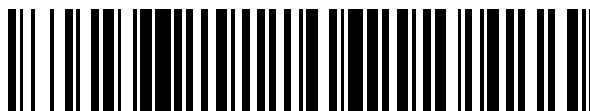


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 466**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61K 31/728** (2006.01)  
**A61K 38/40** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61L 31/16** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2010 E 10700405 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2387390**

54 Título: **Composiciones que contienen ácido hialurónico para el tratamiento de heridas, cicatrices y la formación de adherencias postquirúrgicas**

30 Prioridad:

**13.01.2009 SE 0900031**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.04.2013**

73 Titular/es:

**PERGAMUM AB (100.0%)  
Banvaktsvägen 12  
171 48 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**MAHLAPUU, MARGIT;  
MÜNNICH, MATTIAS y  
SJÖSTRAND, VERONIKA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 400 466 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

Composiciones que contienen ácido hialurónico para el tratamiento de heridas, cicatrices y la formación de adherencias postquirúrgicas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que aumentan el efecto terapéutico de los péptidos biológicamente activos, especialmente de los péptidos derivados de la lactoferrina humana. Las composiciones son útiles para el tratamiento y/o la prevención de heridas, cicatrices y adherencias postquirúrgicas.

10

Antecedentes

Las adherencias peritoneales son conexiones de tejido fibroso entre las estructuras abdominales después de un traumatismo quirúrgico u otro tipo de lesiones. La cirugía abdominal general, vascular, ginecológica, urológica y ortopédica puede derivar en la formación de adherencias hasta en un 95% de los pacientes (Ellis et al., 1999. Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. *Lancet* 353, 1476-1480). Las adherencias postquirúrgicas se consideran la principal causa de obstrucción intestinal (Menzies et al., 2001. Small bowel obstruction due to postoperative adhesions: treatment patterns and associated costs in 110 hospital admissions. *Ann R Coll Surg Engl* 83, 40-46.), una etiología bien conocida de infertilidad secundaria en mujeres (Marana et al., 1995. Correlation between the American Fertility Society classifications of adnexal adhesions and distal tubal occlusion, salpingoscopy, and reproductive outcome in tubal surgery. *Fertil Steril* 64, 924-929) así como una posible causa del dolor posoperatorio (Paajanen et al., 2005. Laparoscopy in chronic abdominal pain: a prospective nonrandomized long-term follow-up study. *J Clin Gastroenterol* 39, 110-114). Más del 30% de los individuos sometidos a cirugía abdominal inferior vuelven a ser ingresados por trastornos directa o posiblemente relacionados con la formación de adherencias en algún período de su vida (Lower et al. 2000. The impact of adhesions on hospital readmissions over ten years after 8849 open gynaecological operations: an assessment from the Surgical and Clinical Adhesions Research Study. *Biog* 107, 855-862).

15

20

25

30

35

40

Durante muchas décadas, se ha intentado disminuir las adherencias postquirúrgicas reduciendo el traumatismo quirúrgico (evitando la desecación, manipulando suavemente el tejido y con una hemostasia meticulosa) y la contaminación de la cavidad abdominal con materiales extraños (usando guantes sin almidón, gasa sin pelusa y suturas absorbibles) (Holmdahl et al., 1997. Adhesions: pathogenesis and prevention-panel discussion and summary. *Eur J Surg Suppl*, 56-62). Cabe destacar que las técnicas laparoscópicas no son suficientes para superar el problema de la formación de adherencias posoperatorias (Duron et al. 2000. Prevalence and mechanisms of small intestinal obstruction following laparoscopic abdominal surgery: a retrospective multicenter study. *French Association for Surgical Research. Arch Surg* 135, 208-212). Por consiguiente, las adherencias intraperitoneales siguen siendo un grave problema clínico y actualmente se cree que una técnica quirúrgica superior solo puede incidir marginalmente en futuras mejoras. Por el contrario, el objetivo es desarrollar productos exclusivos para la prevención de la formación de adherencias, que sean administrados en conjunción con la intervención quirúrgica.

45

50

55

60

65

La mayoría de las estrategias terapéuticas probadas en la prevención de adherencias son dispositivos médicos. Se han evaluado diferentes tipos de barreras físicas, donde las películas biodegradables aplicadas durante la intervención se utilizan para mantener las superficies abdominales lesionadas separadas durante el período crítico de la cicatrización peritoneal. Las dos barreras para reducir la formación de adherencias más utilizadas son Interceed (Johnson & Johnson Medical Inc., Arlington, TX) y Seprafilm™ (Genzyme, Cambridge, MA, EE. UU.). Seprafilm™, compuesta de la sal de sodio del ácido hialurónico y carboximetilcelulosa (CMC) forma un gel viscoso aproximadamente 24-48 h después de la colocación, que es lentamente reabsorbido en el plazo de 1 semana (Diamond, 1996. Reduction of adhesions after uterine myomectomy by Seprafilm membrane (HALF): a blinded, prospective, randomized, multicenter clinical study. *Seprafilm Adhesion Study Group. Fertil Steril* 66, 904-910; Beck, 1997. The role of Seprafilm bioresorbable membrane in adhesion prevention. *Eur J Surg Suppl*, 49-55). Se ha demostrado que Seprafilm™ disminuye las adherencias postquirúrgicas en situación clínica (Vrijland et al. 2002. Fewer intraperitoneal adhesions with use of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose membrane: a randomized clinical trial. *Ann Surg* 235, 193-199.; Beck et al. 2003. A prospective, randomized, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm adhesion barrier in abdominopelvic surgery of the intestine. *Dis Colon Rectum* 46, 1310-1319; Tang et al. 2003. Bioresorbable adhesion barrier facilitates early closure of the defunctioning ileostomy after rectal excision: a prospective, randomized trial. *Dis Colon Rectum* 46, 1200-1207), sin embargo, el dispositivo es difícil de aplicar, ya que se adhiere a los guantes y los órganos y es frágil (DeChemey & diZerega, 1997. Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. *Surg Clin North Am* 77, 671-688). Además, Seprafilm™ aumenta el riesgo de secuelas asociadas con pérdida anastomótica y no es compatible con procedimientos laparoscópicos (diZerega et al. 2002. A randomized, controlled pilot study of the safety and efficacy of 4% icodextrin solution in the reduction of adhesions following laparoscopic gynaecological surgery. *Hum Reprod* 17, 1031-1038). Interceed, compuesto de celulosa oxidada regenerada, se transforma en una masa gelatinosa que cubre el peritoneo lesionado y ha demostrado eficacia en la prevención de adherencias en varios estudios clínicos (Mais et al. 1995. Prevention of de-novo adhesion formation after laparoscopic myomectomy: a randomized trial to evaluate the effectiveness of an oxidized regenerated cellulose

absorbable barrier Hum Reprod. 10, 3133-3135; Mais et al. 1995 Reduction of adhesion reformation after laparoscopic endometriosis surgery: a randomized trial with an oxidized regenerated cellulose absorbable barrier Obstet Gynecol. 86, 512-515; Wallwiener et al. 1998. Adhesion formation of the parietal and visceral peritoneum: an explanation for the controversy on the use of autologous and alloplastic barriers? Fertil Steril 69, 132-137). Sin embargo, la aplicación de Interceed requiere una hemostasia completa puesto que incluso pequeñas cantidades de sangrado intraperitoneal anulan cualquier efecto beneficioso de esta barrera (DeCherney & diZerega, 1997. *supra*). Una limitación general del uso de las barreras físicas es la especificidad del producto por el sitio, que requiere que el cirujano pronostique dónde ocurrirán las adherencias y dónde causarían de forma más probable problemas clínicos. Como alternativa a las barreras, se han administrado diferentes líquidos para instilación intraabdominal como icodextrina (Adept, Baxter Healthcare Corporation, IL, EE. UU.) o solución de Ringer lactato después de la cirugía, en volúmenes suficientes para permitir la flotación de las estructuras abdominales y así evitar que las superficies lesionadas entren en contacto entre sí (Yaacobi et al. 1991. Effect of Ringer's lactate irrigation on the formation of postoperative abdominal adhesions. J Invest Surg 4, 31-36; Cavallari et al. 2000. Inability of University of Wisconsin solution to reduce postoperative peritoneal adhesions in rats. Eur J Surg 166, 650-653.; diZerega et al. *supra*). Sin embargo, la gravedad causa problemas al evitar la distribución uniforme del líquido en el abdomen. Además, las soluciones son absorbidas más rápidamente de la cavidad abdominal que el tiempo necesario para la cicatrización peritoneal.

Se probó un número limitado de compuestos farmacológicamente activos para prevenir la formación de adherencias postquirúrgicas. Como algunos ejemplos, el componente inflamatorio y la proliferación de fibroblastos de la cascada de cicatrización han sido objetivos de la farmacoterapia mediante el uso de esteroides y fármacos citotóxicos, respectivamente. Sin embargo, esos fármacos mostraron una eficacia ambigua y presentaron efectos secundarios potencialmente graves (LeGrand et al. 1995. Comparative efficacy of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and anti-thromboxane agents in a rabbit adhesion-prevention model. J Invest Surg 8, 187-194; Li et al. 2004. Synthesis and biological evaluation of a cross-linked hyaluronan-mitomycin C hydrogel. Biomacromolecules 5, 895-902).

Debido a la limitada eficacia y la difícil manipulación de las terapias probadas, en la gran mayoría de las intervenciones quirúrgicas que se realizan hoy en día en la cavidad abdominal, no se aplica ningún producto para evitar la formación de adherencias y las adherencias posoperatorias continúan causando sufrimiento a los pacientes y presentando el principal costo a la sociedad (Ray et al. 1998. Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994. J Am Coll Surg 186, 1-9.; 2005).

