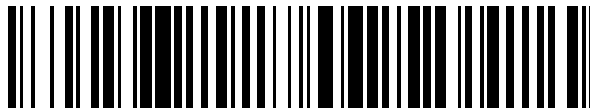


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 804**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61F 13/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2010 E 10165800 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 2395015**

54 Título: **Péptidos para la curación de heridas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2013

73 Titular/es:

**GENE SIGNAL INTERNATIONAL SA (100.0%)
Parc Scientifique EPFL PSE-A
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**AL-MAHMOOD, SALMAN y
COLIN, SYLVIE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 410 804 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 para la curación de heridas

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con péptidos para la curación de heridas, la composición que comprende dichos péptidos y su uso en aplicaciones cosméticas y para la curación de heridas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La curación de heridas en los tejidos es un proceso de reparación complejo. Bajo circunstancias normales, el proceso de curación de heridas agudo puede desglosarse en tres fases. Una fase inflamatoria inicial, la cual es seguida por la remodelación y proliferación robusta de tejido (fase proliferativa), es sucedida por una fase de maduración en donde resulta la re-epitelización, la angiogénesis dérmica y el cierre de la herida. La re-epitelización involucra la migración y proliferación de tejido epitelial, principalmente queratinocitos. La angiogénesis es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de conductos pre-existentes, y es regulada por una panoplia de citocinas solubles que incluyen polipéptidos factores de crecimiento, así como interacciones célula-célula y célula-matriz. Las heridas crónicas exhiben un perfil curativo diferente a partir de heridas agudas normales, en el que ellas generalmente permanecen en un estado inflamado por períodos de tiempo prolongados. Las heridas no-curables pueden ser observadas más comúnmente entre personas con diabetes, en la enfermedad de estasis venosa, y en aquellos pacientes que están inmovilizados. En vista de lo anterior, sería deseable proporcionar nuevas biomoléculas que potencien con seguridad y eficientemente los mecanismos epiteliales y vasculares de curación de heridas en ambas situaciones de curación de heridas crónicas y agudas. Las drogas para promover la curación de heridas han sido desarrolladas recientemente tal como el Beclapernin, un PDGF recombinante desarrollado mediante ingeniería genética a partir de Johnson & Johnson, o una composición farmacéutica para la regeneración y reparación de tejidos de mamíferos que comprende PDGF y dexametasona (EP0575484). US5981606 describe un agente para la curación de heridas que comprende TGF-beta y US6800286 y US5155214 describe agentes para la curación de heridas que comprenden FGF.

Todos los agentes de curación ya descritos son factores de crecimiento, citocinas o quimoquinas, colágeno o ácido hialurónico. Estos agentes presentan la desventaja de inducir eventos adversos ya que estos no son específicos de un tipo celular.

EP 1955704 y EP 1955705 describen la proteína 156A y fragmentos de estas para usar en el tratamiento médico y cosmético de las heridas.

Existe una necesidad de un agente alternativo para la curación de heridas que resulte en una curación efectiva y rápida de las heridas y no cause eventos adversos. La presente invención proporciona nuevos péptidos como agentes alternativos para la curación de heridas, siendo dichos péptidos específicos para la angiogénesis mediada por células endoteliales. Los péptidos, los cuales son menores de 50 aminoácidos, presentan la ventaja de ser una herramienta interesante para el uso terapéutico debido a su pequeño tamaño: ellos ofrecen una alta afinidad-especificidad hacia su objetivo y perfiles de baja toxicidad, un almacenamiento a temperatura ambiente y mejor penetración en el tejido debido a su pequeño tamaño.

Además, ellos presentan la ventaja de ser fácilmente sintetizados comparado a la proteína de longitud completa: su producción industrial es así más estandarizada y controlada. Ellos no muestran problema de seguridad viral ya que pueden ser sintetizados químicamente y no sufren de problemas a partir de replegamiento, problemas de glicosilación y actividad variable.

45 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la invención es un péptido de menos de 50 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6. Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos uno del péptido en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la invención es dicha composición farmacéutica para la curación de heridas. Otro objeto de la invención es una composición cosmética que comprende al menos uno del péptido de la invención.

55 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La curación de heridas se basa en la migración y proliferación de las células a o cerca del borde de la herida y el reclutamiento de vasos sanguíneos nuevos o pre-existentes al sitio de la herida.

Los inventores encontraron que los péptidos de la invención eran capaces de promover la curación de las heridas, a través de un aumento de la angiogénesis; y fueron particularmente eficientes.

Un objeto de la invención es un péptido de menos de 50 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

Péptido 7: TQECPVRTSLDRELDLQASL (sec. con núm. de ident.: 1)
 Péptido 7B: ELDLQASL (sec. con núm. de ident.: 2)
 Péptido 10: VSKDVCRL (sec. con núm. de ident.: 3)
 Péptido 11: QSQKVPRQVQS (sec. con núm. de ident.: 4)
 Péptido 7A: TQECPVRTSLD (sec. con núm. de ident.: 5)
 Péptido 7C: RRTTQECPVRTSLD (sec. con núm. de ident.: 6)

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de 8 a 50 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de 8 a 40 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de 8 a 30 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de 8 a 25 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de 8 a 20 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de 8 a 18 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de 8 a 16 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de 8 a 14 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de 8 a 12 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, y sec. con núm. de ident.: 5.

Otro objeto de la invención es un péptido que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.

"Péptido" como se usa en la presente se refiere a un polímero en el cual los monómeros son alfa aminoácidos unidos a través de enlaces amida. Los péptidos son dos o frecuentemente más monómeros de aminoácido largos, y no mayores de 50 aminoácidos. Los residuos de aminoácido en los péptidos se abrevian como sigue: fenilalanina es Phe o F; leucina es Leu o L; isoleucina es Ile o I; metionina es Met o M; valina es Val o V; serina es Ser o S; prolina es Pro o P; treonina es Thr o T; alanina es Ala o A; tirosina es Tyr o Y; histidina es His o H; glutamina es Gln o Q; asparagina es Asn o N; lisina es Lys o K; ácido aspártico es Asp o D; ácido glutámico es Glu o E; cisteína es Cys o C; triptófano es Trp o W; arginina es Arg o R; y glicina es Gly o G. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como alfa, aminoácidos alfa-disubstituidos, N-alquil aminoácido, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales pueden ser además componentes adecuados para los compuestos de la tecnología proporcionados en la presente descripción. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: beta-alanina, 1-naftilalanina, 2-naftilalanina, 3-piridilalanina, 4-hidroxi prolina, O-fosfoserina, N- acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilina, nor-leucina, y otros aminoácidos similares e imino ácidos (por ejemplo, 4-hidroxi prolina).

Los péptidos descritos en la presente invención pueden ser producidos sintéticamente mediante síntesis química o síntesis enzimática como es bien conocido en la materia. Alternativamente, las secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos de la invención pueden ser introducidos dentro de un vector de expresión de proteína y producido en un organismo hospedero adecuado (por ejemplo, bacteria, células de insecto, etc), después purificado. Un polipéptido adicional

5 ("marcador") puede ser agregado para el propósito de purificar o identificar o purificar los péptidos. Los marcadores de proteínas hacen posible, por ejemplo, que los polipéptidos sean adsorbidos, con alta afinidad, a la matriz, y para que la matriz después sea lavada rigurosamente con tampones adecuados sin que el complejo sea eluido en alguna magnitud significativa, y para que el complejo adsorbido sea posteriormente eluido selectivamente. Los ejemplos de los marcadores de proteínas los cuales son conocidos por la persona experimentada son un marcador (His)₆, un marcador Myc, un marcador FLAG, un marcador hemaglutinina, un marcador glutatión transferasa (GST), inteína con un marcador aglutinante de quitina por afinidad o un marcador de proteína aglutinante de maltosa (MBP). Estos marcadores de proteína pueden estar localizados N-terminalmente, C-terminalmente y/o internamente.

10 Un objeto de la invención son los péptidos descritos aquí anteriormente, siendo modificados dichos péptidos. Los péptidos proporcionados en la presente invención pueden ser modificados por medios bien conocidos en la materia.

