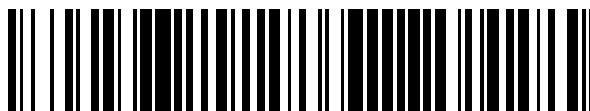


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 407**

51 Int. Cl.:

A61P 17/02 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61F 13/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2008 E 08101225 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1955705**

54 Título: **Agente y composición para la curación de heridas**

30 Prioridad:

09.02.2007 US 704313

09.02.2007 EP 07290164

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

02.09.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 421 407 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

Agente y composición para la curación de heridas.

5 La presente invención se relaciona con la curación de heridas agudas. Particularmente, la presente invención se relaciona con un agente para la curación de heridas, composiciones que contienen dicho agente para la curación de heridas, y dispositivos médicos que lo contienen.

10 La curación de heridas en los tejidos es un proceso de reparación complejo. Por ejemplo, los procesos para la curación de heridas de la piel involucran el reclutamiento de una variedad de células especializadas en el sitio de la herida, matriz extracelular y deposición de la membrana base, angiogénesis, actividad selectiva de la proteasa y re-epitelialización.

15 Siempre hay una necesidad de proporcionar sustancias que promueven la curación de heridas. A menudo es deseable aumentar la velocidad de curación en el caso de las heridas agudas y heridas crónicas, o para la curación de individuos generalmente comprometidos (por ejemplo, los ancianos). Las heridas pueden influir gravemente en la calidad de vida o incluso dar lugar a la muerte y por lo tanto a menudo es necesario aumentar la velocidad de curación tanto como sea clínicamente posible.

20 Un número de agentes y composiciones para la curación de heridas ya existe en el mercado, pero ninguno es completamente satisfactorio. Sin embargo, todavía es un asunto importante proporcionar agentes y composiciones alternativos para la curación de heridas, que resulten en una reparación de heridas eficaz, rápida y estéticamente aceptable.

25 La WO 03/074073, a nombre del solicitante, describe una familia de 54 genes involucrados en la regulación de la angiogénesis. Entre estos genes, el "gen 156" (sec. con núm. de ident.1 en esta descripción), que codifica la "proteína 156A" (sec. con núm. de ident.2 en esta descripción), y llamado además Angiodensina en WO 03/074073, se describe como pro-angiogénico. La proteína 156A comprende 217 aminoácidos, y tiene una señal de secuencia mitocondrial, detectada por experimentos *in silico*. La proteína 156A no contiene ningún dominio transmembrana ni dominio conservado. WO 03/074073 describe que la expresión de un antisentido del gen 156, es decir, la inhibición del gen 156, en células endoteliales humanas inhibe la formación de tubos capilares. WO 03/074073 prevé, además, una actividad pro-angiogénesis potencial para los genes 156 y la proteína 156a.

35 Profundizando en sus investigaciones, los inventores sorprendentemente encontraron que proteínas 156A mostraron una fuerte actividad de curación de heridas *in vitro* e *in vivo*. WO 03/074073 mencionó solamente la actividad pro-angiogénica potencial *in vitro* para la proteína 156A, y los inventores por lo tanto no tenían idea acerca del posible comportamiento de la proteína 156a en la curación de heridas *in vivo*.

40 Los inventores por lo tanto se sorprendieron realmente al notar la fuerte eficiencia de la proteína 156A en la reparación de las heridas.

Adicionalmente, los inventores encontraron que la proteína 156A fue además particularmente activa en el aspecto estético final de la cicatriz, la que pareció más regular y menos coloreada.

45 La presente invención se relaciona así, en un primer aspecto, con Una composición para tratar heridas para usar en el tratamiento de heridas agudas que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2.

50 El término "polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2" significa cualquier polipéptido que tiene 70%, con mayor preferencia 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2 y que presenta una actividad de curación de heridas. Esto además incluye los fragmentos de la proteína 156A que tienen una actividad de curación de heridas.

55 El término "herida" como se usa en la presente se refiere a, pero no se limita a:

- lesiones a la epidermis y/o dermis de la piel,
- heridas que resultan del daño, lesión o trauma a un tejido u órgano interno o externo tal como, por ejemplo,
- 60 los ojos, mucosa, pulmón, riñón, corazón, intestino, tendones o hígado,
- lesiones o daños a los tejidos vasculares, tales como, por ejemplo, venas, vénulas, arterias y capilares.

En esta descripción, el término "tratamiento de heridas" se usa para describir todas las diferentes etapas involucradas en la curación de heridas. Este incluye, por lo tanto, las etapas de formar un coágulo que tapa el defecto, la invasión del coágulo por las células inflamatorias y luego de fibroblastos y capilares para formar un tejido

de granulación contráctil que atrae a los márgenes de la herida juntos, y la migración hacia adelante de los bordes epidérmicos cortados para cubrir la superficie de la herida desnuda. El término "tratamiento de heridas" no se limita a la curación de la piel, sino que también incluye la reparación de los tejidos de otros tipos de heridas, como se indicó anteriormente.