WO2006047744, WO2005024002, WO0000214, US2002132790 dan a conocer geles que contienen péptidos o ácido hialurónico y otras preparaciones para administración tópica.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un medio que tenga la capacidad de prevenir la formación de adherencias posoperatorias sin que provoque los efectos secundarios indeseados de las composiciones farmacéuticas, los dispositivos y los procedimientos disponibles en la actualidad.

#### Descripción de la invención

Los inventores de la presente describen el nuevo método para prevenir la formación de adherencias intraabdominales utilizando péptidos biológicamente activos derivados de la lactoferrina humana formulados en una composición farmacéutica que aumenta el efecto terapéutico de los péptidos. Los péptidos biológicamente activos presentan un efecto inhibitorio de las características más importantes de la formación de cicatrices: reducen el riesgo de infecciones, impiden la inflamación y promueven la fibrinólisis. Los péptidos se formulan junto con el polímero hidrófilo de origen natural ácido hialurónico, que proporciona propiedades de liberación lenta del fármaco y contribuye a los resultados finales mediante el efecto de barrera física. Utilizando un modelo de abrasión cecal y defecto de la pared abdominal en ratas, generalmente aceptado como un predictor no clínico adecuado de la eficacia clínica de fármacos contra adherencias, se muestra que los péptidos biológicamente activos derivados de la lactoferrina humana formulados en ácido hialurónico disminuyen significativamente las adherencias intraabdominales postquirúrgicas. El efecto mejorado de los péptidos cuando se los formula en ácido hialurónico es inesperado y significativamente sinérgico en comparación con el efecto de los péptidos y el efecto del ácido hialurónico administrados independientemente.

En consecuencia, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que aumentan el efecto terapéutico de los péptidos biológicamente activos, especialmente de los péptidos derivados de la lactoferrina humana, según se define en la reivindicación 1.

Un aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para usar en el tratamiento y/o la prevención de heridas, cicatrices y adherencias postquirúrgicas que comprende i) uno o más péptidos biológicamente activos derivados de la lactoferrina humana y ii) un ácido hialurónico de alto peso molecular, según se define en las reivindicaciones 8 y 9.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de i) uno o más péptidos biológicamente activos derivados de la lactoferrina humana, y ii) un ácido hialurónico de alto peso molecular para la elaboración de una composición

farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de heridas, cicatrices y adherencias postquirúrgicas, según se define en la reivindicación 1.

5 Aún otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de la composición para la elaboración de un medicamento para el tratamiento, la profilaxis y/o la prevención de heridas, cicatrices y adherencias postquirúrgicas que comprende la administración de una composición farmacéutica que contiene i) uno o más péptidos biológicamente activos derivados de la lactoferrina humana, y ii) un ácido hialurónico de alto peso molecular, a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

10 Mediante "un péptido biológicamente activo derivado de la lactoferrina humana" se quiere dar a entender un péptido biológicamente activo que contiene al menos un motivo secuencial que en parte o en su totalidad deriva de la secuencia de la lactoferrina humana, donde este motivo secuencial puede contener una o más sustituciones de aminoácidos.

15 Mediante péptidos "biológicamente activos" se quiere dar a entender péptidos que tienen una o más actividades, como actividad antiinflamatoria, actividad inmunomoduladora, actividad fibrinolítica, actividad antiangiogénica y actividad antimicrobiana como una actividad antibacteriana, actividad antiviral o actividad antifúngica.

20 Los péptidos biológicamente activos adecuados para ser utilizados según la presente invención se describen por ejemplo en PCT/EP2008/064062, PCT/EP2008/065186, WO 00/01730, la correspondiente EP 1095061 y US 7253143, que por la presente se incorporan por referencia.

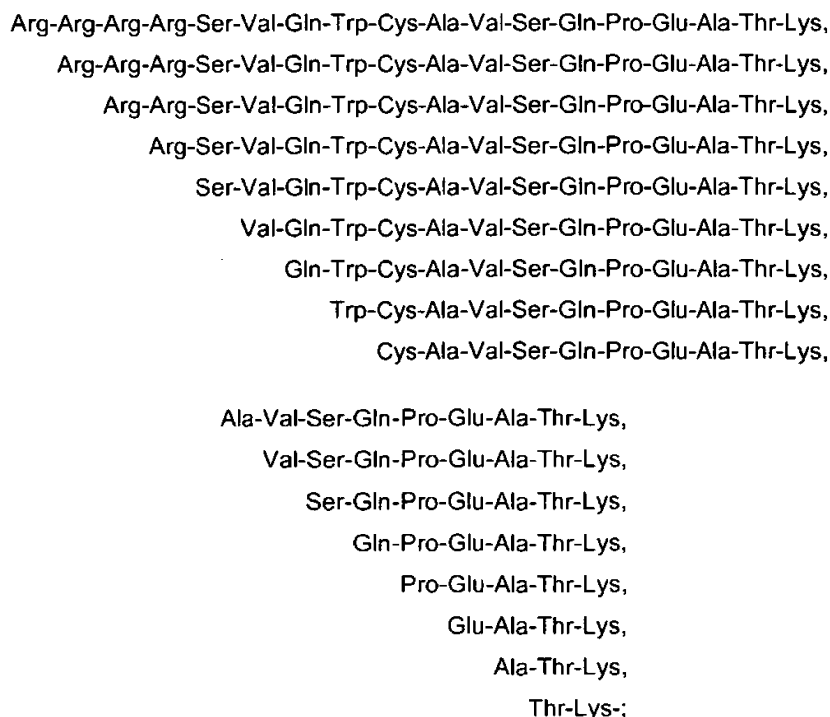
25 El péptido biológicamente activo se puede seleccionar entre los péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos Phe-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 1)

donde el aminoácido X1 es Gln o Ala, el aminoácido X2 es Trp o Leu, el aminoácido X3 es Gln, Ala, Orn, Nle o Lys, el aminoácido X4 es Arg, Ala o Lys, el aminoácido X5 es Asn, Ala, Om o Nle, el aminoácido X6 es Met, Ala o Leu, el aminoácido X7 es Arg, Ala o Lys.

30 Preferentemente el péptido biológicamente activo se puede seleccionar entre los péptidos de acuerdo con la fórmula (I) y los péptidos de acuerdo con la fórmula (II)



35 donde R1 o no es un aminoácido, o es Lys o una secuencia peptídica seleccionada entre Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys (SEC. ID N°: 2) y sus fragmentos truncados en el extremo N-terminal que incluyen



65 y donde R2 o no es un aminoácido, o es Gly o una secuencia peptídica seleccionada entre Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEC. ID N°: 3)

y sus fragmentos truncados en el extremo C-terminal que incluyen

Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys,  
 Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile,  
 Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys,  
 Gly-Pro-Pro-Val-Ser,  
 Gly-Pro-Pro-Val,  
 Gly-Pro-Pro, y  
 Gly-Pro.

10 R1-Phe-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-Lys-Val-Arg-X8-R2

|  $\alpha$   
 R3 Fórmula (II)

15 donde el aminoácido X8 es Gly, Lys, Glu o Asp;  
 cuando X8 es Gly entonces R3 es Ser-(Arg)<sub>n</sub>-X9 y el enlace  $\alpha$  es un enlace peptídico entre el grupo carboxilo de Gly y el grupo amino de Ser;  
 cuando X8 es Lys entonces R3 es X9-(Arg)<sub>n</sub>-Ser y el enlace  $\alpha$  es un enlace amida entre el grupo  $\epsilon$ -amino de Lys y el grupo carboxilo de Ser; y  
 cuando X8 es Glu o Asp entonces R3 es Ser-(Arg)<sub>n</sub>-X9 y el enlace  $\alpha$  es un enlace amida entre el grupo  $\gamma$ -carboxilo de Glu o el grupo  $\beta$ -carboxilo de Asp y el grupo amino de Ser;  
 20 X9 o no es un aminoácido o es Gly;  
 y n es un número entero entre 1 y 10, preferentemente un número entero entre 2 y 6, preferentemente un entero entre 4 y 6 o aún más preferentemente un número entero entre 3 y 4;  
 y donde R1 no es un aminoácido, es Cys o una secuencia peptídica seleccionada entre  
 25 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys (SEC. ID N°: 48)  
 y sus fragmentos truncados en el extremo N-terminal que incluyen

Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 30 Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 35 Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 40 Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 45 Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 50 Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,  
 Ala-Thr-Lys-Cys,  
 55 Thr-Lys-Cys,  
 y  
 Lys-Cys,

60 y donde R2 o no es un aminoácido, o es Pro o una secuencia peptídica seleccionada entre  
 Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEC. ID N°: 49)  
 y sus fragmentos truncados en el extremo C-terminal que incluyen  
 Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys,  
 Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile,  
 Pro-Pro-Val-Ser-Cys,  
 65 Pro-Pro-Val-Ser,  
 Pro-Pro-Val, y

Pro-Pro;

Aún más preferentemente el péptido biológicamente activo se puede seleccionar entre los péptidos