15 Por ejemplo, los péptidos pueden ser modificados por la adición de uno o más grupos funcionales tales como fosfato, acetato, o varios lípidos y carbohidratos. Los péptidos de la invención pueden existir además como derivados de péptidos. El término "derivado de péptido" se refiere al compuesto que tiene un grupo amino (--NH--), y más particularmente, un enlace peptídico. Los péptidos pueden considerarse amidas sustituidas. Como el grupo amida, el enlace peptídico muestra un alto grado de estabilización por resonancia. El enlace simple C--N en el enlace peptídico tiene típicamente aproximadamente 40 por ciento de carácter de enlace doble y el enlace doble C=O aproximadamente 40 por ciento de carácter de enlace simple. Los "grupos protectores" son los grupos que previenen reacciones indeseables (tales como proteólisis) que involucran grupos funcionales no protegidos. Los ejemplos específicos de grupos amino protectores incluyen formilo; trifluoroacetil; benciloxicarbonilo; benciloxicarbonilo sustituido tal como (orto- o para-) clorobenciloxicarbonil y (orto- o para-) bromobenciloxicarbonil; y oxicarbonil alifático tal como t-butoxicarbonilo y t-amiloxicarbonil. Los grupos carboxilo de los aminoácidos pueden protegerse a través de la conversión en grupos éster. Los grupos éster incluyen bencil ésteres, bencil ésteres sustituidos tales como metoxibencil éster; alquil ésteres tales como ciclohexilo éster, cicloheptil éster o t-butil éster. La porción guanidino puede estar protegida por nitro; o arilsulfonil tal como tosilo, metoxibencensulfonilo o mesitilensulfonilo, incluso se piensa que no necesita un grupo protector. Los grupos protectores de imidazol incluyen tosilo, bencilo y dinitrofenilo. El grupo indol del triptófano podría ser protegido por formilo o podría no estar protegido.

25 La modificación de los péptidos apunta particularmente para mejorar su tiempo de vida in vivo . Un tipo de modificación es la adición de polietilenglicol (PEG) otorgada al N o C terminal de los péptidos. El PEG es conocido por las personas con experiencia en la materia por tener numerosas propiedades que lo hacen un portador ideal para péptidos tal como su alta solubilidad en agua, alta movilidad en solución y baja inmunogenicidad. Esta modificación además protege los péptidos de exopeptidasas y por lo tanto incrementa su estabilidad de conjunto in vivo.

30 Las otras modificaciones usadas para prevenir la degradación de los péptidos por endopeptidasas o exopeptidasas incluyen modificaciones N-terminal tales como acetilación o glicosilación, modificaciones C-terminal tales como amidación y uso de aminoácidos no naturales (β -amino y α -trifluorometilo amino ácidos) particularmente en sitios dentro de los péptidos.

35 Otra alternativa para incrementar el tamaño molecular del péptido es la fusión genética de los péptidos al dominio Fc de inmunoglobulina gamma humana o la fusión de los péptidos a la albúmina.

40 Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos descritos aquí anteriormente en conjunto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la descripción es un método para la curación de heridas que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de los péptidos de la invención.

45 De acuerdo con la invención, el sujeto puede ser cualquier mamífero, preferentemente un ser humano.

"Cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a un nivel de dosificación suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Preferentemente, esta dosis o cantidad será suficiente para estimular o aumentar la respuesta epitelial y/o endotelial a la curación de heridas y, así, inducir o potenciar la curación de heridas.

50 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos y composiciones que pueden administrarse a los mamíferos sin toxicidad indebida. Los excipientes adecuados incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y soluciones de etanol, glucosa, sacarosa, dextrano, manosa, manitol, sorbitol, polietilenglicol (PEG), fosfato, acetato, gelatina, colágeno, Carbopol(R), aceites vegetales, y similares. Se pueden incluir además conservantes adecuados, estabilizadores, antioxidantes, antimicrobianos, y agentes tampones, por ejemplo, BHA, BHT, ácido cítrico, ácido ascórbico, tetraciclina, y similares.

55 En una modalidad, la composición puede comprender una sal farmacéuticamente aceptable del péptido. Los ejemplos de sal farmacéuticamente aceptable incluyen las sales con bases inorgánicas, sales con bases orgánicas, sales con ácidos inorgánicos, sales con ácidos orgánicos, sales con aminoácidos básicos o ácidos y similares. Los ejemplos de la sal con un ácido inorgánico incluyen sales de metales alcalinos, tales como una sal de sodio y una sal de potasio; una sal de metal alcalinotérreo tal como una sal de calcio y una sal de magnesio; una sal de aluminio; y una sal de amonio. Los

ejemplos de la sal con una base orgánica incluyen sales con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, 2,6-lutidina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, ciclohexilamina, dicitlohexilamina y N,N'-dibenciletildiamina. Los ejemplos de la sal con un ácido inorgánico incluyen sales con ácido clorhídrico, ácido bórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Los ejemplos de la sal con un ácido orgánico incluyen las sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoacético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluensulfónico. Los ejemplos de la sal con un aminoácido básico incluyen sales con arginina, lisina y ornitina. Los ejemplos de la sal con un aminoácido ácido incluyen sales con ácido aspártico y ácido glutámico. La lista de sales adecuadas se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ma ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., p 1418, 1985.

Como se usa en la presente, el término "curación de heridas" se refiere a aumentar, mejorar, incrementar, o inducir el cierre, curación, o reparación de una herida. La curación de heridas se considera promovida, por ejemplo, si el tiempo de curación de una herida tratada con el péptido de la invención comparado con una herida no tratada con el péptido de la invención disminuye aproximadamente 10%, preferentemente disminuye aproximadamente 20%, 25%, 30%, 40%, con mayor preferencia disminuye aproximadamente 50%, y con la máxima preferencia disminuye aproximadamente 75%. Por el contrario, el grado de formación de la cicatriz puede ser usado para determinar si la curación de la herida está promovida.

La herida puede ser una herida interna o una herida externa encontrada en cualquier lugar de un mamífero. Una herida es un tipo de trauma físico donde la integridad de la piel o tejido está roto como resultado de por ejemplo una fuerza externa, mal estado de salud, envejecimiento, exposición a la luz solar, calor o reacción química o como un resultado de daño por procesos fisiológicos internos. Si la capa exterior de un tejido se daña la herida se considera una herida abierta.

Las heridas además pueden ser causadas por procedimientos quirúrgicos, tales como cirugía a corazón abierto, trasplantes de órgano, amputaciones, e implantaciones de prótesis, tales como reemplazo de articulación y cadera, etc.

La herida puede ser una herida abierta o una herida cerrada.

Las heridas abiertas se refieren a heridas en las cuales la piel está rota. Las heridas abiertas incluyen, por ejemplo, incisiones (es decir, heridas en las cuales la piel está rota, por ejemplo, a causa de un instrumento cortante (por ejemplo, cuchillo, navaja, etc.)), laceraciones (es decir, heridas en las cuales la piel está típicamente rota por un instrumento deslustrado o despuntado), abrasiones (por ejemplo, generalmente una herida superficial en la cual las capas más altas de la piel están raídas), heridas de perforación (típicamente causadas por un objeto tal como un cuchillo), y heridas de bala.

Las heridas cerradas son típicamente heridas en las cuales la piel no está rota. Las heridas cerradas incluyen, por ejemplo, contusiones (o magulladuras) causadas por un trauma de fuerza despuntada que daña el tejido bajo la piel, hematomas causados por daño a un vaso sanguíneo que a su vez causa la recolección de la sangre bajo la piel, lesión por aplastamiento causado por una gran o extrema cantidad de fuerza aplicada durante un período de tiempo prolongado, heridas agudas y crónicas.

Los ejemplos no limitantes de heridas son:

- una herida por quemadura es la lesión resultante a partir de la exposición al calor, electricidad, radiación (por ejemplo, quemaduras solares y cirugía láser), o químicos cáusticos.
- las heridas de piel debido al envejecimiento o el medio ambiente, esto incluye por ejemplo rajaduras, piel seca, rugosidad de la piel y similares,
- las heridas debido a fuerzas externas que dañan el tejido,
- úlceras (lesión en la superficie de la piel o superficie mucosa),
- las heridas en Diabetes Mellitus son típicamente lesiones del pie debido a entumecimiento causado por daño al nervio (neuropatía diabética) y bajo flujo sanguíneo hacia las piernas y los pies. La lesión más seria es la úlcera del pie. Las úlceras del pie diabético presentan un riesgo muy alto de infectarse, y algunas veces no pueden ser curadas. Las úlceras del pie no curables son una causa frecuente de amputación en personas con diabetes,
- las heridas decúbito, decúbito (úlceras de decúbito), es decir lesiones causadas por presión no aliviada hacia cualquier parte del cuerpo, especialmente porciones sobre áreas óseas o cartilaginosa.

En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica como se describió aquí anteriormente es para la curación de heridas.