5 En un segundo aspecto, la presente invención además se relaciona con tal composición para el uso en el tratamiento de una herida aguda que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:2.

10 Por el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que permite alcanzar el fin médico contemplado, es decir la curación de una herida, sin producir síntomas tóxicos inaceptables. Dicha "cantidad terapéuticamente eficaz" variará con los factores tales como la afección particular que se trata, la condición física de los pacientes y la duración del tratamiento.

15 La presente invención se además relaciona, un tercer aspecto, con Una composición para tratar heridas para usar en el tratamiento de heridas agudas que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2 en asociación con un excipiente adecuado para el tratamiento de heridas.

20 En una modalidad particular, las endotoxinas se eliminan de la composición que contiene el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2.

25 Una de las principales ventajas del agente de tratamiento de heridas y de la composición de tratamiento de heridas de acuerdo con la invención es aumentar la velocidad de curación y el retorno del tejido lesionado histológicamente muy cercano al tejido nativo.

30 Además, los inventores señalaron que la composición de tratamiento de heridas de acuerdo con la invención es particularmente activa en la estimulación de la migración de células endoteliales *in vitro*. La proteína 156A además parece jugar un papel global en la curación de heridas, sin limitarse a una simple estimulación de la angiogénesis a sino a una amplia estimulación del proceso de reparación de la herida, que comprende la regeneración de las células en la dermis y la epidermis.

35 La presente invención además se relaciona con una composición para el tratamiento de heridas que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2 para el uso en un método de tratamiento de heridas del cuerpo humano o animal.

40 En una modalidad particular, las composiciones para el tratamiento de heridas como las descritas anteriormente, comprenden al menos dos sustancias activas, una de las cuales es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2. En otra modalidad, una sustancia activa adicional es una sustancia activa hemostática, un factor de crecimiento, una sustancia anti-infecciosa, una sustancia analgésica, una sustancia antiinflamatoria, o un combinación de estas.

45 En aún otra modalidad, la composición para el tratamiento de heridas de acuerdo con la invención está en una forma adecuada para una administración tópica, sistémica, oral, subcutánea, transdérmica, intramuscular o intra-peritoneal.

50 Una forma adecuada para la administración tópica comprende líquido, ungüento, crema, gel, hidrogel, cataplasma, pomada, linimento, leche, loción, emulsión, atomizador, aerosol, colirio gotas, polvo.

55 Una forma adecuada para la administración sistémica comprende una solución inyectable y supositorio.

Una forma adecuada para la administración oral comprende un jarabe, tabletas, cápsulas, píldoras, suspensión que se puede tomar.

60 De acuerdo con la invención, en la composición para el tratamiento de heridas como la descrita anteriormente, dicho polipéptido está presente en una cantidad de 0.01 a 90% en peso, preferentemente de 0.1% a 10% en peso, con mayor preferencia de 1% a 5% en peso.

65 En una modalidad particular, la composición de la invención está en forma líquida, y el polipéptido activo está presente en una cantidad de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml, preferentemente de 0.1 mg/ml a 1 mg/ml, con mayor preferencia aproximadamente 0.5 mg/ml.

Una "composición" en el sentido de la invención abarca las composiciones farmacéuticas, incluyendo las dermatológicas, y composiciones cosméticas.

5 El término "excipiente adecuado" incluye materias primas conocidas tales como aceites animales y vegetales, aceites minerales, aceites sintéticos, aceites de ésteres, ceras, alcoholes lineales superiores, ácidos grasos, agentes tensioactivos, fosfolípidos, agentes gelificantes y/o espesantes, alcohol, polioles (que incluyen glicerina y propilenglicol), rellenos tales como arcillas minerales, polvos soft-focus, conservantes, fragancias, pigmentos y agua purificada. Este término también incluye los polisacáridos, tales como, por ejemplo, mananos, gluco mananos, galactomananos, fucomananos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, quitinas, quitomananos. Se menciona además por el solicitante que la presente invención no se limita a los excipientes enumerados anteriormente. La persona experta en la materia es capaz de seleccionar los mejores excipientes adecuados para una forma particular de administración.

15 En un cuarto aspecto, la presente invención se relaciona además con un dispositivo médico para el tratamiento de heridas para el uso en el tratamiento de heridas agudas que comprende una composición para el tratamiento de heridas como la descrita anteriormente.

20 En una modalidad preferida, el dispositivo médico es en la forma de un apósito, vendaje, dispositivo médico transdérmico, dispositivo médico de liberación controlada de fármacos, o una endoprótesis eluyente de fármacos.

Los apósitos adecuados en el sentido de la invención son, sin ninguna limitación, apósitos hidrocoloides, apósitos hidrocelulares, apósitos de alginato, apósitos de hidrogel, apósitos a base de quitosana, apósitos de derivados de celulosa y cualquier otro tipo de apósito dedicado a la protección y reparación de la herida.

25 Por "dispositivo médico transdérmico" se entiende un dispositivo para la liberación lenta a través del proceso transdérmico de una sustancia, tal como, por ejemplo, un parche adhesivo.