- 5 Ac-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg-NH<sub>2</sub>  
(SEC. ID N°: 4)
- Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEC. ID N°: 5)
- 10 Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 6)  
Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°:7)  
Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 8)  
Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 9)  
Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 10)
- 15 Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 11)  
Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 12)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 13)  
Cys-Phe-Ala-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 14)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Ala-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 15)
- 20 Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Ala-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 16)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 17)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Ala-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 18)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Ala-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 19)  
Cys-Phe-Gln-Leu-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 20)
- 25 Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Lys-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 21)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Leu-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 22)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Arg-Val-Arg (SEC. ID N°: 23)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Orn-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 24)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Nle-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 25)
- 30 Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Orn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 26)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Nle-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 27)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 28)  
Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 29)  
Cys-Phe-Ala-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 30)
- 35 Cys-Phe-Ala-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 31)  
Cys-Phe-Gln-Leu-Gln-Lys-Asn-Met-Lys-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 32)  
Cys-Phe-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Met-Lys-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 33)
- 40 Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-  
Cys-Ile-Lys-Arg (SEC. ID N°: 34)
- Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-  
Cys-Ile-Lys-Arg (SEC. ID N°: 35)
- 45 Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-  
Lys-Arg (SEC. ID N°: 36)
- Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-  
Arg (SEC. ID N° 37 )
- 50 Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-  
Cys-Ile-Lys (SEC. ID N°: 38)
- Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-  
Cys-Ile (SEC. ID N°: 39)
- Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-  
Cys (SEC. ID N° 40)
- 60 Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-  
Cys-Ile-Lys-Arg (SEC. ID N°: 41)
- Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-  
Ile-Lys-Arg (SEC. ID N°: 42)

Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-  
Lys-Arg (SEC. ID N°: 43)

5 Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-  
Arg (SEC. ID N°: 44)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-  
Cys-Ile-Lys (SEC. ID N°: 45)

10 Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-  
Cys-Ile (SEC. ID N°: 46)

15 Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-  
Cys (SEC. ID N°: 47), y

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

20 |  
Gly-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

25 |  
Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

30 |  
Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

35 |  
Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

40 |  
Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

45 |  
Ac-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>

50 |  
Ac-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH<sub>2</sub>

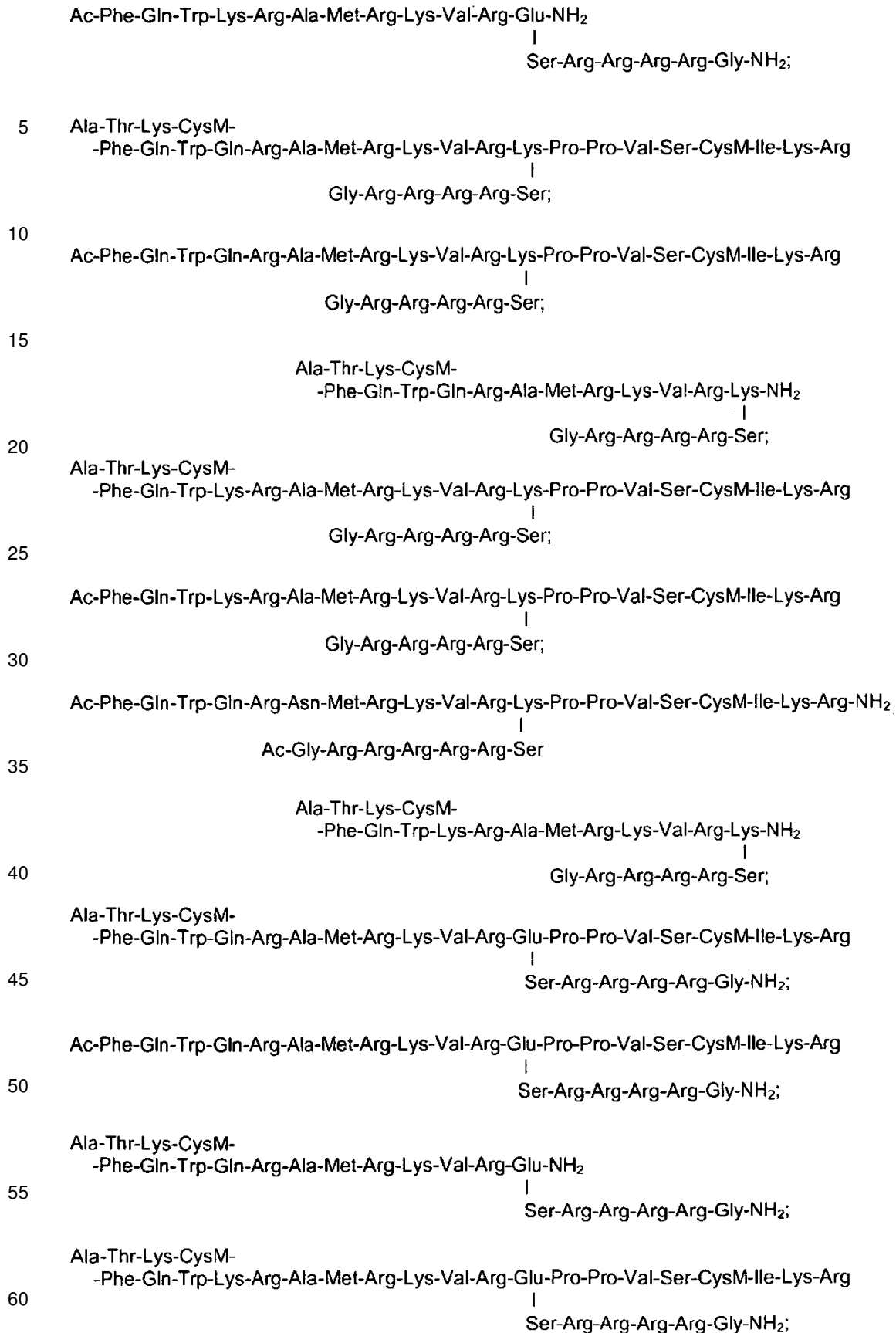
55 |  
Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH<sub>2</sub>

60 |  
Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH<sub>2</sub>

65 |  
Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>;





5 Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg  
 |  
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>;

10 Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH<sub>2</sub>  
 |  
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>

Ala-Thr-Lys-CysM-  
 -Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH<sub>2</sub>  
 |  
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>;

15 Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>;  
 (SEC. ID N°: 50)

20 Ala-Thr-Lys-CysM-  
 -Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>;  
 (SEC. ID N°: 51)

25 Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>; (SEC. ID N°: 52)

30 Ala-Thr-Lys-CysM-  
 -Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>;  
 (SEC. ID N°: 53)

35 Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>; (SEC. ID N°: 54)

Ala-Thr-Lys-CysM-  
 -Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>;  
 (SEC. ID N°: 55)

40 El péptido biológicamente activo más preferido se selecciona entre los péptidos

Ac-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg-NH<sub>2</sub> (SEC. ID N°: 4)

45 y  
 Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>; (SEC. ID N°: 50)

Los péptidos que contienen dos residuos de cisteína pueden estar en forma de una estructura peptídica cíclica en la que las dos cisteínas forman un puente de cisteína.

50 Por consiguiente, un péptido biológicamente activo preferido es el péptido

Ac-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg  
 | | |  
 H<sub>2</sub>N-Arg-Lys-Ile-Cys-Ser-Val-Pro-Pro-Gly-Arg-Val-Lys (SEC. ID N°: 56)

60 Cuando el aminoácido Cys está presente, puede ser ventajoso reemplazarlo por una acetamidometil-cisteína (denominada CysM) para evitar que el péptido forme un puente disulfuro con otro péptido que contenga una cisteína.

Según un aspecto preferido de la invención el extremo carboxilo terminal del péptido ha sido protegido (capped), es decir, el COOH libre en el extremo carboxilo terminal se ha transformado, por ejemplo por amidación, en CONH<sub>2</sub>. (indicado como -NH<sub>2</sub>).

Según otro aspecto preferido de la invención el extremo amino terminal del péptido ha sido protegido, es decir, el grupo NH<sub>2</sub> libre en el extremo amino terminal ha sido transformado, por ejemplo por acetilación para dar la amida CH<sub>3</sub>CONH- (indicado como Ac-).

5 Según otro aspecto preferido de la invención ambos extremos carboxilo-terminal y amino-terminal han sido protegidos.

10 En el caso en que un péptido de acuerdo con la invención se describa como protegido en el extremo carboxilo terminal y/o en el extremo amino terminal, también es posible según la invención utilizar el péptido desprotegido correspondiente.

15 En el caso en que un péptido de acuerdo con la invención se describa como desprotegido en el extremo carboxilo terminal y/o en el extremo amino terminal, también es posible según la invención utilizar el péptido protegido correspondiente.

20 La ventaja de las versiones protegidas es que los aminoácidos N- y C-terminales de estos péptidos son neutros y no tienen carga y por lo tanto tienen las propiedades electrostáticas modificadas. Suponiendo que los receptores se unen a las secuencias correspondientes de la lactoferrina humana donde no hay cargas N- ni C-terminales, los péptidos protegidos deberían unirse mejor ya que en este sentido se asemejan a la proteína nativa más que los péptidos desprotegidos.

Preferentemente el péptido biológicamente activo está presente en la composición farmacéutica en una concentración entre 0.1 mg/ml y 100 mg/ml, más preferentemente entre 0.5 mg/ml y 25 mg/ml.

25 El péptido biológicamente activo puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente el ácido hialurónico de alto peso molecular tiene un peso molecular superior a 300 000 Da, más preferentemente superior a 800 000 Da.

30 Preferentemente, el ácido hialurónico de alto peso molecular está presente en la composición farmacéutica en una concentración entre 0.1 y 10% (p/p), más preferentemente entre 0.5 y 2.5% (p/p).