En una modalidad de la invención, la composición de la invención es para tratar las heridas agudas o crónicas. Las heridas agudas son causadas por un daño externo en la piel intacta y pueden clasificarse en diferentes tipos, de acuerdo con el objeto que causó la herida: por ejemplo, incisiones o heridas incisivas, laceraciones, abrasiones y rasguño, quemaduras, heridas punzantes causadas por un objeto que pincha la piel, tal como una uña o una aguja, heridas de penetración causadas por un objeto tal como un cuchillo que entra en el cuerpo, heridas de bala causadas por una bala o proyectil similar conducido en o a través del cuerpo. Las heridas agudas pueden ser también heridas cerradas, tales como contusiones o magulladuras, hematoma, lesiones por aplastamiento causadas por una cantidad grande o extrema de fuerza aplicada por un largo período de tiempo. Otras heridas agudas se deben a enfermedades dermatológicas tales como psoriasis, acné y eczema.

Las heridas crónicas son más frecuentemente causadas por mecanismos endógenos asociados con una condición de predisposición que finalmente compromete la integridad del tejido dérmico o epitelial. Las heridas crónicas comunes son úlceras venosas, las cuales usualmente ocurren en las piernas y en general afectan a los ancianos, úlceras diabéticas las cuales son otra causa principal de las heridas crónicas, úlceras por presión, las cuales usualmente ocurren en personas con condiciones tal como parálisis que inhibe el movimiento de partes del cuerpo que son comúnmente sujetas a presión tales como los talones, omóplatos y sacro, úlceras córneas, más comúnmente causadas por una infección con bacterias, virus, hongos o amebas, y úlceras digestivas. Otros tipos de heridas crónicas podrían deberse a causas tales como isquemia y envenenamiento por radiación. Todas las heridas crónicas sanan lentamente y en una manera impredecible. La herida puede relacionarse a cualquier tejido tales como el ojo, mucosa, pulmón, riñón, corazón, estómago, tendones, hígado o tejidos vasculares, tales como venas, vénulas, arterias, y capilares.

De acuerdo con la invención, los péptidos de la invención presentan la ventaja de activar la angiogénesis y de ese modo promover la curación de las heridas.

Otro objetivo de la invención es una composición cosmética que comprende al menos uno de los péptidos de la invención. Esta composición es para aplicación cosmética: por ejemplo la prevención del envejecimiento de la piel, celulitis, piel seca, rajaduras, o tratamiento de lesiones orales aftosas, síndrome de la boca ardiente.

De acuerdo con la descripción los péptidos de la invención podrían administrarse oralmente, en forma tópica, o por medios parenterales, que incluyen inyección subcutánea, transdérmica o intramuscular, implantación de estaciones de liberación sostenida, inyección intravenosa, administración intranasal, y similares.

De acuerdo con la invención, las composiciones que comprenden los péptidos de la invención pueden ser soluciones acuosas, emulsiones, cremas, ungüentos, suspensiones, geles, suspensiones liposomales, y similares. Los ejemplos de composiciones para la administración tópica incluyen, pero sin limitarse a, loción, pomada, gel, crema, bálsamo, tintura, cataplasma, elixir, pasta, aerosol, colirio, gotas, suspensión, dispersión, hidrogel, ungüento, emulsión o polvo que comprende al menos uno del péptido de la invención.

Otras formulaciones tópicas incluyen aerosoles, vendajes, materiales de apósito, apósitos de alginato y otros apósitos para heridas.

Las formulaciones orales incluyen, pero sin limitarse a, suspensión o solución bebible, jarabe, tabletas, cápsulas, píldoras.

Alternativamente se puede incorporar o encapsular el péptido de la invención en un dispositivo médico adecuado, para la implantación cerca del sitio a ser tratado localmente.

De acuerdo con la invención, el dispositivo médico puede estar en forma de un dispositivo médico transdérmico, un dispositivo médico de liberación controlada del fármaco o una endoprótesis eluyente del fármaco. El dispositivo médico transdérmico se refiere a un dispositivo para la liberación lenta del péptido de la invención a través del proceso transdérmico (por ejemplo un parche adhesivo). Una endoprótesis eluyente de fármaco se refiere a una endoprótesis que ha sido recubierta con los péptidos de la invención.

En una modalidad particular de la invención, los péptidos de la invención están comprendidos dentro de un dispositivo médico tal como productos absorbentes o adsorbentes. Los productos absorbentes o adsorbentes, por ejemplo, son capaces de absorber o adsorber un fluido de la herida cuando se aplica en el sitio de la herida. Los ejemplos de dichos productos incluyen, por ejemplo, vendajes, gasas, apósitos para heridas o llagas, parches dérmicos o cintas adhesivas. Numerosos tipos de apósitos están comercialmente disponibles, e incluyen películas (por ejemplo, películas de poliuretano), hidrocoloides (partículas coloidales hidrofílicas unidas a espuma de poliuretano), hidrogeles (polímeros reticulados que contienen aproximadamente al menos un 60% de agua), espumas (hidrofílicas o hidrofóbicas), apósitos basados en quitosana, alginatos de calcio (compuestos no tejidos de fibras a partir de alginato de calcio), y celofán (celulosa con un plastificante). Se contempla específicamente el uso de productos líquidos absorbentes donde los péptidos de la invención están impregnados dentro o unidos (covalentemente o de cualquier otra forma) a la superficie del producto.

De acuerdo con la invención, la composición comprende el péptido de la invención en una cantidad de aproximadamente 0.0001 a 500 mg del péptido por mililitro o gramo de la composición, preferentemente de aproximadamente 0.001 a 50 mg, con mayor preferencia de 0.01 a 5 mg y aún con mayor preferencia de 0.1 a 1 mg del péptido por mililitro o gramo de la composición. De acuerdo con la invención, la composición comprende el péptido de la invención en una cantidad de aproximadamente 0.01% a 90% en peso, preferentemente de 0.1 a 10% en peso, con mayor preferencia de 1 a 5% en peso.

En otra modalidad de la invención, la composición que comprende al menos uno de los péptidos de la invención puede comprender además al menos otro agente para la curación de heridas.

En otra modalidad de la invención, la composición que comprende al menos uno de los péptidos de la invención puede usarse en combinación con al menos un otro agente para la curación de heridas.

Dicho otro agente para la curación de heridas incluye, sin estar limitado a, factores de crecimiento, citocinas, enzimas, y componentes de matriz extra-celular. Por ejemplo, el tratamiento de colagenasa de la matriz extra-celular sub-endotelial en combinación con los péptidos de la invención puede acelerar sinérgicamente la migración y proliferación endotelial hasta un nivel mayor que la influencia inductiva del tratamiento de colagenasa en la ausencia de péptidos.

Los agentes con efecto en la reparación de la herida pueden incluirse además en dicha composición para aumentar el proceso de curación de herida. Tales agentes incluyen miembros de la familia de los factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), timosina α 1 (T α 1), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Con mayor preferencia, el agente es el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β) u otros miembros de la superfamilia del TGF- β . En otra modalidad de la invención, la composición de la invención comprende además una sustancia hemostática, un factor de crecimiento, una sustancia anti-infecciosa, una sustancia analgésica, una sustancia antiinflamatoria o una combinación de éstos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Las imágenes representativas del ensayo de angiogénesis in vitro en presencia del péptido 7, 10 y 11 (las imágenes se tomaron a 6h post incubación).

Figura 2: Transcurso del tiempo de curación de heridas de las heridas tratadas con el vehículo y las heridas tratadas con el péptido 7.

Figura 3: Transcurso del tiempo de curación de heridas de las heridas tratadas con el vehículo y las heridas tratadas con el péptido 10.

Figura 4: Transcurso del tiempo de curación de heridas de las heridas tratadas con el vehículo y las heridas tratadas con el péptido 11.

Figura 5: Transcurso del tiempo de curación de heridas de las heridas tratadas con el vehículo y las heridas tratadas con el péptido 7B .

Figura 6: Transcurso del tiempo de curación de heridas de las heridas tratadas con el vehículo y las heridas tratadas con el péptido 7A .

Figura 7: Transcurso del tiempo de curación de heridas de las heridas tratadas con el vehículo y las heridas tratadas con el péptido 7C.

Figura 8: (A) Medida de VEGF por QPCR en presencia del péptido 7 o péptido 10. (B) Medida de VEGF por ELISA en presencia del péptido 7.