30 Por "endoprótesis liberadora de fármacos", también llamada "revestido" o endoprótesis "medicada", se entiende una endoprótesis que ha sido recubierta con la sustancia activa "proteína 156A".

La invención se relaciona con el uso de una composición para el tratamiento de heridas, o de un dispositivo médico para el tratamiento de heridas como los descritos anteriormente, para el tratamiento de heridas agudas.

35 La invención se relaciona además con el uso de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, en la fabricación de una composición farmacéutica, para el tratamiento de heridas agudas.

40 Básicamente, las heridas agudas 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, hematomas, lesiones por aplastamiento causadas por una cantidad grande o extrema de fuerza aplicada por un largo período de tiempo.

50 Otro tipo de heridas son las heridas crónicas. 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, mas 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.

55 Fig. 1A y 1B: Imágenes de capas células endoteliales HUVEC después de un ensayo de la herida *in vitro*. Después de la herida, las células se incubaron con VEGF y FGF2 (1A) o con VEGF, FGF2 y proteína 156A (1B).

Fig. 2A: Imágenes de heridas realizadas en ratones desnudos.

Fig. 2B: Imágenes de heridas realizadas en ratones desnudos 48 horas posteriores a la aplicación tópica de la solución vehículo.

60 Fig. 2C: Imágenes de heridas realizadas en ratones desnudos 48 horas posteriores a la aplicación tópica de la proteína 156A.

Fig. 3A: Imágenes de 4 ratones lesionados 96 horas posteriores a la aplicación del vehículo.

Fig. 3B: Imágenes de 4 ratones lesionados 96 horas posteriores a la aplicación de la proteína 156A.

Fig. 4: Imagen de dos heridas paralelas transdérmicas realizado en la parte trasera de un cerdo de granja.

Fig. 5: Imagen de las dos heridas paralelas transdérmicas pocas horas después de la aplicación de la solución vehículo ("C" para CONTROL) o proteína 156A ("P" para PRUEBA).

5 Fig. 6: Imagen de las dos heridas paralelas transdérmicas 3 semanas después de la aplicación de la solución vehículo ("C" para CONTROL) o proteína 156A ("P" para PRUEBA).

Fig. 7A: Imagen de una sección de una herida cosechada 5 días después de la aplicación de una solución vehículo.

Fig. 7B: Imagen de una sección de una herida cosechada 5 días después de la aplicación de la proteína 156A.

10 **Ejemplo 1: Producción de la proteína recombinante 156A**

La proteína 156A es una proteína recombinante que corresponde con la proteína entera codificada por el gen 156. La proteína 156A se expresó en *Escherichia coli* B121(DE3)pLys, se extrajo a partir de células bacterianas con 8M urea y se purificó en columnas quelantes de ion metálico (Ni) usando cromatografía en líquido. La pureza de la proteína 156A recombinante purificada se controló por SDS-PAGE y mostró estar por encima de 65%. Antes del uso, las endotoxinas se eliminaron de la solución que contenía la proteína purificada 156A usando columnas Endo-Trap (Pharmacia) y se probaron. La proteína 156A recombinante libre de endotoxina purificada se conservó en una solución tampón Tris-HCl a pH 7.5 conteniendo 2M urea, 150mM NaCl y 0.1 mM CaCl₂.

20 **Ejemplo 2: Estimulación de la migración de células endoteliales por la proteína 156A *in vitro***

La migración de células se probó por el ensayo de la herida descrito por Sato and Rifkin (J Cell Biol. 1988;107:1199) con algunas modificaciones. Las HUVEC cultivadas en un medio de crecimiento EGM-2MV (Cambrex) se sembraron en placas de 24 pocillos a 80 000 células por pocillo en 500µl del medio de crecimiento y se cultivaron hasta la confluencia a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂. Las células se desecharon con una punta de plástico en una sola línea. Después de la herida, el medio de cultivo se cambió por medio fresco suplementado con 500nM (15µg.ml⁻¹) de proteína 156A (Prueba, **Fig 1B**) o no (Control, **Fig 1A**). Después de 18 horas de cultivo, las células se observaron y fotografiaron bajo microscopio invertido (Analysis, Olympus, Rungis, Francia).

30 **[0040]** La Figura 1A muestra que, 18 horas posteriores a la incubación, la herida está todavía presente bajo la condición de control (medio de crecimiento solamente).

[0041] La Figura 1B muestra que, 18 horas posteriores a la incubación, la herida está completamente curada bajo la condición de prueba (medio de crecimiento + proteína 156A).

35 **[0042]** Ya que la migración de las células endoteliales es una de las características críticas de la neo-vascularización y reparación de heridas, la proteína 156A es así un líder terapéutico potencial para la curación de heridas.

40 **Ejemplo 3: Experimento piloto de la actividad curativa de la proteína 156A en ratones Suizos *desnudos in vivo***

[0043] Dos animales se anestesiaron por inyección IP de ketamina-xilazina (80mg/kg - 12 mg/kg; Ref. K-113, Sigma, Francia) y después se lesionaron trans-dérmicamente (1cm de longitud y aproximadamente 1 a 2 mm de profundidad, ver **Fig. 2A**) en el flanco derecho de cada ratón usando vejigas de 0.5/10. 200µl de la solución vehículo (Tris-HCl pH 7.5, 2M Urea, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂) o la solución de prueba (Vehículo + 0.5mg.ml⁻¹ proteína 156A) se aplicó después en forma tópica sobre la herida de los animales 10 min posteriores a la lesión.