El ácido hialurónico de alto peso molecular puede estar presente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

35 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden utilizar para prevenir la formación de cicatrices postquirúrgicas, adherencias y queloides vinculada a procedimientos quirúrgicos en diversos tejidos como piel, músculos, tendones, tejido nervioso, vasos sanguíneos, y en diferentes lugares del organismo como ojos, oídos, cuerdas vocales, mano, médula espinal, cavidad intraabdominal, cavidad intratorácica, cavidad intracraneal, cavidad bucal, procedimientos ginecológicos, endometriosis y fimosis.

40 Los inventores de la presente descubrieron inesperadamente que el efecto biológico de los péptidos derivados de la lactoferrina humana se puede aumentar significativamente si los péptidos se administran en una composición farmacéutica que contenga el péptido junto con un ácido hialurónico de alto peso molecular.

45 Este aumento no se puede explicar solo por un posible efecto del ácido hialurónico como tal, sino que es debido a un inesperado efecto sinérgico.

Descripción de las figuras

50 Figura 1. Comportamientos de los geles de hialuronato de sodio cargados con PXL01 a 37 °C.

55 Comportamientos de los geles de hialuronato de sodio cargados con PXL01 a 37 °C. La concentración de PXL01 es de 6 mg/ml en solución de hialuronato de sodio al 1.5%. El fármaco liberado acumulado se expresó como el % de fármaco liberado en el tiempo t. Los datos se muestran como la media ± SDV de tres preparados independientes del producto con la línea de tendencia promedio móvil sumada.

Figura 2. PXL01 previene la formación de adherencias en el modelo de cirugía abdominal de ratas.

60 (A) La incidencia de la formación de adherencias entre los sitios de lesión de la pared abdominal y el ciego, presentada como un porcentaje de los animales que desarrollan adherencias de pared a pared que conectan esas lesiones, en cada grupo. (B) La escala de puntuación acumulada que muestra el número total de adherencias encontradas en la cavidad abdominal presentado como la media ± SEM. (C) Las puntuaciones de adherencias según la escala de Nair presentadas como la media ± SEM (criterios de puntuación mencionados en los ejemplos). (D) Porcentaje de animales sin ninguna formación de adherencias en la cavidad abdominal, en cada grupo. (E) Cambio de peso durante los 6 días de supervivencia después de la cirugía, presentado como porcentaje del peso inicial. n (control) = 20, n (1 administración de 0.5 ml PXL01 (6 mg/ml) en dH<sub>2</sub>O) = 10, n (3 administraciones de 0.5

5 ml de PXL01 (2 mg/ml) en dH<sub>2</sub>O vinculadas a la operación y 24 y 48 h post-cirugía = 18, n (1 administración de hialuronato de sodio al 1.5%) = 20, n (1 administración de 1 ml de PXL01 (1.5 mg/ml) en hialuronato de sodio al 1.5%) = 10, n (1 administración de 1.5 ml de PXL01 (6 mg/ml) en hialuronato de sodio al 1.5%) = 10). La significación estadística se estimó mediante la prueba exacta de Fisher (A, D) o la prueba no paramétrica de Mann Whitney (B, C). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01 indican la diferencia estadística en comparación con el grupo quirúrgico de control de los animales. Adm, administración; HS, hialuronato de sodio, dH<sub>2</sub>O, agua destilada.

## Ejemplos

10 Parte experimental

Péptido

En los experimentos se utilizó el péptido PXL01 (SEC. ID N°: 56).

15 Preparación de PXL01 en hidrogeles de hialuronato de sodio

20 Se agregó PXL01 disuelto en solución de cloruro de sodio a una solución de hialuronato de sodio al 2.5% en una relación en volumen de 2/5 de solución de PXL01 y 3/5 de solución de hialuronato de sodio, para obtener 1.5 o 6 mg/ml de PXL01 en hialuronato de sodio al 1.5%. Las soluciones se homogeneizaron extrayendo las mezclas varias veces a través de agujas de 2.1 mm de diámetro.

Caracterización del producto formulado

25 La concentración de PXL01 y la homogeneidad en el hialuronato de sodio se determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento con detector ultravioleta (Agilent modelo 1100) a 220 nm. La columna analítica utilizada fue una Vydac 218TP (C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm). Las fases móviles utilizadas (0.1% de TFA en agua con 1% de acetonitrilo (solvente A) y 0.1% de TFA en acetonitrilo (solvente B)) se corrieron en un gradiente con una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. Se aplicaron patrones de PXL01 diluidos para crear curvas de calibración.

30 Las muestras se prepararon agregando a las soluciones de muestra solución de hialuronidasa (hialuronidasa de *Streptomyces hyalurolyticus*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con una actividad enzimática de 500 unidades/ml. Las mezclas se agitaron durante 2 h a temperatura ambiente y las muestras se diluyeron según fue necesario con TFA en agua, seguido de mezclado adicional. Las muestras se centrifugaron a 7000 rpm durante 5 minutos antes de inyectarlas en la columna.

35

Configuración del sistema de liberación *in vitro*

40 0.25 ml del producto formulado se colocó en el pocillo de la placa de cultivo tisular (placa de cultivo tisular de 24 pocillos de fondo plano, Techno Plastics Products AG), con lo que se obtuvo una película delgada de aproximadamente 1.3 mm. Las placas se colocaron en el termostato (37 °C) durante 1 hora para permitir que el producto alcanzara la temperatura de 37 °C. Se distribuyó cuidadosamente una capa de 0.5 ml del medio de liberación (PBS, pH 7.4) re-equilibrado a 37 °C sobre la superficie del gel y las placas de cultivo tisular se transfirieron a un agitador termostático (60 rpm, 37 °C). A intervalos de tiempo predeterminados, se extrajeron alícuotas de 10 microlitros de la solución acuosa de los medios de liberación. La concentración de PXL01 liberado se controló a la longitud de onda de 230 nm utilizando una medición espectrofotométrica. Debido a que la medición de la absorbancia a 230 nm podría detectar el péptido así como el hialuronato de sodio disuelto en el medio de la liberación, se usó un medio de liberación de control que tiene la misma cantidad de hialuronato de sodio sin nada de PXL01 que la de hialuronato de sodio con el fármaco.

50

Modelos animales para evaluar la prevención de adherencias postquirúrgicas

55 Se mantuvieron ratas Sprague-Dawley hembras (200-250 g, Charles River Laboratories, Sulzfeldt, Alemania) en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad y se atendieron de conformidad con las normas para la protección de los animales de laboratorio. El estudio se realizó después de la aprobación previa del Comité de ética local.

60 Se realizaron una abrasión del ciego y una escisión de la pared abdominal para inducir adherencias de novo como se describió previamente (Harris et al., 1995. Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents. Surgery 117, 663-669). En resumen, se anestesiaron las ratas con isoflurano (Isoba@vet, Shering-Plough Animal Health, Farum, Dinamarca) y se administró buprenorfina (48 mcg/kg, Temgesic, Shering-Plough, Bruselas, Bélgica) como analgésico posoperatorio. Se practicó una incisión de 5 cm de longitud en la línea media del abdomen y se realizó una lesión rectangular (5 x 25 mm) de todo el espesor en la pared peritoneal a través del peritoneo parietal y la fascia muscular. Además, se frotó suavemente una zona de la membrana serosa en ambos lados del ciego, aproximadamente 10 mm x 15 mm, con una gasa de algodón hasta la aparición de hemorragias petequiales. Las ratas se asignaron al azar al grupo de control sin tratar o a los grupos tratados. Se eliminó el exceso de sangre de la lesión y la sustancia de prueba se aplicó sobre las áreas erosionadas

65

utilizando una jeringa. La herida de la laparotomía se cerró con una sutura continua y la piel se unió con clips metálicos (Appose ULC35W, TycoHealthcare Group LP, Norwalk, CT, EE. UU.). Los animales se sacrificaron 6 días después de la cirugía con una sobredosis de pentobarbital sódico (Pentobarbital vet, APL, Estocolmo, Suecia). Se les abrió el abdomen y las adherencias fueron puntuadas por un evaluador a ciegas con respecto al tratamiento. La incidencia de adherencias entre la incisión abdominal y el ciego abrasionado se cuantificó como un porcentaje de los animales que formaron adherencias de pared a pared conectando esas lesiones, en cada grupo. Además, para evaluar integralmente el número total de adherencias formadas en la cavidad abdominal, incluidas las adherencias alejadas del traumatismo quirúrgico, se utilizaron dos esquemas de clasificación diferentes. La escala de puntuación acumulada descrita por Bothin (Bothin et al. 2001. The intestinal flora influences adhesion formation around surgical anastomoses. *Br J Surg* 88, 143-145) asigna al número total de adherencias presentes en la cavidad abdominal: un punto para cada adherencia observada y los puntos se suman para dar la puntuación. La escala de puntuación de adherencias según Nair (Nair et al. 1974. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Arch Surg* 108, 849-85) incorpora tanto el número total de adherencias como la incidencia de adherencias entre órganos diana, aun cuando se da una graduación mayor a la última (0, no hay adherencias; 1, banda única de adherencias entre las vísceras y el órgano diana; 2, dos bandas de adherencias entre las vísceras y el órgano diana; 3, más de dos bandas de adherencias entre las vísceras y el órgano diana, 4, las vísceras directamente adheridas a la pared abdominal, independientemente de la cantidad y la magnitud de las bandas adhesivas). Finalmente, se evaluó el porcentaje de ratas sin ninguna adherencia abdominal en cada grupo. Se registró cualquier posible signo de inflamación peritoneal (eritema y/o edema) o alteración de la cicatrización vinculadas a las autopsias. Como marcador general del bienestar, se compararon los pesos corporales de los animales antes de la cirugía y 6 días después de la misma.