Figura 9: (A) Influencia del péptido 7 (400 μ g/ml) y péptido 10 (400 μ g/ml) en la activación de pAkt. Inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal anti-pAkt activado, y mAb anti-GAPDH como control interno. (B) Influencia del péptido 7 y péptido 10 en la activación de MAPK. A) Inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal anti-MAPK activado (pErk1/2) y mAb anti-GAPDH como control interno.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Medio de cultivo y reactivos

El medio de cultivo EGM-2MV fue de Lonza (Verviers, Bélgica). El PBS libre de calcio y magnesio, tripsina-EDTA (Versene), IPTG (isopropilo-1-B-D-tio-1-galactopiranosido), kanamicina y cloranfenicol fueron adquiridos de Eurobio (Les Ulis, Francia). El Matrigel se adquirió de Becton Dickinson (Le Pont de Claix, Francia).

El medio de cultivo bacteriano LB, y las enzimas Thermoscript y la Platinum HIFI de alta fidelidad fueron obtenidas de Invitrogen (Cergy Pontoise, Francia).

El estuche mini Rneasy, Qiaquick y Qiaprep miniprep fueron obtenidos de Qiagen (Courtaboeuf, Francia), de Roche Applied Science y el estuche RACE 5'3' RACE estuche de Roche Applied Science.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento 2 de fibroblastos (FGF2), y el interferón gamma (IFN γ) se adquirieron de R&D (Abingdon, Reino Unido). El vector de clonación pGEM-T easy vector y el vector de expresión pCi neovector se adquirieron de Promega (Charbonnières-les-bains, Francia), mientras el vector pET30 era de Novagen-Merck bioscience (Nottingham, Reino Unido distribuido por VWR INTERNATIONAL S.A.S, Fontenay sous Bois, Francia).

El estuche de ELISA Sandwich para VEGFA humano fue adquirido de Cell Signaling technology.

Péptidos

Los péptidos 7, 10, 11, 7B, 7A y 7C se sintetizaron químicamente por GeneCust con acetilación N-terminal y amidación C-terminal como modificaciones químicas. Todos los péptidos se sometieron a una etapa de purificación por HPLC y se usaron como un polvo liofilizado con al menos un 95% de pureza.

Animales

Ratones desnudos suizos libres de patógeno específico de cinco semanas de edad (peso de 19 a 22g), se adquirieron de Charles River laboratories (69592 L'Arbresle, Francia). Los animales se alojaron en nuestras instalaciones de cuidado animal hasta su sacrificio. La instalación de cuidado animal (CERFE, Evry, Francia) está certificada por el Ministerio Francés de Agricultura e Investigación. Los experimentos animales se desarrollaron de acuerdo con las directivas éticas de experimentación animal (Directiva n°86/609 CEE) y las directivas del sistema inglés para el bienestar de animales en la neoplasia experimental (Comité co-coordinador del Reino Unido sobre directivas de investigación en cáncer para el bienestar de animales en neoplasia experimental (1998). Br. J. Cancer. 77:1-10).

Métodos**Síntesis del péptido**

Todos los péptidos se sintetizaron químicamente seguido por una etapa de purificación por HPLC que asegura al menos 90% de pureza del péptido purificado.

Péptido #	Secuencia	MW (Da)	Punto isoeléctrico	Modificaciones químicas
7	TQECPVRTSLDRELDLQASL	2315.60	4.05	N-acctilación & C-amidación
10	VSKDVCRL	960.16	10.09	N-acctilación & C-amidación
11	QSQKVPRQVQS	1325.50	11.45	N-acctilación & C-amidación
7A	TQECPVRTSLD	1289.39	4.05	N-acctilación & C-amidación
7B	ELDLQASL	929.01	3.10	N-acctilación & C-amidación
7C	RRTTQECPVRTSLD	1702.88	10.81	N-acctilación & C-amidación

Ensayo de angiogénesis

La angiogénesis de las células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) se indujo in vitro usando un ensayo de Matrigel descrito por Grant y otros (1989, Cell, 1989; 58:933). Este método se basa en la diferenciación de células endoteliales para formar estructuras capilares sobre una matriz Matrigel. El Matrigel se prepara del tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), el cual representa una mezcla compleja de proteínas de membrana de basamento que incluyen colágeno tipo IV, entactina, proteo-heparán sulfato y otros factores de crecimiento.

En resumen, 250 µl de Matrigel se transfirieron a cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos y se incubaron a 37°C por 30 min para permitir que la solución de matriz solidificara. Las HMEC cultivadas en medio de crecimiento completo EGM-2MV se recogieron por tripsina, se suspendieron en el mismo medio de crecimiento y se añadieron 500 µl conteniendo 70 000 células sobre la parte superior del Matrigel solidificado en cada pocillo y en presencia o ausencia de proteína. Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂ a 37°C por 18-24 h. La formación del tubo endotelial fue observada y fotografiada bajo un microscopio de luz invertida.

Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa en tiempo real.

Después de la exposición a las concentraciones indicadas del péptido 7 o el péptido 10 emitidas desde la proteína recombinante GS-156A o vehículo por 24 h, HMEC (5 x 10⁵ células/ ml), el ARNm total se aisló usando el estuche NucleoSpin RNA II. Los rendimientos y pureza del ARN se estimaron por análisis espectrofotométricos. El RT-PCR en tiempo real se desarrolló como se describió previamente (Voghel y otros, 2008). En resumen, 0.5 µg de ARN total se retrotranscribieron con cebadores hexámeros aleatorios y M-MLV (200 U, Invitrogen), y el ADNc sintetizado se usó inmediatamente para la amplificación por PCR en tiempo real usando el tinte de unión al ADN SYBR Green I para la detección de los productos de PCR y los siguientes cebadores: para VEGF-A (sentido, 5' GAGGGCAGAATCATCACGAA- 3' (sec. con núm. de ident.: 7); antisentido, 5'-TGCTGTCTTGGGTGCATTGG-3' (sec. con núm. de ident.: 8)); para GAPDH (sentido, 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3' (sec. con núm. de ident.: 9); antisentido 5'-CATTGATGACAAGCTTCCCCG-3'

(sec. con núm. de ident.: 10)). Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo con el detector de fluorescencia continua DNA Engine OPTICON 2 (MJ Research, Waltham, MA, Estados Unidos.). Los resultados se cuantificaron usando la ecuación: $Copia_{TF} : Copia_{GAPDH} = 2^{C(t)_{GAPDH} - C(t)_{TF}}$. Todos los productos de PCR se analizaron por electroforesis sobre un gel de agarosa al 1.5%, visualizado con bromuro de etidio, y analizado usando el programa Genesnap 6.00.26 (Syngene, Cambridge, Reino Unido). El análisis densitométrico se realizó usando el Software de análisis GeneTools Versión 3.02.00 (Syngene).

Cuantificación de proteínas.

Las HMEC privadas de suero se incubaron con diferentes concentraciones del péptido 7 o el péptido 10 o el vehículo por 24 h a 37°C bajo 5% CO₂ por 6 h. Luego de 3 lavados con PBS enfriado con hielo, las células se suspendieron con el tampón de extracción de proteína (PEB) (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 25 mM pirofosfato sódico, 1 mM β-glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptina, 1 µM PMSF). El contenido de proteína se midió por Bradford. La concentración de VEGFA en el medio de cultivo o en los extractos se determinó por el estuche de ELISA Sandwich para VEGFA humano (Cell Signaling technology) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Estado de activación de la proteína cinasa B (pAkt) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)

El estado de la activación de pAkt se determinó por inmunotransferencia usando un anticuerpo pAkt anti-fososerina 473, y mAb anti-GAPDH como estándar interno. El estado de la activación of MAPK se determinó por inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-MAPK activado (pErk1/2), y mAb anti-GAPDH como estándar interno.

Vía de administración de los péptidos y dosificación

El vehículo (Lote A) se administró por aplicación tópica a un volumen estandarizado de 10 ml/kg para todas las aplicaciones. Los péptidos de la invención se administraron por aplicación tópica a la concentración de 0.5 mg/ml en el vehículo. Los protocolos de tratamiento fueron como sigue a continuación:

- Grupo 1: (Lote A, Vehículo): 1 aplicación tópica 10 minutos después de la herida
- Grupo 2: (Péptido 7, 0.5 mg/ml): 1 aplicación tópica 10 minutos después de la herida
- Grupo 3: (Péptido 10, 0.5 mg/ml): 1 aplicación tópica 10 minutos después de la herida
- Grupo 4: (Péptido 11, 0.5 mg/ml): 1 aplicación tópica 10 minutos después de la herida
- Grupo 5: (Péptido 7B , 0.5 mg/ml): 1 aplicación tópica 10 minutos después de. la herida
- Grupo 6: (Péptido 7A , 0.5 mg/ml): 1 aplicación tópica 10 minutos después de. la herida
- Grupo 7: (Péptido 7C , 0.5 mg/ml): 1 aplicación tópica 10 minutos después de. la herida

Heridas

Ratones suizos BALBC hembra sanos se anestesiaron por inyección IP con ketamina-xilazina (80 mg/kg-12 mg/kg; Ref. K-113, Sigma, Francia). Se realizaron dos heridas transdérmicas, cada una de 5 mm en ancho y aproximadamente 1 a 2 mm en profundidad en los flancos derecho e izquierdo de cada ratón usando un punzón de 5 mm. Los ratones se observaron por 2h post-herida.