50 **[0044]** El examen de curación de heridas a las 48 horas posteriores a la aplicación tópica mostró que la herida tratada con la proteína 156A (ver **Fig. 2C**) se curó completamente mientras que la herida tratada con el vehículo (ver **Fig. 2B**) no se había curado aún y se mantuvo abierta.

Ejemplo 4: Prueba de la actividad curativa de la proteína 156A en ratones Suizos *desnudos in vivo*

55 **[0045]** Ocho ratones Suizos *desnudos* hembra saludables se anestesiaron como en el Ejemplo 3. Dos heridas trans-dérmicas, cada una de 1 cm de longitud y aproximadamente 1 a 2 mm de profundidad se realizaron en el flanco derecho de cada ratón usando vejigas 0.5/10.

60 **[0046]**En el D1, y 10 min posteriores a la lesión de los animales, los 8 ratones fueron seleccionados al azar dentro

de 2 grupos de 4 animales cada uno. Todos los tratamientos se realizaron por aplicación tópica. El programa de tratamientos se resume en la Tabla 1.

Tabla 1

Grupo	No. Animales	Tratamiento	Dosis del tratamiento
1	4	Vehículo	0
2	4	Proteína 156A	0.5mg.ml ⁻¹

5 Ratones del Grupo 1 se trataron con 200µl de la solución vehículo (Tris-HCl pH 7.5, 2M Urea, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂) aplicada en forma tópica en cada herida 10 minutos después de la herida.

10 Ratones del Grupo 2 se trataron con 200µl de la solución de prueba (Tris-HCl pH 7.5, 2M Urea, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.5mg.ml⁻¹ proteína 156A) aplicada en forma tópica en cada herida 10 minutos después de la herida.

Las imágenes de las heridas se tomaron 96 horas después del tratamiento con el vehículo o la solución de prueba:

15 Fig.3A: Imágenes de los ratones del Grupo 1 96 horas posteriores a la aplicación del vehículo.
Fig.3B: Imágenes de los ratones del Grupo 2 96 horas posteriores a la aplicación de la proteína 156A.

20 Como ilustrado por las imágenes de la Fig. 3, el examen de curación de heridas a 96 horas posteriores a la aplicación tópica mostró que las heridas tratadas con la Proteína 156A se curó completamente (Grupo 2, Fig.3B) mientras que las heridas tratadas con el vehículo (Grupo 1, Fig.3A) no se curaron aún y se mantuvieron abiertas.

Ejemplo 5: Prueba de la actividad curativa de la proteína 156A en un modelo porcino in vivo

Actividad de curación de heridas de la piel

25 Un cerdo de granja se anestesió mediante inyección IM de ketamina/azaperona (10 mg/kg - 2 mg/kg IM) y después se realizaron dos heridas trans-dérmicas longitudinales paralelas todo el trayecto hasta la hipodermis (**Fig. 4**).

30 5 ml de la solución vehículo (Tris-HCl pH 7.5, 2M Urea, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, lado CONTROL "C") o la solución de prueba (Vehículo + 0.5mg.ml⁻¹ proteína 156A, lado de PRUEBA "P") se aplicó después en forma tópica sobre la herida de los animales 10 min posteriores a la lesión.

35 La observación de las dos heridas mostró una diferencia marcada en el período postoperatorio inmediato. Pocas horas después de la cirugía apareció una costra en el lado de PRUEBA "P" (**Fig. 5**). La última costra permaneció en el lugar durante dos semanas y luego se frotó. La curación debajo de la costra pareció normal según la apariencia macroscópica de la herida. Después de 3 semanas, la herida estaba lisa/uniforme y delgada (**Fig. 6**). La costra en el Lado CONTROL "C" se desarrolló sólo después de dos días. Los aspectos generales de la herida CONTROL fue menos uniforme y de acabado más grueso y más contraído.

Actividad de curación de heridas de la córnea

Un cerdo de granja se anestesió mediante inyección IM de ketamina/azaperona (10 mg/kg, 2 mg/kg IM) y después se realizaron escarificaciones corneales superficiales.

5 1 ml de la solución vehículo (Tris-HCl pH 7.5, 2M Urea, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, lado CONTROL) o la solución de prueba (Vehículo + 0.5mg.ml⁻¹ proteína 156A, lado de PRUEBA) se aplicó después en forma tópica sobre las escarificaciones 10 min posteriores a la lesión.

10 El día 2 el animal se sacrificó y los tejidos se cosecharon.

Se observó edema del proceso ciliar en las zonas tratadas y no tratadas. Sin embargo, aunque el epitelio corneal no ulcerado fue separado lateralmente por el edema intenso en la zona no tratada, este edema estaba prácticamente ausente en la zona tratada.