#### Modelo de anastomosis de intestino grueso en ratas

Se mantuvieron ratas Sprague Dawley hembras (200-250 g, Charles River Laboratories, Sulzfeldt, Alemania) en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad y se atendieron de conformidad con las normas para la protección de los animales de laboratorio. El estudio se realizó después de la aprobación previa del Comité de ética local. Se indujo la anestesia con isoflurano (Isoba@vet, Shering-Plough Animal Health, Farum, Dinamarca) y las ratas recibieron buprenorfina (48 mcg/kg; Temgesic, Shering-Plough, Bruselas) por vía intramuscular para el alivio del dolor posoperatorio y Bimotrim (80 mg/kg; Bimeda, Reino Unido) por vía subcutánea antes de la cirugía.

Se afeitó la pared abdominal y se realizó una laparotomía en la línea media de aproximadamente 3 cm. El colon se expuso y se cortó transversalmente a 2 cm del centro del ciego. Se realizó una anastomosis seromuscular de extremo a extremo con 8 suturas interrumpidas usando hilo monocryl 6/0 (Y432H, Ethicon Inc, St-Stevens Woluwe, Bélgica). Se colocó un macarrón en el colon en la anastomosis como stent durante la sutura. Las ratas se dividieron aleatoriamente en grupos que recibieron PXL01 (6 mg/ml) en hialuronato de sodio al 1.5% cubriendo la anastomosis y el peritoneo circundante (n = 8) o ningún tratamiento (n = 8). Se cerró el abdomen con una sutura continua (monocryl 4-0, Y3100H, Ethicon Inc.) en la capa muscular y con grapas en la piel. Se administraron 2 ml de solución salina isotónica por vía subcutánea para evitar la deshidratación.

Los animales recibieron una dosis adicional de buprenorfina (24 mcg/kg; Temgesic, Shering-Plough, Bruselas) por vía subcutánea dos veces al día durante dos días después de la cirugía. Los animales se sacrificaron 7 días después de la cirugía con una sobredosis de pentobarbital sódico (Pentobarbital vet, APL, Estocolmo, Suecia). El abdomen se abrió y se resecoó un segmento intestinal de 4 cm de longitud con la zona de la anastomosis situada en el centro. Se introdujo un tubo conectado a un monitor de presión en un lado del segmento intestinal y el otro lado se ligó en el extremo. El segmento intestinal se colocó inmediatamente en cloruro de sodio isotónico, se infundió solución salina teñida a través del tubo en el segmento intestinal y se controló la presión intraluminal utilizando un polígrafo Grass (Grass Instruments Co, Quincy, Ohio, EE. UU.). La presión máxima antes de la rotura de la anastomosis se registró como la presión de rotura. La aparición de solución salina teñida alrededor de la anastomosis indicó el momento de la rotura. El evaluador estaba a ciegas respecto al tratamiento recibido por cada animal.

#### Resultados

Comportamiento de liberación de PXL01 en hialuronato de sodio

Se mezcló PXL01 disuelto en solución de cloruro de sodio con la solución de hialuronato de sodio resultando un hidrogel homogéneo que contenía PXL01. Los experimentos de liberación *in vitro* revelaron una liberación inicial rápida de PXL01 de la formulación en gel de hialuronato de sodio, liberándose aproximadamente 70% del PXL01 en el transcurso de 1 hora (Fig. 1). El comportamiento de liberación caracterizado por una liberación inicial rápida ya se demostró para otros compuestos solubles formulados en hialuronato de sodio (Sherwood et al. 1992. Controlled antibody delivery systems. *Biotechnology (N Y)* 10, 1446-1449). Esto puede tener un uso funcional al proporcionar una dosis inicial durante la administración del fármaco, minimizando cualquier período de retraso. Significativamente, los perfiles de liberación de PXL01 de los productos formulados preparados en tres ocasiones independientes se superpusieron en gran medida indicando que la preparación de geles de hialuronato de sodio cargados con PXL01 es altamente reproducible (Fig. 1).

## Prevencción de adherencias peritoneales por PXL01

El modelo de abrasión cecal y defecto de la pared abdominal (Arnold et al. *supra*) se utilizó para dilucidar el efecto contra adherencias de PXL01. Este modelo produce adherencias confiables y consistentes entre las dos superficies lesionadas si no se le da ningún tratamiento, y el 85% de las ratas en el grupo de control formó adherencias directas ciego-pared peritoneal (Figura 2A). No se observó ninguna reducción significativa en la formación de adherencias cuando se administraron 3 mg de PXL01 en solución acuosa como una dosis única vinculada a la cirugía (Figuras 2A-D). Sin embargo, los animales tratados con 3 dosis de 1 mg de PXL01 en solución acuosa mostraron una marcada reducción en la formación de adherencias en comparación con el grupo de control de las ratas (Figuras 2A, C). Estos resultados indican que la liberación lenta de PXL01 en la zona quirúrgica es beneficiosa, en comparación con el tratamiento único con la solución acuosa del péptido.

Se escogió el hialuronato de sodio como vehículo para lograr la liberación controlada de PXL01. El PXL01 se presenta como fácilmente soluble y suficientemente estable en hialuronato de sodio, también el hidrogel de hialuronato de sodio que contiene PXL01 es bioadhesivo y fácil de aplicar en la zona quirúrgica usando una jeringa. Cuando se aplicó PXL01 en la formulación de hialuronato de sodio de alto peso molecular al 1.5%, la formación de adherencias abdominales se redujo significativamente, en comparación con el grupo de control. Hubo una reducción de 4 veces según la escala de puntuación acumulada de adherencias (Figura 2B) y más de tres veces de reducción de la puntuación de adherencias según Nair (Figura 2C). 60% de los animales tratados con 6 mg/ml de PXL01 en hialuronato de sodio estuvieron totalmente exentos de adherencias en comparación con el 5% de los animales en el grupo de control y el 20% de los animales en el grupo tratado con hialuronato de sodio (Figura 2D). Mediante varias escalas de puntuación, se demostró que el hialuronato de sodio se reduce la formación de adherencias, presumiblemente debido al efecto de barrera física (Bums et al. 1995. Prevention of tissue injury and postsurgical adhesions by precoating tissues with hyaluronic acid solutions. J Surg Res 59, 644-652).

No se registró ningún efecto adverso relacionado con el tratamiento durante el estudio con respecto a la cicatrización de heridas o la inflamación peritoneal evaluadas durante las autopsias. Además, el peso corporal promedio de las ratas en los grupos de tratamiento aumentó en comparación con sus pesos prequirúrgicos, aunque la diferencia en comparación con el grupo de control no alcanzó significación estadística (Figura 2E). Cabe destacar que el PXL01 en hialuronato de sodio administrado alrededor de la anastomosis intestinal no redujo el potencial cicatrizante según lo estimado por la presión de rotura de la anastomosis medida 7 días después de la cirugía (presión de rotura para el grupo de tratamiento (n = 8) 206.3 ± 14.3 mm de Hg versus 197.4 ± 9.6 mm de Hg en el grupo de tratamiento simulado (n = 8)).

La capacidad de PXL01 para prevenir adherencias fue limitada en solución acuosa (Figuras 2A-D), posiblemente debido a que el péptido se elimina rápidamente del peritoneo. Sin embargo, el péptido fue altamente eficaz formulado en hialuronato de sodio (Figuras 2A-D), causando una reducción significativa de las adherencias según diferentes escalas de clasificación que abarcan tanto las adherencias formadas entre las dos superficies lesionadas como en zonas abdominales alejadas del sitio de aplicación. El hialuronato de sodio, un componente natural de la matriz extracelular, es catabolizado localmente o llevado a los ganglios o la circulación general, desde donde es depurado por las células endoteliales del hígado (Fraser et al. 1988. Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue. Biochem J 256, 153-158; Laurent & Fraser 1992. Hyaluronan. Faseb J 6, 2397-2404). Es probable que el hialuronato de sodio aumente el efecto de PXL01 al mantener las concentraciones locales del fármaco durante toda la liberación controlada. Los experimentos *in vitro* indican un período relativamente breve de liberación de PXL01 del hialuronato de sodio (Figura 1), sugiriendo que la duración de la liberación del fármaco necesaria para la prevención de adherencias *in vivo* puede ser bastante limitada. Esto está alineado con la evidencia previa de que los episodios críticos en la formación de adherencias en la cavidad abdominal ocurren en las primeras 36 h (Harris et al. 1995. Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents. Surgery 117, 663-669). Previamente, se demostró que varios sistemas de vehículo a base de micropartículas inducen la formación de adherencias o causan inflamación (Hockel et al. 1987. Prevention of peritoneal adhesions in the rat with sustained intraperitoneal dexamethasone delivered by a novel therapeutic system. Ann Chir Gynaecol 76, 306-313; Kohane et al. 2006. Biodegradable polymeric microspheres and nanospheres for drug delivery in the peritoneum. J Biomed Mater Res A 77, 351-361). No se observaron eventos adversos evidentes como apatía, inflamación peritoneal o inhibición de la cicatrización en los animales tratados con PXL01 a ninguna de las concentraciones. En el momento de sacrificarlos todos los grupos de tratamiento habían mantenido o excedido sus pesos preoperatorios (Figura 2E). Cabe destacar que PXL01 en hialuronato de sodio administrado alrededor de la anastomosis intestinal no interfirió con el potencial de cicatrización de la anastomosis.