Programa de tratamiento

En el D1, y 10 min post-lesión de los animales, los ratones fueron aleatorizados dentro de 7 grupos de 3 animales cada uno. Todos los tratamientos se realizaron por aplicación tópica a la frecuencia de 1 aplicación tópica/día, por 4 días. Los animales del grupo 1 se trataron con la solución vehículo (Lote A). Los animales de los grupos 2 al 7 se trataron con el péptido indicado a una dosis de 5mg/kg. Los ratones tratados se observaron por 2h post-tratamiento.

La ketamina/xilazina (80 mg/kg - 12 mg/kg; Ref. K-113, Sigma, Francia) se usó para anestesiarse los animales antes del sacrificio por dislocación cervical.

RESULTADOS

Los péptidos de la invención inducen angiogénesis in vitro

5 Los péptidos pequeños diseñados 7 (sec. con núm. de ident.: 1), 10 (sec. con núm. de ident.: 3), y 11 (sec. con núm. de ident.: 4) fueron sintetizados y examinados para sus actividades inductoras de la angiogénesis in vitro (como se describe en los Métodos aquí anteriormente).

10 Los resultados del ensayo de angiogénesis in vitro se presentaron en la **Figura 1**, usando las HMEC y una concentración final de 400 µg/ml de cada péptido. Las imágenes se tomaron a las 6h post incubación. Estos resultados muestran que los péptidos 7, 10, y 11 tienen una fuerte actividad inductora de la angiogénesis in vitro, y la actividad inductora de la angiogénesis in vitro de estos péptidos puede ser clasificada como sigue; péptido 7 > péptido 10 > péptido 11.

Curación de heridas con el péptido 7

15 El examen de curación de heridas post tratamiento con el péptido 7 mostró que las heridas tratadas con este péptido sanaron más rápido que las heridas tratadas con el vehículo (**Figura 2**). El día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento, las heridas tratadas con el vehículo mostraron 16.9, 21.2, 45.9, y 57.5% de curación respectivamente, mientras que las heridas tratadas con el péptico n°7 mostraron 52.8, 60.1, 65.6, y 82.9% de curación el día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento respectivamente.

Curación de heridas con el péptido 10

20 El examen de curación de heridas post tratamiento con el péptido 10 mostró que las heridas tratadas con este péptido sanaron más rápido que las heridas tratadas con el vehículo (**Figura 3**). El día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento, las heridas tratadas con el vehículo mostraron 16.9, 21.2, 45.9, y 57.5% de curación respectivamente, mientras que las heridas tratadas con el péptico 10 mostraron 42.8, 61.3, 65.6, y 78.9% de curación el día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento respectivamente.

Curación de heridas con el péptido 11

30 El examen de curación de heridas post tratamiento con el péptido 11 mostró que las heridas tratadas con este péptido sanaron más rápido que las heridas tratadas con el vehículo (**Figura 4**). El día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento, las heridas tratadas con el vehículo mostraron 16.9, 21.2, 45.9, y 57.5% de curación respectivamente, mientras que las heridas tratadas con el péptico 11 mostraron 41.9, 52.1, 58.4, y 64.4% de curación el día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento respectivamente.

Curación de heridas con 7B el péptido

35 El examen de curación de heridas post tratamiento con el péptido 7B mostró que las heridas tratadas con este péptido sanaron más rápido que las heridas tratadas con el vehículo (**Figura 5**). El día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento, las heridas tratadas con el vehículo mostraron 16.9, 21.2, 45.9, y 57.5% de curación respectivamente, mientras que las heridas tratadas con el péptico 7B mostraron 33.2, 56.9, 63.7, y 76.6% de curación el día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento respectivamente.

Curación de heridas con el péptido 7A

40 El examen de curación de heridas post tratamiento con el péptido 7A mostró que las heridas tratadas con este péptido sanaron más rápido que las heridas tratadas con el vehículo (**Figura 6**). El día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento, las heridas tratadas con el vehículo mostraron 16.9, 21.2, 45.9, y 57.5% de curación respectivamente, mientras que las heridas tratadas con el péptico n°7A mostraron 27.4, 44.7, 45.1, y 58.8% de curación el día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento respectivamente.

Curación de heridas con el péptido 7C

50 El examen de curación de heridas post tratamiento con el péptido 7C mostró que las heridas tratadas con este péptido sanaron más rápido que las heridas tratadas con el vehículo (**Figura 7**). El día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento, las heridas tratadas con el vehículo mostraron 16.9, 21.2, 45.9, y 57.5% de curación respectivamente, mientras que las heridas tratadas con el péptico n°7C mostraron 39.4, 55.3, 58.8, y 68.2% de curación el día 1, 2, 3 y 4 post tratamiento respectivamente.

El péptido 7 induce la expresión del VEGF en ambos niveles transcripcional y translacional en las HMEC

60 Se investigó la influencia del péptido 7 y el péptido 10 sobre la expresión del VEGF. Para esto, las HMEC se incubaron con el péptido 7 (400 µg/ml concentración final), o el péptido 10 (400 µg/ml concentración final) por 6h, seguido por la medición de la expresión del VEGFA por PCR cuantitativo en tiempo real (QPCR). Los resultados mostraron que las HMEC incubadas con el péptido 7 expresaron aproximadamente el ARNm del VEGFA 170% más alto que las HMEC incubadas sin la adición

del péptido (control) (**Figura 8A**). Los resultados presentados en la misma Figura 8 mostraron además que las HMEC incubadas con el péptido 10 expresaron aproximadamente el ARNm del VEGFA 60% más alto que las HMEC incubadas sin la adición del péptido (control).

Para mostrar que esta expresión transcripcional inducida del VEGFA podría ser encontrada además al nivel translacional, hemos usado un ensayo ELISA sandwich específico para el VEGFA humano para determinar la concentración de la proteína VEGFA. El análisis del medio de cultivo de las HMEC incubadas con concentraciones crecientes del péptido 7 mostraron que hay un incremento dependiente de la dosis en la proteína VEGF dentro del medio de cultivo alcanzando un pico de aproximadamente un incremento del 97% a 400 µg/ml del péptido 7 atestiguando que hay aproximadamente incrementos de dos veces de la biosíntesis y excreción del VEGFA ($p < 0.001$) (**Figura 8B**). Estos resultados indican que la expresión transcripcional inducida del VEGFA inducida por el péptido 7 podría ser encontrada además al nivel translacional.

El péptido 7 y el péptido 10 inducen la activación de la proteína cinasa B (Akt) pero no MAPK en las HMEC.

Se investigó el estado de Akt en las HMEC seguido de la incubación con el péptido 7 o el péptido 10. Los resultados mostraron que las HMEC (control) poseen un nivel modesto de Akt activada (**Figura 9A**, carril parte 4). Las líneas de células HMEC incubadas con el péptido 7, no obstante, presentan un nivel mucho más alto de Akt activada 10 min y 30 min post incubación (Figura 9A, carriles 2 y 5 respectivamente) relativo a las HMEC incubadas sin el péptido (control), indicando que el péptido 7 induce la activación de Akt.

La investigación del estado de pAkt en las líneas de células HMEC incubadas con el péptido 10 además mostró que hay un nivel mucho más alto de Akt activada 10 min y 30 min post incubación (Figura 9A, carriles 3 y 6 respectivamente) relativo a las HMEC incubadas sin el péptido (control), indicando además que el péptido 10 induce la activación de Akt.