15 Ejemplo 6: Análisis histológico de las heridas cutáneas tratadas y no tratadas

Un cerdo de granja se anestesió mediante inyección IM de ketamina/azaperona (10 mg/kg, 2 mg/kg IM) y después se realizaron dos heridas trans-dérmicas longitudinales paralelas todo el trayecto hasta la hipodermis.

20 5 ml de la solución vehículo (Tris-HCl pH 7.5, 2M Urea, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, lado CONTROL) o la solución de prueba (Vehículo + 0.5mg.ml⁻¹ proteína 156A, lado de PRUEBA) se aplicó después en forma tópica sobre la herida de los animales 10 min posteriores a la lesión.

25 El día 5 el animal se sacrificó y las áreas de la herida CONTROL y la herida de PRUEBA se cosecharon. Bloques embebidos en parafina fijados en formalina se procesaron y secciones seriadas de cinco micras de las áreas cosechadas se prepararon por teñido HES convencional.

30 En el animal no tratado (**Fig. 7A**), los resultados mostraron que el Día 5 posterior a la lesión, la herida seguía traspasando hasta la subdermis profunda, mientras que en el grupo tratado (**fig. 7B**), la aproximación de los bordes concierne a todas las capas de la piel (dermis y epidermis).

35 Estas diferentes pruebas mostraron que hubo una fuerte diferencia entre las heridas tratadas y las heridas control. La curación de las heridas de prueba (tratadas con la proteína 156A) fue siempre más rápida, más delgada y más uniforme y completa. El aspecto estético final de la herida también fue mejor. La molécula mostró adicionalmente una fuerte actividad en el modelo experimental de úlcera corneal.

Listado de Secuencia

40 <110> GENE SIGNAL INTERNATIONAL

<120> Agente y composición de curación de heridas

<130> BEP

45 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

50 <211> 2153

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 421 407 T3

<400> 1
 caaagagaca aacctgatg aagccgctaa tgacaatag gcagttcgcc ccaaagagcg 60
 cagcagcctg agctctagac agcatccggt tgtaaggagc agtgtgatag tgcgctcaca 120
 gaccttttct ccaggagagc ggaaccagta catctgcagg ttaaactcga gtgacagtga 180
 cagttcaacc ctggctaaaa aactcactgtt tgtgagaaac tccaccgaac gccgcagttt 240
 gagggccaag aggacgggtt gccagtcagt ccttagaaga acaacacagg aatgccagct 300
 gcggacatct ctgaccttag aactggacct tcaggcatct ctgaccggc agagccgct 360
 caatgatgag ctgcaggcgc tgagggactt gcggcagaag ctggaggaaac tgaaagctca 420
 gggagagact gaccttccac caggcgtgct ggaggatgag aggttccaga ggcttctgaa 480
 gcaagctgag aagcaggctg aacagtccaa agaagagcag aagcaaggct tgaatgcaga 540
 gaagtgatg aggcaagtct ccaaggacgt gtgtcggctc cgggagcaga gccagaaggt 600
 gcctcggcag gtgcagtcct tcagggagaa gattgcctac ttcaccagag caaagataag 660
 catccatcc ctgccagctg atgatgtgtg attacatgac ttaagaaatt atttttcat 720
 ctgttcactt tcttagggag ggtaaaagac tgaagatttg tgtttttgtt ttgggtttg 780
 gtttttttg gtaacgtaac tgtcaactct tgaagaactt ttatttcaca tcagattttc 840
 aacacattaa tttgtaaagt accttgagtg taatttttat atgcttaaaa aagaaaaaat 900
 catataagaa agatgggata acctggtaca caaatgttgcc cagtatgtg cgcattgcc 960
 gtggacttca ttttgtaaaa atggaataga ggcagtacc caccatgtgt actgttgagc 1020
 cggctgttga gaaacaactt ggttcagccg gtggttttgc ttctcctttg tgttcctgtg 1080
 agtaggctgt gccgatggca gcagcgccac gtggtatctg tgcgctggcg aggagaggag 1140
 cgctttccat ttggaggcag tgtgagcaca cgctggagtg cagcgttcca aagtccgcc 1200
 gaaatggatg ctgcgtccac ggccatcacc tgtgctggaa cacctggttt ccttaagaca 1260
 atttcctttt tgtcctttta tatttttcta aagaaaacta agatataaac tacciaagtgc 1320
 tcttaagaat aaaaataaga ataagaatac aaaggagcac tactcttggc tacacgaaag 1380
 atcttgggat tcatgacact gagggcaggg agaagaaaga acaccagcca cgcagagata 1440
 caaataagct catcaaatga gcagctggtt tgtctcactc agcctgaatt tgcattaagt 1500
 gttcaaaagt gagtttctg cttgcactag tgttttccc taaatctaag gatggtgcct 1560
 agtggtgccc ctgtgttctg aggacagaga gagctggagg ggtggaggga aatgcatcgg 1620
 cactcatttg gtgtaaccaa gaagaggggg aaagatgtct tgatagaatc aaagttgcc 1680
 aaaacaaaga agagtttatc aagcagattt ctaacattta gtagaaacta cttcatagct 1740
 ctcatttta gggggttcta tctataattt atggtaaata gttgggaggc aaaggaaga 1800
 atgtgtgtgg ggtattatt aatttgaagt ataagctaaa ttgtttatta aaaagcctat 1860
 tttggatgaa caagtttaga gagataaact gactaatgtg tcctccagtt tagaatttca 1920
 ccttaccgga cccaggcact tcttaaaaac acagatcctc agtgcagctc tgccagcatc 1980
 aaggctttta aatatgtag tatttaggcc atttaacca tacttattac tcaataacc 2040
 aagaaacaat tttgggttag ccatctaata tagcaataa aatagatttt ttaaagaat 2100
 ccaaaattgt cttaaaggaa tggaccctt gaagaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 2153