En resumen, los inventores de la presente describen una observación inesperada sobre el efecto biológico de los péptidos derivados de la lactoferrina para prevenir la formación de adherencias postquirúrgicas, el cual puede aumentar significativamente si se administran los péptidos en una composición farmacéutica que contenga el péptido junto con un ácido hialurónico de alto peso molecular. El efecto es significativamente sinérgico en comparación con el efecto del péptido y el efecto del ácido hialurónico administrados independientemente. Previamente, se demostró que varios sistemas de vehículo a base de micropartículas inducen la formación de adherencias o causan inflamación (Hockel et al. 1987. *supra*; Kohane et al. 2006. *supra*). Asimismo, se ha

demostrado que las aplicaciones de barreras físicas para prevenir las adherencias provocan efectos adversos tales como pérdidas anastomóticas, debido a la interferencia con el proceso de cicatrización de las heridas (diZerega et al., 2002. *supra*). En el presente estudio, se demostró que el hialuronato de sodio no aumenta la formación de adherencias sino que actúa de forma sinérgica con los péptidos derivados de la lactoferrina en la prevención de adherencias. Significativamente, la administración de los péptidos en hialuronato de sodio no se asoció con ningún problema de seguridad en relación con la cicatrización de la anastomosis y así, el producto demostró el mayor perfil de seguridad en comparación con los agentes contra adherencias descritos previamente. El gel de hialuronato de sodio cargado de péptido es fácil de manejar y administrar, y es compatible con laparotomía o laparoscopia. Administrados juntos, se espera que el producto proporcione un régimen de prevención integral de las adherencias previniendo no solo las adherencias que se forman en los sitios de los procedimientos operatorios, sino también las adherencias *de novo* que se forman en sitios que no participan directamente en la cirugía debido a una herida no intencional en el tejido durante la manipulación quirúrgica, sin causar ningún efecto adverso sobre la cicatrización.

15 Listado de secuencias

15	<110> Pharmasurgics en Sweden AB		
	<120> Nuevas composiciones farmacéuticas		
	<130> PXL01		
	<160> 56		
20	<170> PatentIn versión 3.3		
	<210>		1
	<211>		11
	<212>		PRT
25	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
30	<220>		
	<221> VARIANTE		
	<222>	(2)	.. (2)
	<223> Xaa = Gln o Ala		
35	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222>		(3)..(3)
	<223> Xaa = Trp o Leu		
40	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222>		(4)..(4)
	<223> Xaa = Gln, Ala, Orn, Nle o Lys		
45	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222>	(5)	.. (5)
	<223> Xaa = Arg, Ala o Lys		
50	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222>		(6)..(6)
	<223> Xaa = Asn, Ala, Orn o Nle		
55	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222>	(7)	.. (7)
	<223> Xaa = Met, Ala o Leu		
60	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222>	(8)	.. (8)
	<223> Xaa = Arg, Ala o Lys		
65	<400> 1		

ES 2 400 466 T3

	Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Val Arg		
	1 5 10		
5	<210>		2
	<211>		19
	<212>		PRT
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
	<400>		2
15	Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu		
	1 5 10 15		
20	Ala Thr Lys		
	<210>		3
	<211>		9
	<212>		PRT
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
	<400> 3		
30	Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg		
	1 5		
35	<210>		4
	<211>		25
	<212>		PRT
	<213> Artificial		
	<220>		
40	<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222> (1)..(1)		
45	<223> Acetilación		
	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222>		(25)..(25)
50	<223> Amidación		
	<400> 4		
55	Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg		
	1 5 10 15		
60	Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg		
	20 25		
	<210>		5
	<211>		23
	<212>		PRT
	<213> Artificial		
65	<220>		

ES 2 400 466 T3

<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

<400> 5

5 Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro  
1 5 10 15

Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg  
10 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> PRT  
15 <213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

20 <400> 6

Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met  
1 5 10 15

25 Arg Lys Val Arg  
20

<210> 7  
<211> 16  
<212> PRT  
30 <213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

35 <400> 7

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg  
40 1 5 10 15

<210> 8  
<211> 19  
<212> PRT  
45 <213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

50 <400> 8

Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg  
1 5 10 15

55 Lys Val Arg

<210> 9  
<211> 18  
<212> PRT  
60 <213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

65 <400> 9



ES 2 400 466 T3

	Gln	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys		
	1				5					10					15			
5		Val	Arg															
	<210>																	10
	<211>																	15
	<212>																	PRT
10	<213>	Artificial																
	<220>																	
	<223>	Secuencia derivada de la lactoferrina humana																
15	<400>	10																
			Ala	Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg	
			1				5					10					15	
20	<210>																	11
	<211>																	14
	<212>																	PRT
	<213>	Artificial																
25	<220>																	
	<223>	Secuencia derivada de la lactoferrina humana																
	<400>	11																
30			Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg		
			1				5					10						
	<210>																	12
	<211>																	13
35	<212>																	PRT
	<213>	Artificial																
	<220>																	
	<223>	Secuencia derivada de la lactoferrina humana																
40	<400>	12																
				Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg		
				1				5					10					
45	<210>																	13
	<211>																	12
	<212>																	PRT
	<213>	Artificial																
50	<220>																	
	<223>	Secuencia derivada de la lactoferrina humana																
	<400>	13																
55				Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg			
				1				5					10					
	<210>																	14
	<211>																	12
60	<212>																	PRT
	<213>	Artificial																
	<220>																	
65	<223>	Secuencia derivada de la lactoferrina humana																







ES 2 400 466 T3

```

<220>
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

<400> 28
5
      Cys Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
      1           5           10

<210>
10 <211>
    <212>
    <213> Artificial
                                29
                                12
                                PRT

<220>
15 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

    <400> 29

      Cys Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg
      1           5           10

<210>
20 <211>
    <212>
    <213> Artificial
                                30
                                12
                                PRT

<220>
30 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

    <400> 30

      Cys Phe Ala Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
      1           5           10

<210>
35 <211>
    <212>
    <213> Artificial
                                31
                                12
                                PRT

<220>
40 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

    <400> 31

      Cys Phe Ala Trp Gln Arg Ala Met Arg Lys Val Arg
      1           5           10

<210>
50 <211>
    <212>
    <213> Artificial
                                32
                                12
                                PRT

<220>
55 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

    <400> 32

      Cys Phe Gln Leu Gln Lys Asn Met Lys Lys Val Arg
      1           5           10

<210>
60 <211>
    <212>
    <213> Artificial
                                33
                                12
                                PRT

<220>
65

```

ES 2 400 466 T3

<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana  
 <400> 33

5 Cys Phe Ala Leu Lys Lys Ala Met Lys Lys Val Arg  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 25  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana  
 15 <400> 34

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg  
 1 5 10 15

20 Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg  
 20 25

25 <210> 35  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana  
 <400> 35

35 Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly  
 1 5 10 15

40 Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg  
 20

<210> 36  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 45 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana  
 50 <400> 36

Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro  
 1 5 10 15

55 Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg  
 20

<210> 37  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 65 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

ES 2 400 466 T3

<400> 37

5 Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro  
1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg  
20

10 <210> 38  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

<400> 38

20 Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg  
1 5 10 15

25 Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys  
20

<210> 39  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

35 <400> 39

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg  
1 5 10 15

40 Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile  
20

45 <210> 40  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

<400> 40

55 Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg  
1 5 10 15

Gly Pro Pro Val Ser Cys  
20

60 <210> 41  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Artificial

65 <220>

ES 2 400 466 T3

<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

<400> 41

5                   Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg  
                  1                   5                   10                   15

10                   Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg  
                                  20                   25

<210>

<211>

<212>

42

24

PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

20 <400> 42

Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg Gly  
1                   5                   10                   15

25                   Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg  
                                  20

<210>

<211>

<212>

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

35 <400> 43

Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg Gly Pro  
1                   5                   10                   15

40                   Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg  
                                  20

<210>

<211>

<212>

<213> Artificial

43

23

PRT

50 <220>

<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

<400> 44

55                   Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro  
1                   5                   10                   15

60                   Val Ser Cys Ile Lys Arg  
                                  20

<210>

<211>

<212>

<213> Artificial

44

22

PRT

65 <213> Artificial



ES 2 400 466 T3

<220>  
 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

<400> 45

5  
 Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg  
 1 5 10 15

10  
 Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys  
 20

<210> 46  
 <211> 23  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

20  
 <400> 46

25  
 Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg  
 1 5 10 15

30  
 Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile  
 20

<210> 47  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35  
 <220>  
 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

<400> 47

40  
 Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg  
 1 5 10 15

45  
 Gly Pro Pro Val Ser Cys  
 20

<210> 48  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

55  
 <400> 48

60  
 Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu  
 1 5 10 15

65  
 Ala Thr Lys Cys  
 20

<210> 49  
 <211> 8

ES 2 400 466 T3

	<212>		PRT
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
	<400> 49		
10		Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg 1 5	
	<210>		50
	<211>		18
15	<212>		PRT
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
20			
	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222> (1)..(1)		
	<223> Acetilación		
25			
	<220>		
	<221>		VARIANTE
	<222> (18)..(18)		
	<223> Amidación		
30			
	<400> 50		
		Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Ser Arg Arg Arg 1 5 10 15	
35			
	Arg Gly		
	<210>		51
40	<211>		22
	<212>		PRT
	<213> Artificial		
	<220>		
45	<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
	<220>		
	<221>		Variante
	<222> (4) .. (4)		
	<223> Cys modificada a acetamidometil-Cys		
50			
	<220>		
	<221>		Variante
	<222> (22)..(22)		
	<223> Amidación		
55			
	<400> 51		
		Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly 1 5 10 15	
60			
	Ser Arg Arg Arg Arg Gly 20		
65	<210>		52
	<211>		18