Además, hemos investigado el estado de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), ya que está bien establecido que estas representan otra cascada de señalización intracelular que pudo estar implicada en la regulación de la expresión del VEGF. Los resultados mostraron que no hay variaciones significativas en el nivel de activación de Erk1 y 2 (dos miembros de MAPK) entre las HMEC incubadas sin la adición del péptido (control), las HMEC incubadas con el péptido 7, las HMEC incubadas con el péptido 10 (**Figura 9B**), indicando que el péptido 7 ni el péptido 10 pudieron activar MAPK, y la cascada MAPK al parecer no está implicada en la expresión del VEGF inducida por el péptido 7 y el péptido 10

Listado de Secuencia

<110> GENE SIGNAL INTERNATIONAL SA Al-Mamhood, Salman

<120> Nuevos péptidos para la curación de heridas

<130> CV-91/EP

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido 7

<400> 1

Thr Gln Glu Cys Pro Val Arg Thr Ser Leu Asp Arg Gln Leu Asp Leu
 1 5 10 15

Gln Ala Ser Leu
 20

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
 <223> Péptido 7B
 5 <400> 2
 Glu Leu Asp Leu Gln Ala Ser Leu
 1 5
 <210> 3
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido 10
 15 <400> 3
 Val Ser Lys Asp Val Cys Arg Leu
 1 5
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Péptido 11
 <400> 4
 Gln Ser Gln Lys Val Pro Arg Gln Val Gln Ser
 1 5 10
 25 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Péptido 7A
 <400> 5
 Thr Gln Glu Cys Pro Val Arg Thr Ser Leu Asp
 1 5 10
 35 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Péptido 7C
 <400> 6
 Arg Arg Thr Thr Gln Glu Cys Pro Val Arg Thr Ser Leu Asp
 1 5 10
 45 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador sentido VEGFA

 <400> 7
 5 gagggcagaa tcatcacgaa 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador anti-sentido VEGFA

 <400> 8
 15 tgctgtcttg ggtgcattgg 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador sentido GAPDH

 <400> 9
 25 tgaaggtcgg agtcaacgga 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador anti-sentido GAPDH

 <400> 10
 35 cattgatgac aagcttcccg 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido de menos de 50 aminoácidos que comprende una de las secuencias seleccionadas del grupo de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5 y sec. con núm. de ident.: 6.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido consiste de 8 a 30 aminoácidos.
- 10 3. El péptido de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 a 2, en donde dicho péptido es químicamente modificado por una acetilación y/o una amidación.
4. Una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 15 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para la curación de heridas.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 4 a 5, que además comprende una sustancia hemostática, un factor de crecimiento, una sustancia anti-infecciosa, una sustancia analgésica, una sustancia antiinflamatoria o una combinación de estas.
- 20 7. Una composición cosmética que comprende al menos uno de los péptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 4 a 6 o la composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 7, que está en forma adecuada para la administración tópica, oral o parenteral .
9. La composición farmacéutica o cosmética de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la forma adecuada para la administración tópica es loción, pomada, gel, crema, bálsamo, tintura, cataplasma, elixir, pasta, aerosol, colirio, gotas, suspensión, dispersión, hidrogel, ungüento, emulsión o polvo.
- 30 10. La composición farmacéutica o cosmética de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 4 a 9, en donde el péptido se administra en el sitio de la herida.
- 35 11. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 4 a 6 y 8 a 9, en donde la herida es una herida abierta.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 4 a 6 y 8 a 9, en donde la herida es una herida cerrada.
- 40 13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la herida es una herida aguda o una crónica.
- 45 14. Un dispositivo médico que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 y 8 a 9.
15. El dispositivo médico de acuerdo con la reivindicación 14, que está en forma de un vendaje, gasa, apósitos para herida o llagas, parche dérmico, o cinta adhesiva.

