pro Gly Met Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu
 20

40

45

50

55

60

65