ES 2 400 466 T3

	<212>		PRT
	<213> Artificial		
5	<220> <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
	<220> <221>		VARIANTE
10	<222> (1) .. (1) <223> Acetilación		
	<220> <221>		VARIANTE
15	<222> (18)..(18) <223> Amidación		
	<400> 52		
20	Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Ser Arg Arg Arg 1 5 10 15		
	Arg Gly		
25	<210> <211> <212> <213> Artificial		53 22 PRT
30	<220> <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
	<220> <221>		Variante
35	<222> (4) .. (4) <223> Cys modificada a acetamidometil-Cys		
	<220> <221>		Variante
40	<222> (22)..(22) <223> Acetilación		
	<400> 53		
45	Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly 1 5 10 15		
	Ser Arg Arg Arg Arg Gly 20		
50	<210> <211> <212> <213> Artificial		54 18 PRT
55	<220> <223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana		
	<220> <221>		VARIANTE
60	<222> (1) .. (1) <223> Acetilación		
	<220> <221>		VARIANTE
65	<222> (18) .. (18)		

ES 2 400 466 T3

<223> Amidación

<400> 54

5 Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg Gly Ser Arg Arg Arg  
1 5 10 15

Arg Gly

10 <210> 55  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

20 <220>  
<221> Variante  
<222> (4) .. (4)  
<223> Cys modificada a acetamidometil-Cys

25 <220>  
<221> Variante  
<222> (22)..(22)  
<223> Amidación

<400> 55

30 Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Lys Arg Ala Met Arg Lys Val Arg Gly  
1 5 10 15

35 Ser Arg Arg Arg Arg Gly  
20

40 <210> 56  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia derivada de la lactoferrina humana

45 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (1) .. (1)  
<223> Acetilación

50 <220>  
<221> DISULFURO  
<222> (5)..(22)

55 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (25)..(25)  
<223> Amidación

<400> 56

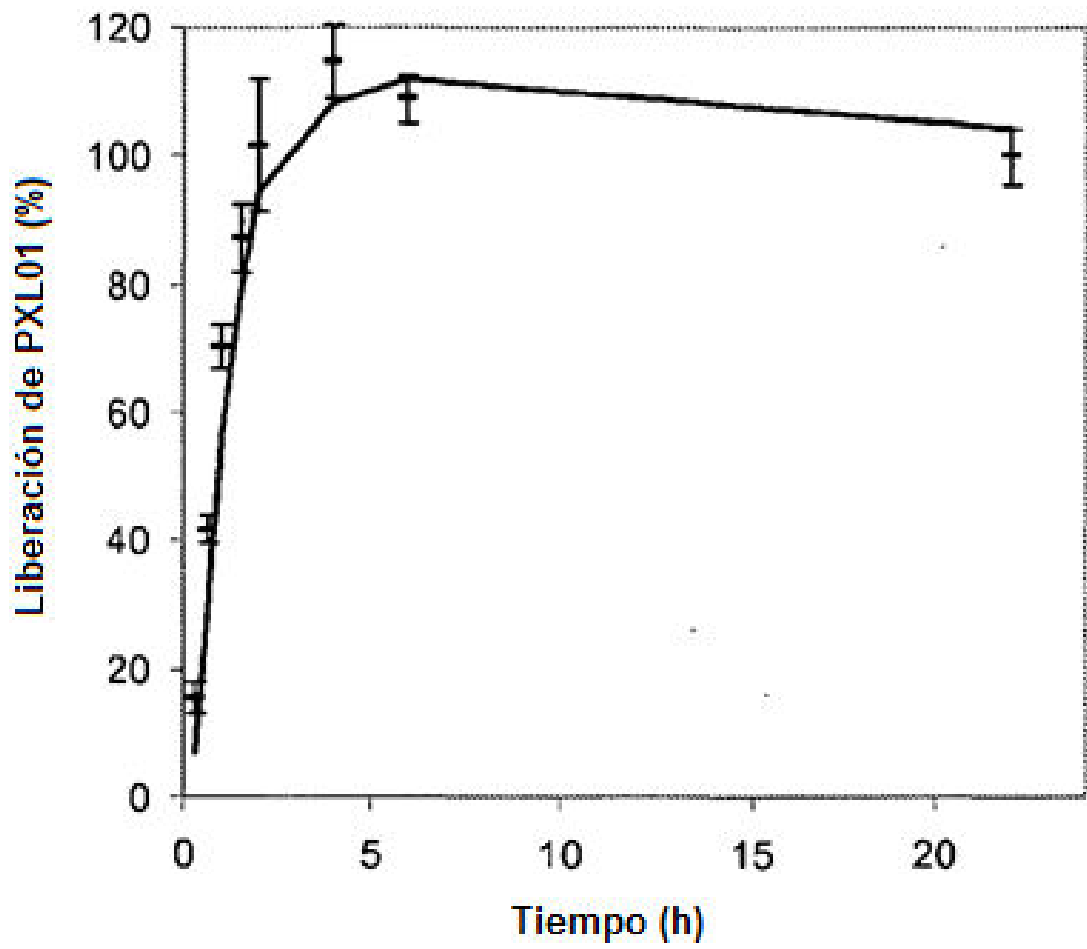
60 Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg  
1 5 10 15

65 Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg  
20 25

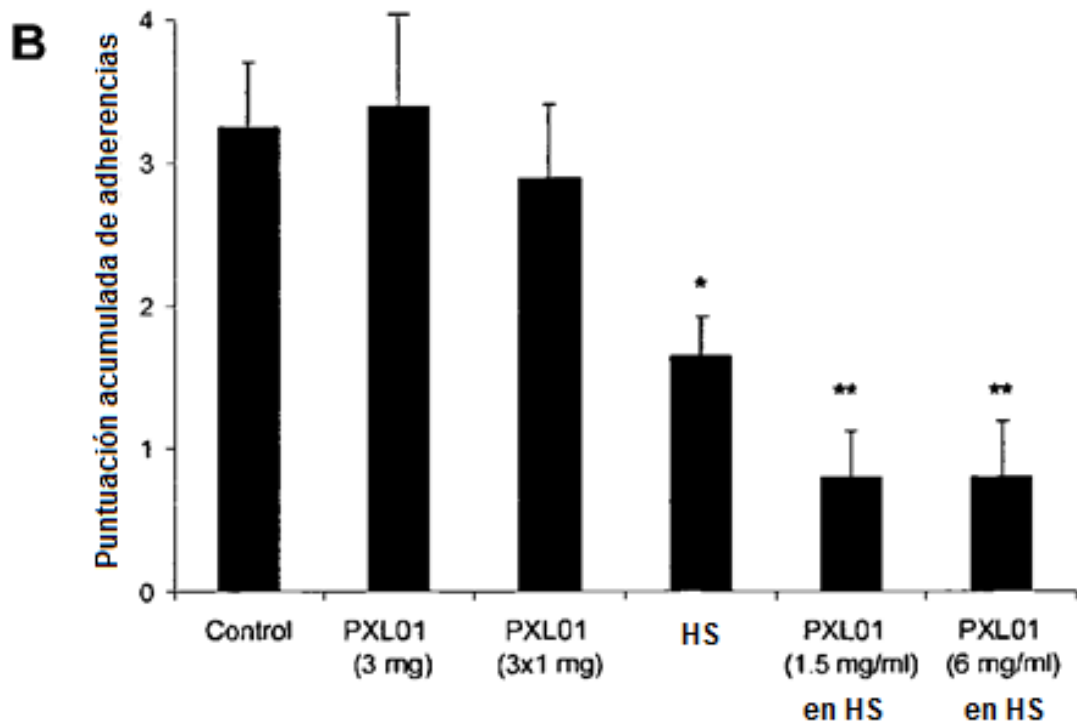
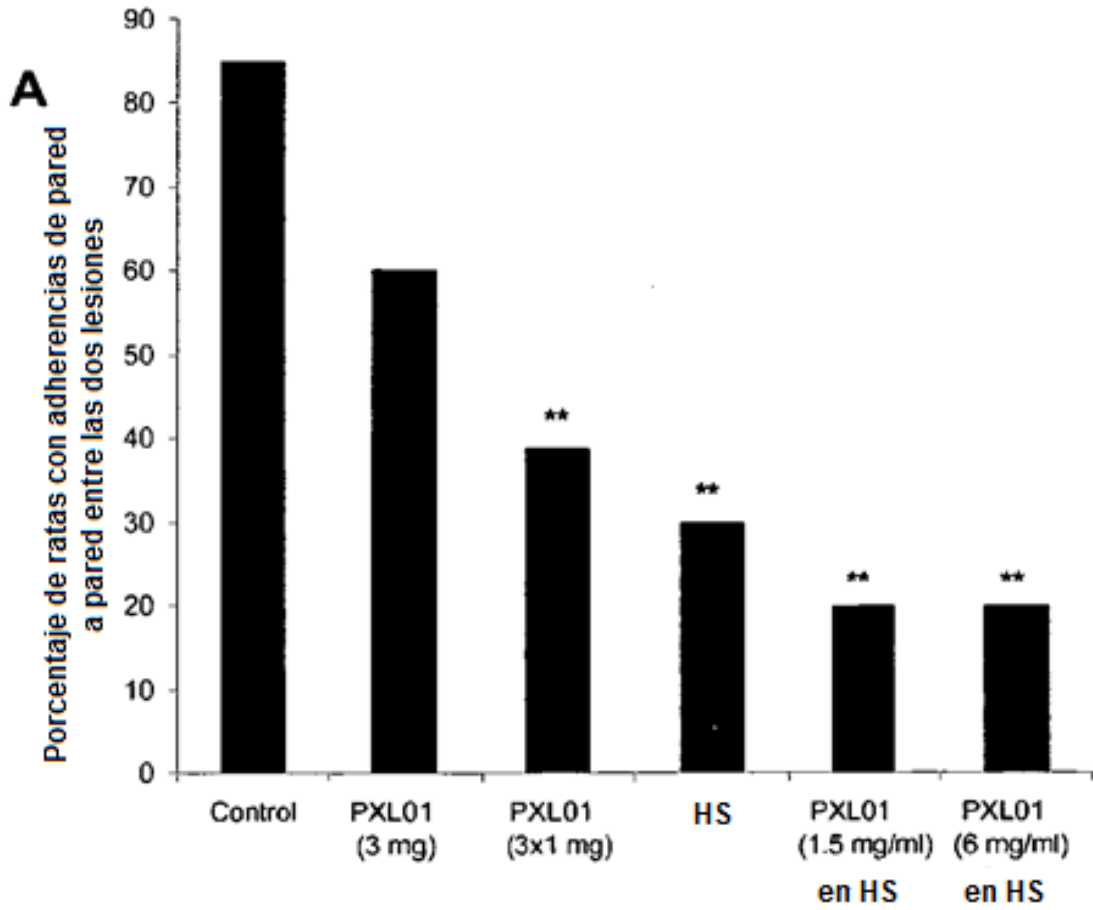
**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que contiene
- 5 i) uno o más péptidos biológicamente activos que contienen la secuencia de aminoácidos Phe-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-Lys-Val-Arg (SEC. ID N°: 1),  
donde el aminoácido X1 es Gln o Ala, el aminoácido X2 es Trp o Leu, el aminoácido X3 es Gln, Ala, Orn, Nle o Lys, el aminoácido X4 es Arg, Ala o Lys, el aminoácido X5 es Asn, Ala, Orn o Nle, el aminoácido X6 es Met, Ala o Leu, el aminoácido X7 es Arg, Ala o Lys, y
- 10 ii) un ácido hialurónico de alto peso molecular o una sal farmacéuticamente aceptable de un ácido hialurónico de alto peso molecular, donde el ácido hialurónico de alto peso molecular tiene un peso molecular promedio superior a 300 000 Da.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual el péptido biológicamente activo es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos SEC. ID N°: 4.
- 15 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el péptido biológicamente activo es un péptido cíclico donde los dos cisteínas forman un puente de cisteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC. ID N°: 56.
- 20 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual el péptido biológicamente activo es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos SEC. ID N°: 50.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la cual el ácido hialurónico de alto peso molecular tiene un peso molecular promedio superior a 800 000 Da.
- 25 6. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la cual el péptido está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 100 mg/ml, muy preferentemente entre 0.5 mg/ml y 25 mg/ml.
- 30 7. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la cual el ácido hialurónico está presente en una concentración entre 0.1 y 10% (p/p), muy preferentemente entre 0.5 y 2.5% (p/p).
8. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para usar en la prevención de la formación de cicatrices postquirúrgicas, adherencias y queloides vinculada a los procedimientos quirúrgicos.
- 35 9. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para elaborar un medicamento para la prevención de la formación de cicatrices postquirúrgicas, adherencias y queloides vinculada a los procedimientos quirúrgicos.