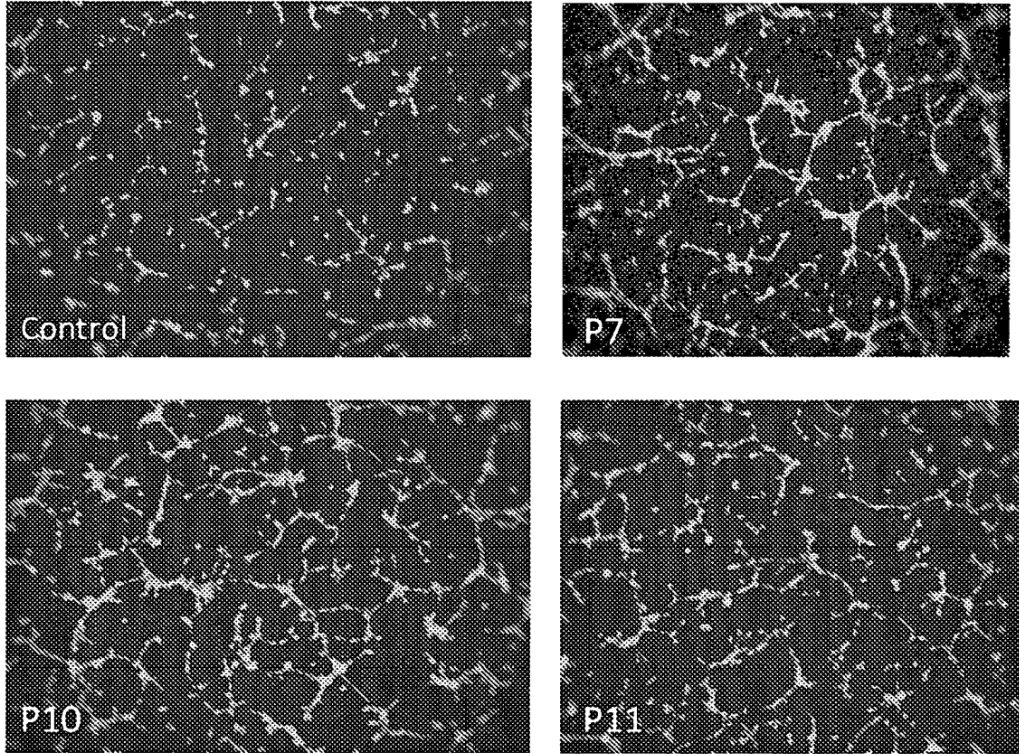


Figura 1

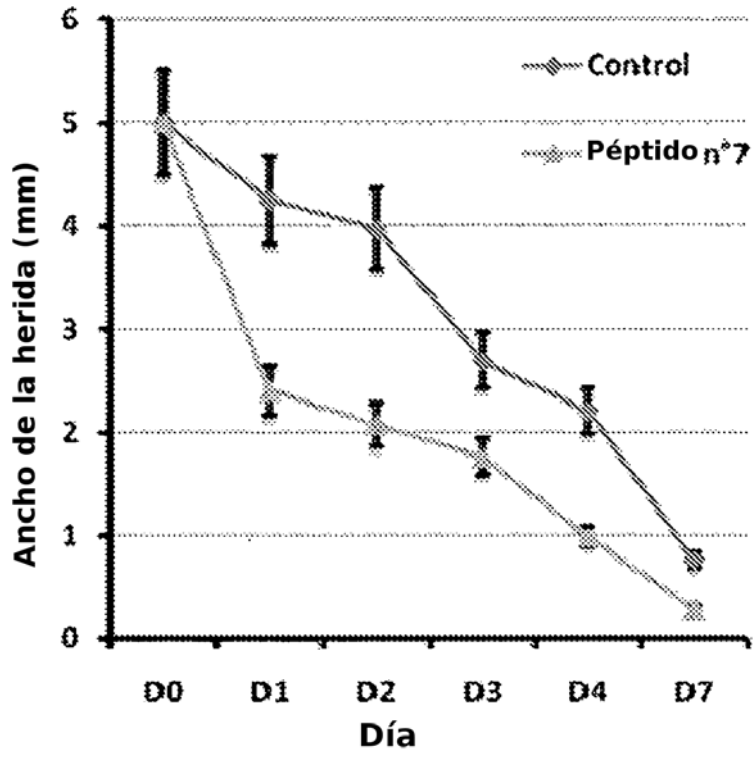


Figura 2

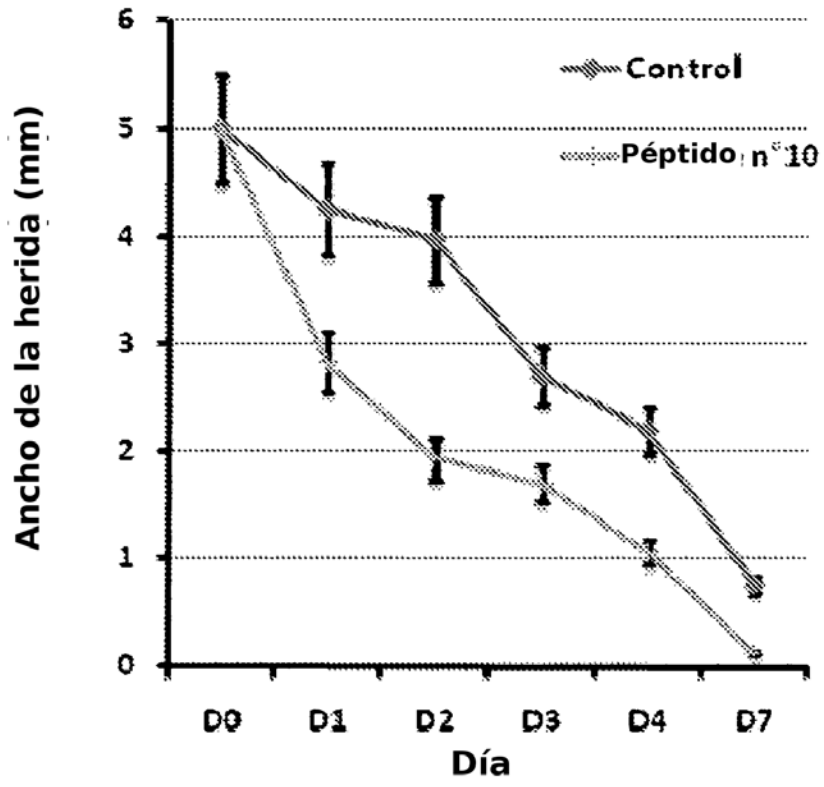


Figura 3

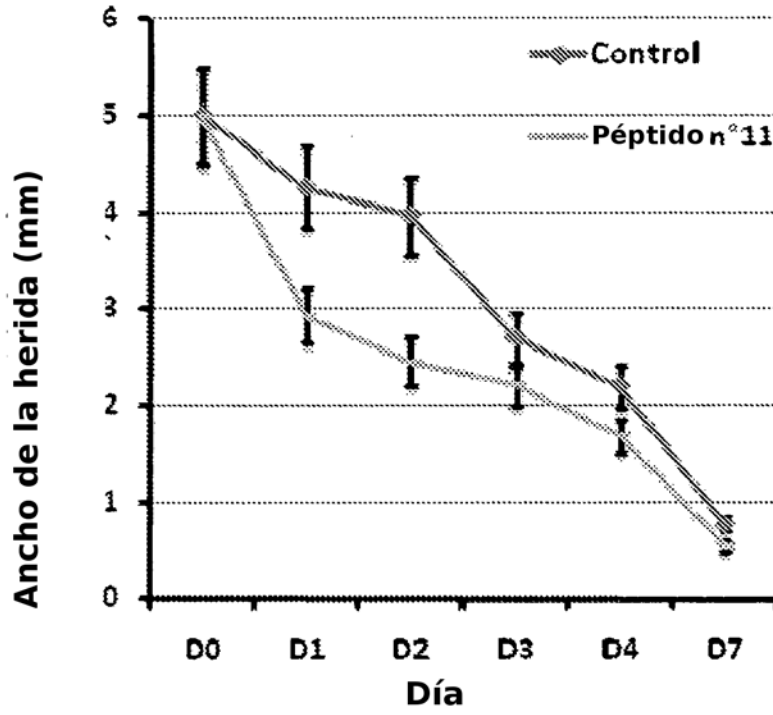


Figura 4

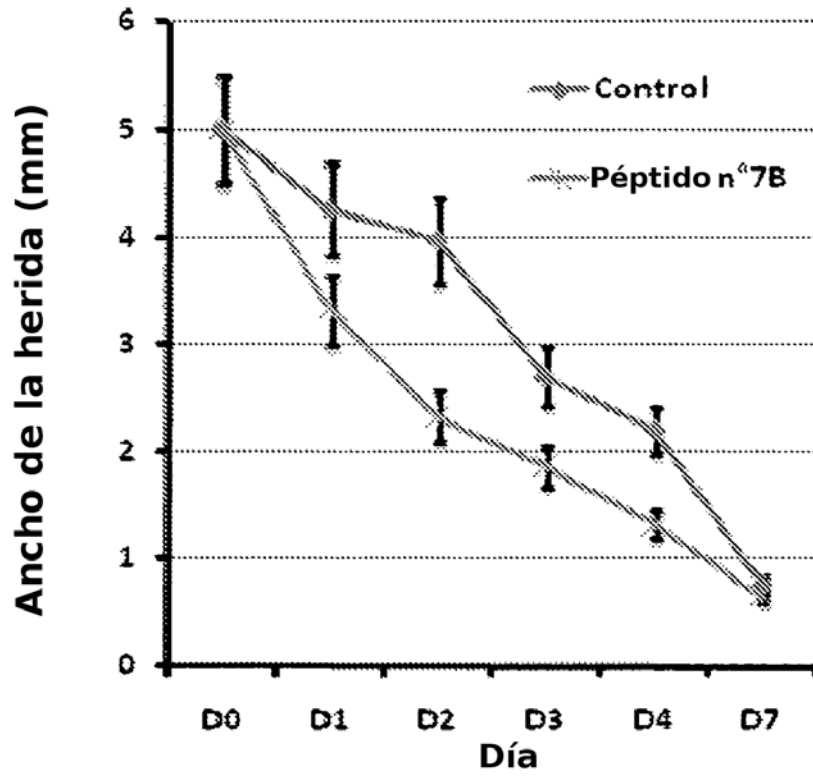