5 <210> 2
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 421 407 T3

<400> 2

Met Ala Val Arg Pro Lys Glu Arg Ser Ser Leu Ser Ser Arg Gln His
 1 5 10 15

Pro Phe Val Arg Ser Ser Val Ile Val Arg Ser Gln Thr Phe Ser Pro
 20 25 30

Gly Glu Arg Asn Gln Tyr Ile Cys Arg Leu Asn Arg Ser Asp Ser Asp
 35 40 45

Ser Ser Thr Leu Ala Lys Lys Ser Leu Phe Val Arg Asn Ser Thr Glu
 50 55 60

Arg Arg Ser Leu Arg Val Lys Arg Thr Val Cys Gln Ser Val Leu Arg
 65 70 75 80

Arg Thr Thr Gln Glu Cys Pro Val Arg Thr Ser Leu Asp Leu Glu Leu
 85 90 95

Asp Leu Gln Ala Ser Leu Thr Arg Gln Ser Arg Leu Asn Asp Glu Leu
 100 105 110

Gln Ala Leu Arg Asp Leu Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Lys Ala Gln
 115 120 125

Gly Glu Thr Asp Leu Pro Pro Gly Val Leu Glu Asp Glu Arg Phe Gln
 130 135 140

Arg Leu Leu Lys Gln Ala Glu Lys Gln Ala Glu Gln Ser Lys Glu Glu
 145 150 155 160

Gln Lys Gln Gly Leu Asn Ala Glu Lys Leu Met Arg Gln Val Ser Lys
 165 170 175

Asp Val Cys Arg Leu Arg Glu Gln Ser Gln Lys Val Pro Arg Gln Val
 180 185 190

Gln Ser Phe Arg Glu Lys Ile Ala Tyr Phe Thr Arg Ala Lys Ile Ser
 195 200 205

Ile Pro Ser Leu Pro Ala Asp Asp Val
 210 215

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para tratar heridas para usar en el tratamiento de heridas agudas que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2 en asociación con cualquier excipiente adecuado.
- 10 2. Una composición para tratar heridas para usar en un método de tratamiento de heridas agudas del cuerpo humano o animal que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2.
- 15 3. Una composición para tratar heridas para usar de acuerdo con las reivindicaciones **1-2**, que comprende al menos dos sustancias activas, una de las cuales es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2.
- 20 4. Una composición para tratar heridas para usar de acuerdo con la reivindicación **3**, en donde una sustancia activa adicional es una sustancia activa hemostática, un factor de crecimiento, una sustancia anti-infecciosa, una sustancia analgésica, una sustancia antiinflamatoria, o una combinación de estas.
- 25 5. Una composición para tratar heridas para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones **1-4**, que están en forma adecuada para la administración tópica, sistémica, oral, subcutánea, transdérmica, intramuscular o intra-peritoneal .
- 30 6. La composición para tratar heridas para usar de acuerdo con la reivindicación **5**, en donde la forma adecuada para la administración tópica comprende crema, gel, cataplasma, pomada, linimento, leche, loción, emulsión, atomizador, colirio, gotas, polvo.
- 35 7. La composición para tratar heridas para usar de acuerdo con la reivindicación **5**, en donde la forma adecuada para la administración sistémica comprende solución inyectable y supositorio.
- 40 8. La composición para tratar heridas para usar de acuerdo con la reivindicación **5**, en donde la forma adecuada para la administración oral comprende suspensión bebible, jarabe, tabletas, cápsulas, píldora.
- 45 9. Una composición para tratar heridas para usar de acuerdo con las reivindicaciones **1-8**, en donde dicho polipéptido está presente en una cantidad de 0.01 a 90% en peso, preferentemente de 0.1% a 10% en peso, con mayor preferencia de 1% a 5% en peso.
- 50 10. Un dispositivo médico para tratar heridas para usar en el tratamiento de heridas agudas que comprende una composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones **1-9**.
- 55 11. Un dispositivo médico para tratar heridas para usar de acuerdo con la reivindicación **10**, que está en forma de un apósito, vendaje, dispositivo médico transdérmico, dispositivo médico de liberación controlada del fármaco, o una endoprótesis eluyente del fármaco.
12. Uso de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, o de un polipéptido que tiene al menos 70%, preferentemente 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, en la fabricación de una composición farmacéutica, para el tratamiento de heridas agudas.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación **12**, en donde las heridas agudas comprenden incisiones, laceraciones, abrasiones, heridas punzantes, heridas de penetración, contusiones, hematoma, lesiones por aplastamiento.