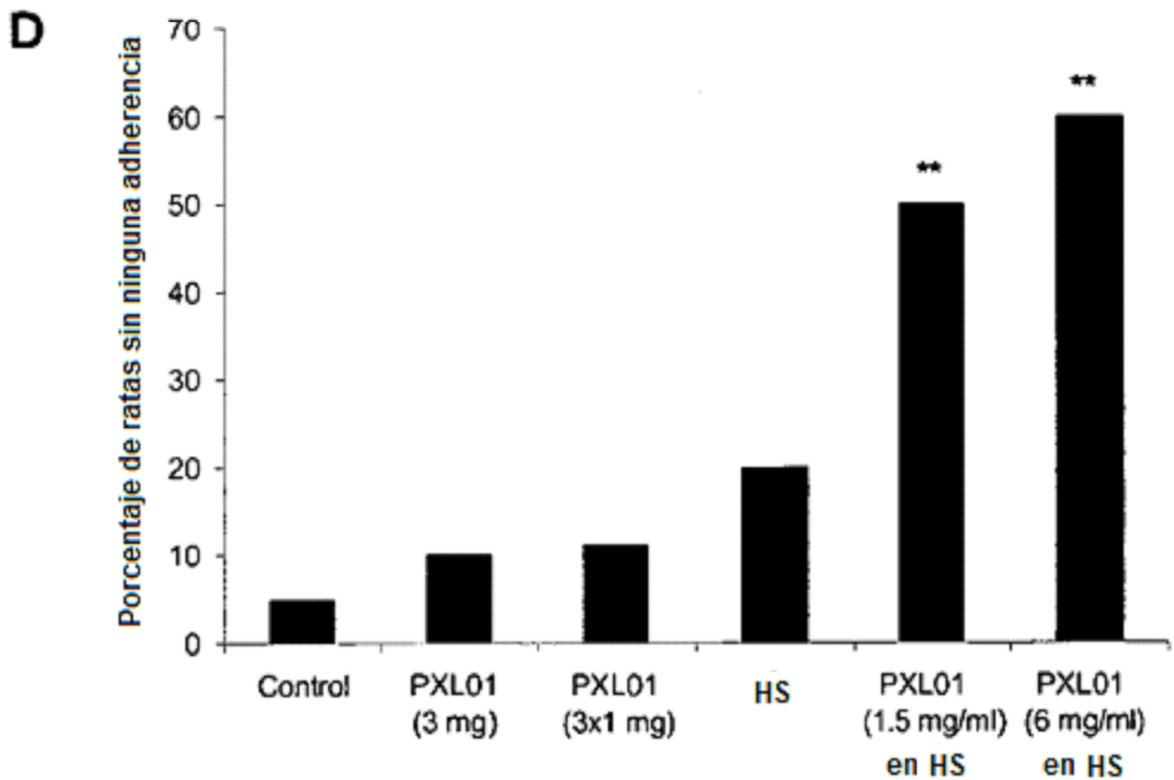
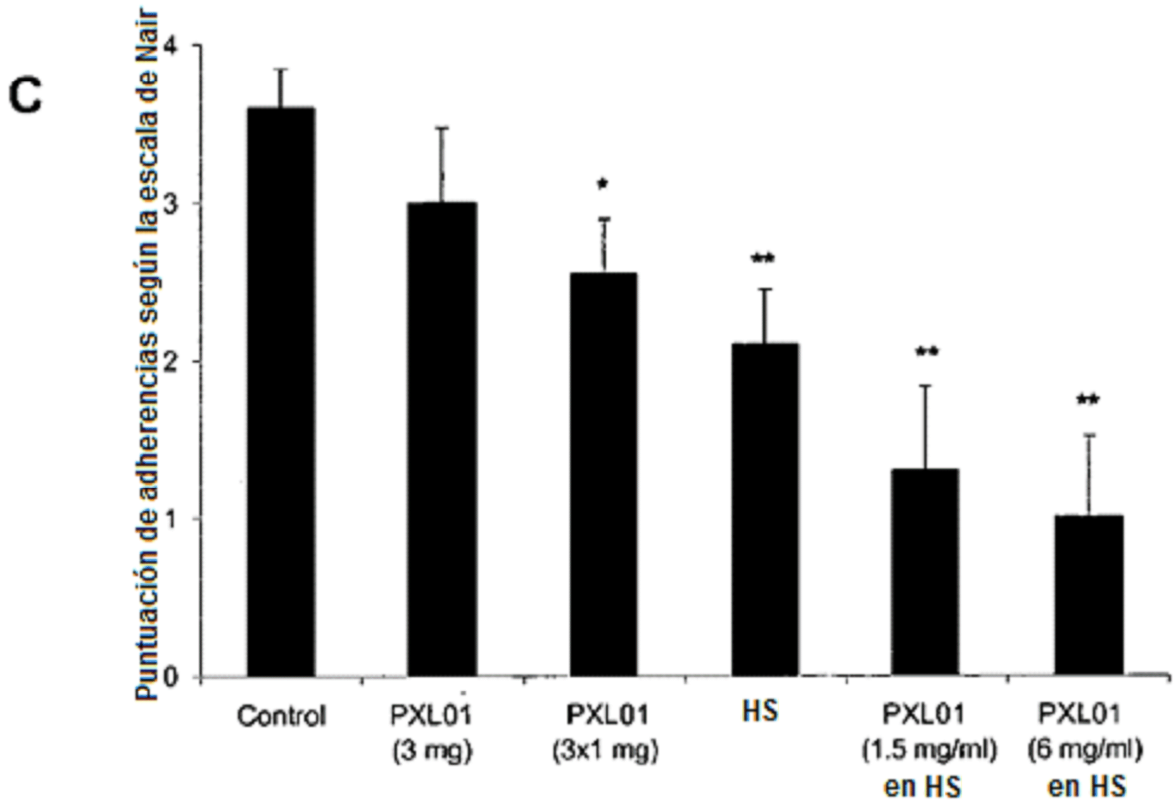
**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 2 (cont.)**





**FIGURA 2 (cont.)**

**E**