Figura 5

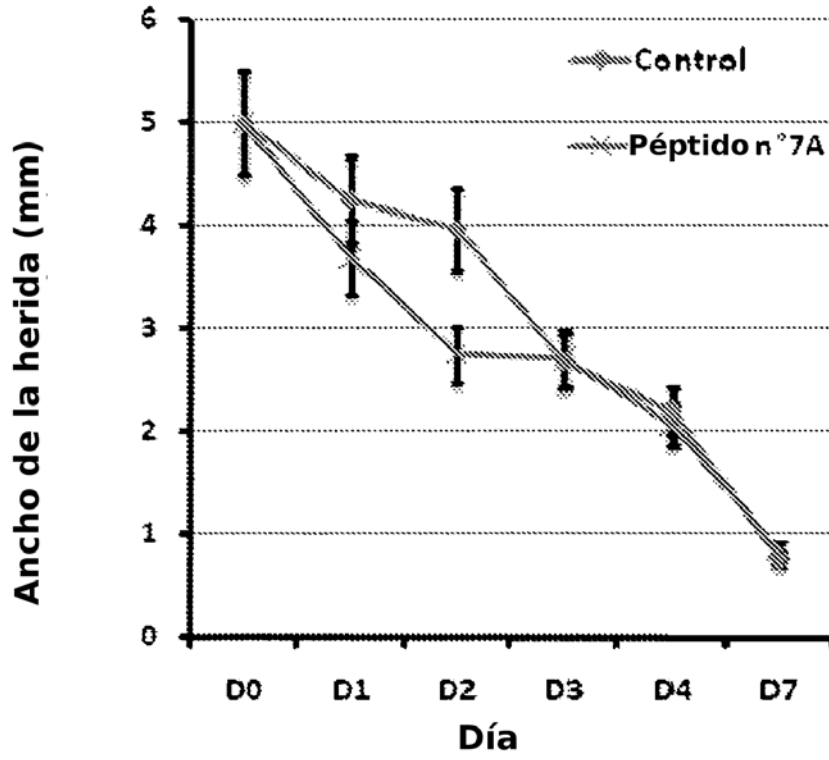


Figura 6

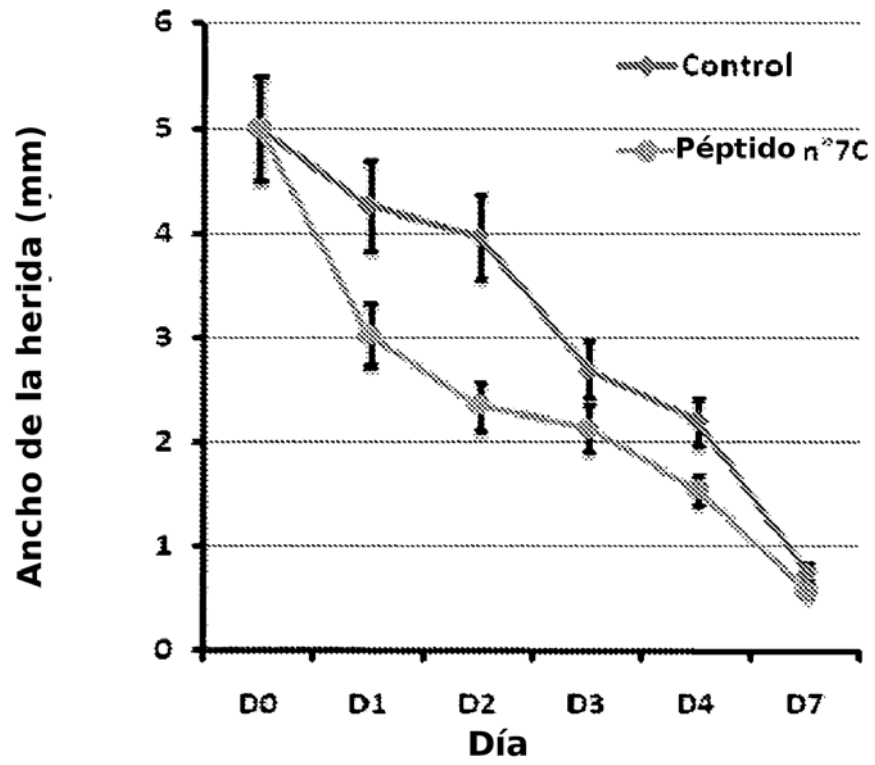


Figura 7

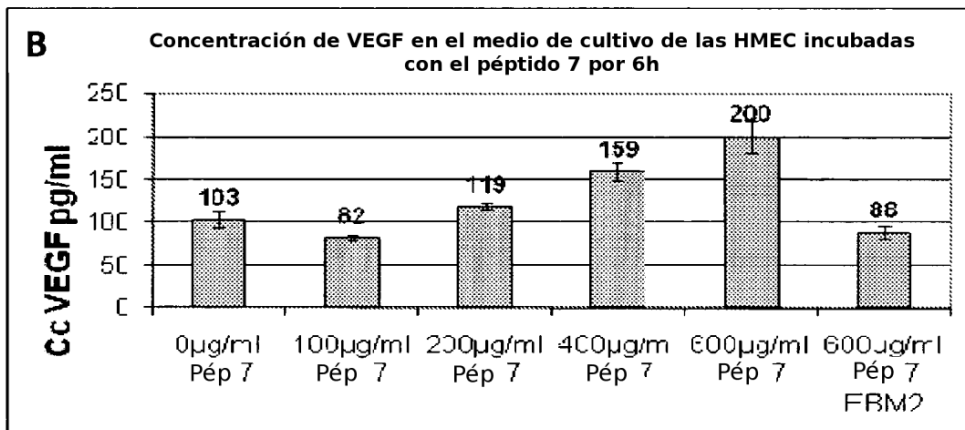
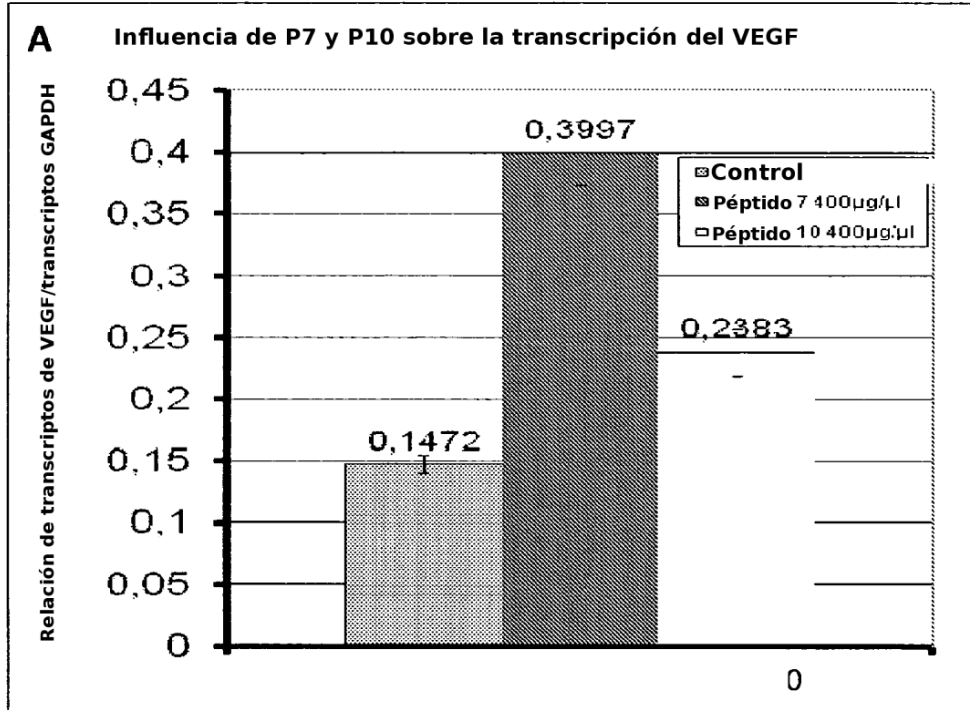


Figura 8

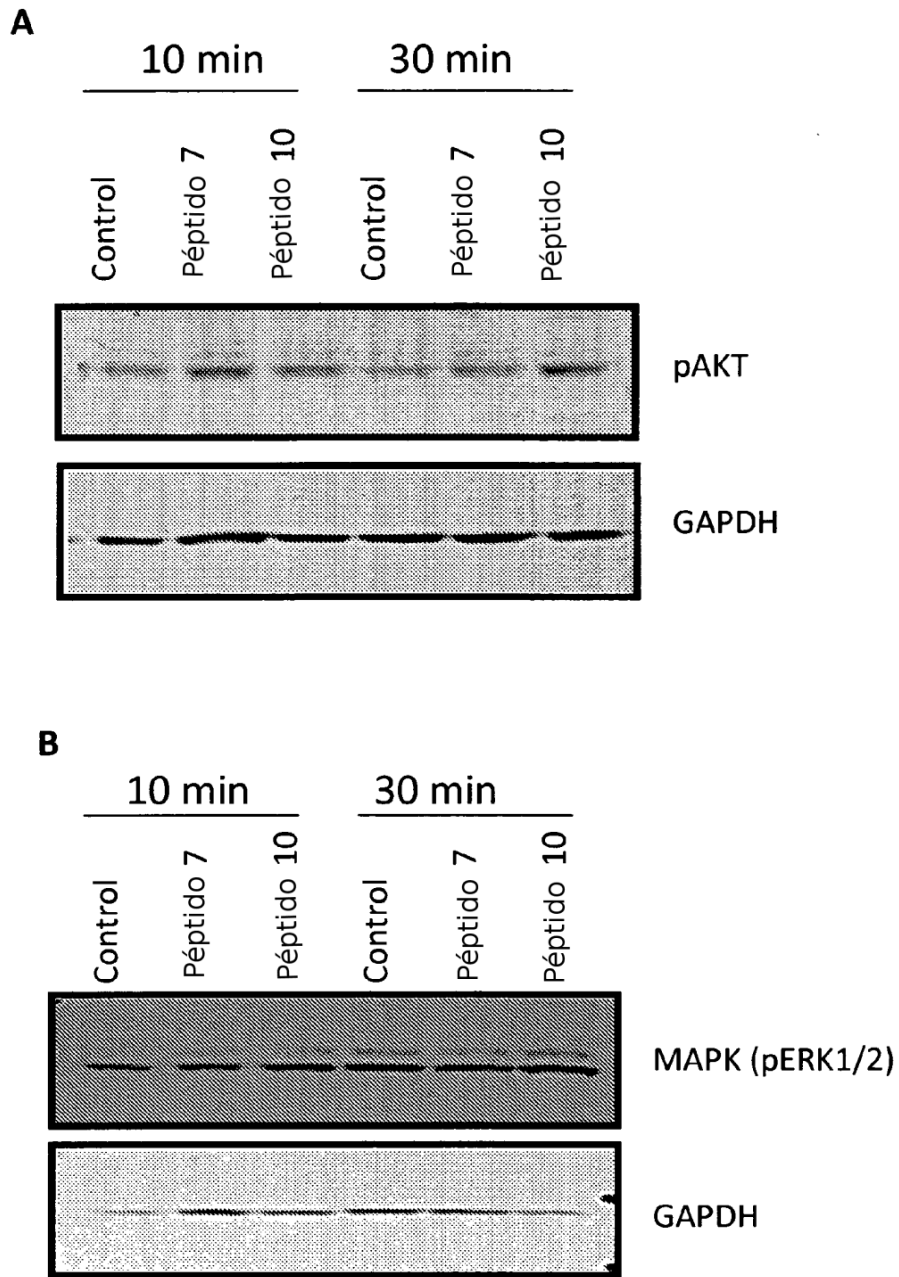


Figura 9