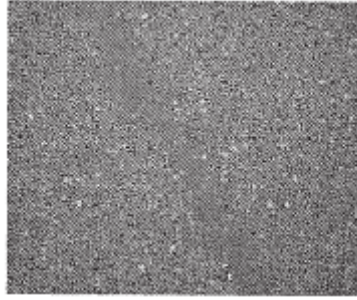


Figura 1A

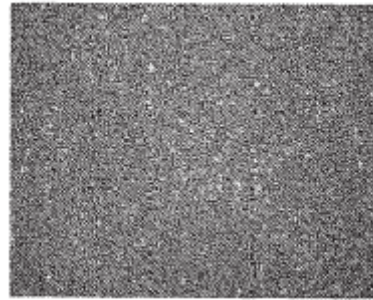


Figura 1B

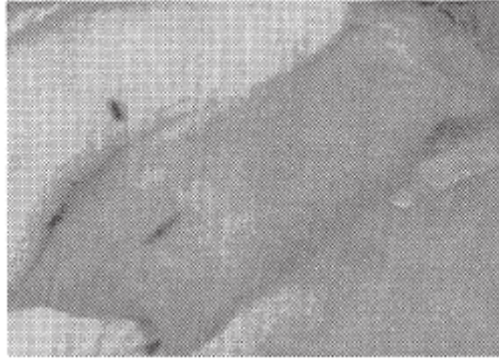


Figura 2A

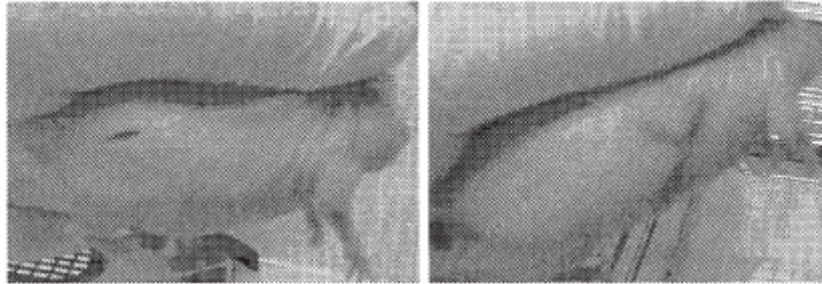


Figura 2B

Figura 2C

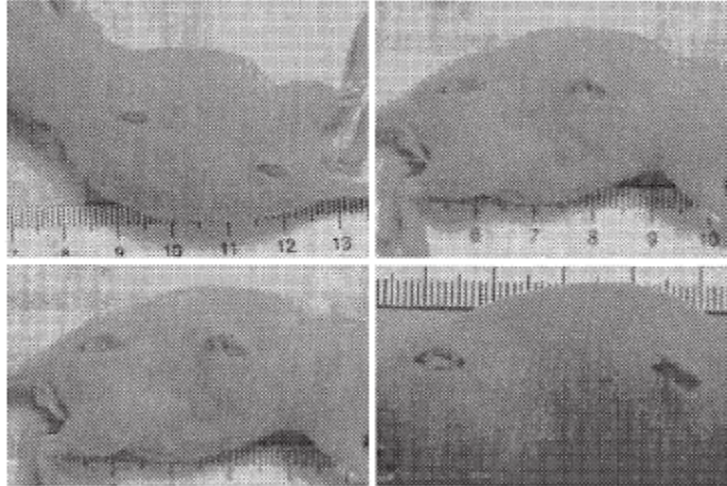


Figura 3A

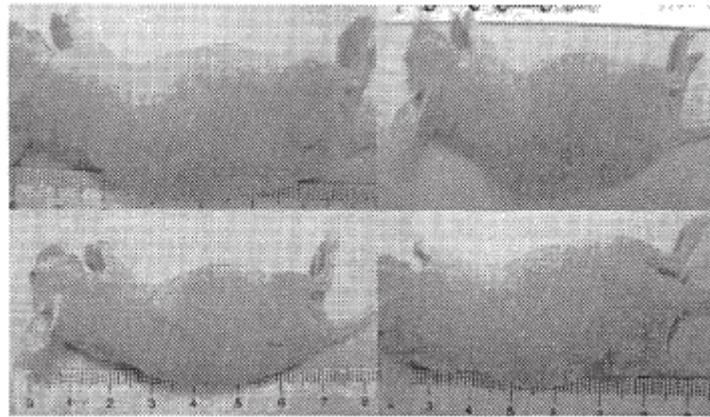


Figura 3B



Figura 4

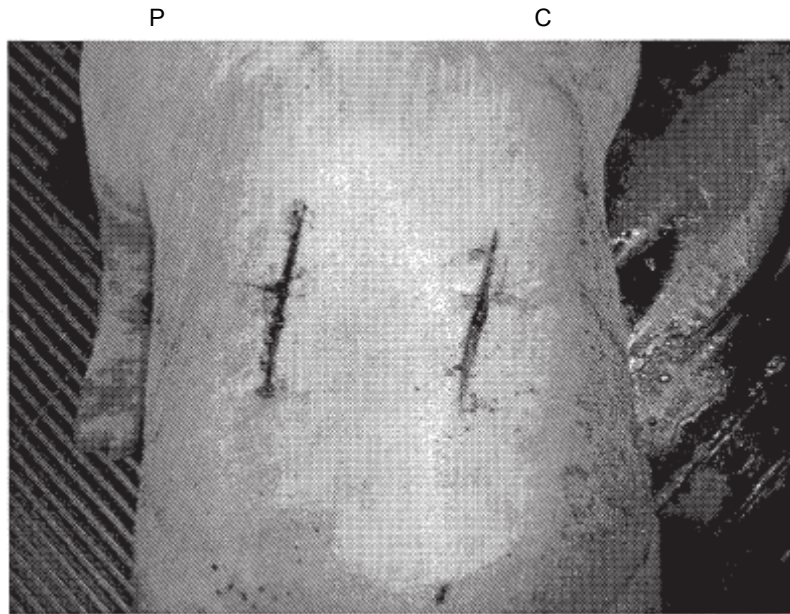


Figura 5

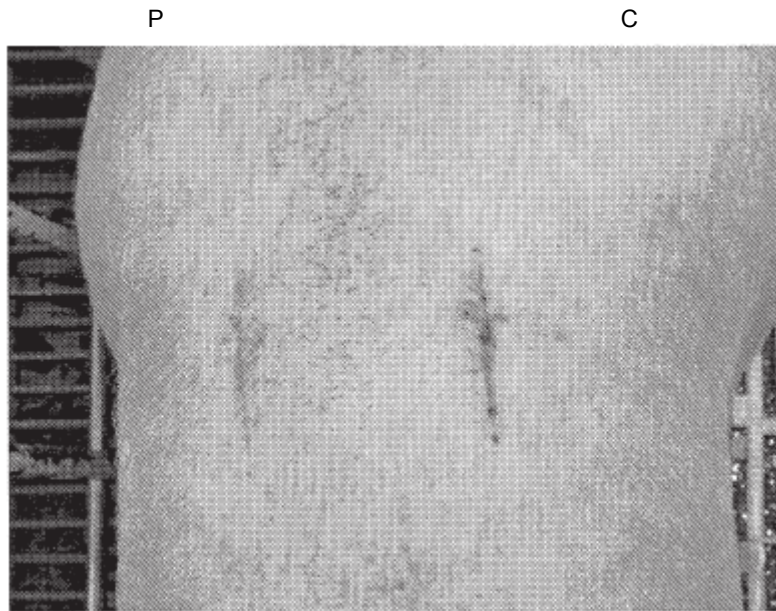


Figura 6

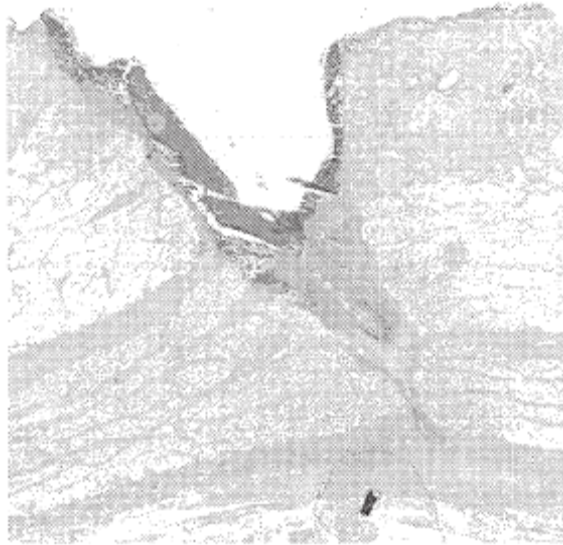


Figura 7A

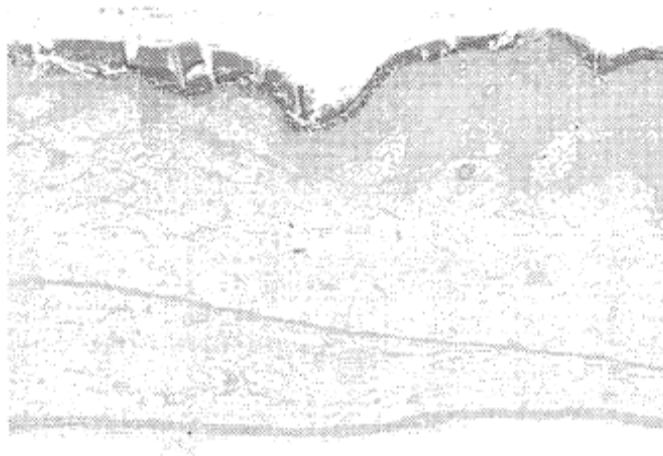


Figura 7B