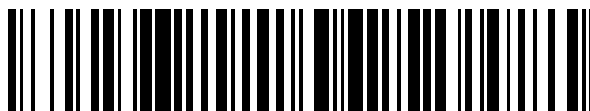


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 794**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008 E 08789795 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2178908**

54 Título: **Péptidos y composiciones farmacéuticas para tratar tejido conjuntivo**

30 Prioridad:

15.08.2007 US 935490 P

16.01.2008 US 6501 P

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

15.11.2013

73 Titular/es:

METAMOREFIX (100.0%)

12A HAMADA STREET

76703 REHOVOT, IL

72 Inventor/es:

DAHAN, MAZAL y

GORODETSKY, RAPHAEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 429 794 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 y composiciones farmacéuticas para tratar tejido conjuntivo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos y composiciones farmacéuticas para tratar tejido conjuntivo

5 Antecedentes de la invención

Las siguientes publicaciones de la técnica anterior se consideran relevantes para la comprensión de la invención. En el presente documento se hace referencia a las publicaciones por su número en la siguiente lista:

1. "Selectively cross linked Hyaluronic acid hydrogels for sustained release formulation for Erythropoietyn", K. Motokawa, S.K. Hahn, T. Nakamura, H. Miyamoto, T. Shimoboji, J. of Biomed. Mat. Res., part A, DOI 10,1002, pp 459-465, 2006.
2. "Controlled chemical modification of Hyaluronic acid: Synthesis, applications and biodegradations of hydrazide derivatives", G.D. Prestwich, D.M. Marecak, J.F. Marecek, K.P. Vercruysse, M.R. Ziebell, J. Cont. Rel., vol. 53, pp 93-103, 1998.
3. "Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: New biomaterials for drug delivery", Y. Lou, K. R. Kirker, G. D. Prestwich, J. Cont. Rel., vol. 69, pp 169-184, 2000.
4. "Sustained release formulation of erythropoietin using hyaluronic acid hydrogels cross-linked by Michael addition", S.K. Hahn, E.J. Oh, H. Miyamoto, T. Shimobouji, Int. J. of Pharm. 322, pp44-51, 2006.
5. "Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with Hyaluronic acid hydrogel films for tissue culture application", M.N. Collins, C. Birkinshaw, J. of Appl. Pol. Sci., Vol. 104, pp 3183-3191, 2007.
6. Patente de EE.UU. 6831172.
7. "Injectible biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for delivery and tissue engineering", M. Kurisawa, J.E. Chung, Y.Y. Yang, S.J. Gao, H. Uyama, Chem. Commun., 2005, pp4312-4314.
8. "Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks", Y.D. Park, N. Tirelli, J.A. Hubbell, Biomat. 24, pp 893-900, 2003.
9. "Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives", G.D. Prestwich, D.M. Marecak, J.F. Marecek, K.P. Vercruysse, M.R. Ziebell, J. Cont. Rel., vol. 53, pp 93-103, 1998.
10. Solicitud de patente de EE.UU. nº 20050177118
11. "Effectiveness of a new novel Hyaluronic-acid gel film in the rat model", Y. Himeda, H. Kaneko, T. Umeda, Y. Miyata, T. Miyoshi, J. of Gynecologic Surgery, vol 21(2), pp55-63, 2005.
12. "Characterization of Hyaluronic acid-Arg-Gly-Asp peptide cell attachment matrix", J.R. Glass, K.T. Dickerson, K. Stecker, J. Polarek, Biomaterials, vol. 17(11), pp 1101-1108, 1996.
13. "Development of photocrosslinkable Hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering". JB. Leach, K.A. Bivens, C.N. Collins, C.E. Schmidt, Biomed Mater. Res. 70A, pp 74-82, 2004.
14. Documento US 2005/282747 A1
15. Documento WO 03/076578

La piel humana es el órgano más grande del cuerpo y constituye aproximadamente el 16 % del peso corporal. Desempeña muchas funciones vitales además de como barrera como influencia reguladora entre el mundo exterior y el ambiente controlado dentro del cuerpo.

En la piel hay dos capas principales. La epidermis está formada por queratinocitos que se apilan unos encima de otros. Los queratinocitos se desarrollan en la parte inferior de la epidermis y suben a la superficie, donde se desprenden como células muertas, duras y aplanadas. Por tanto, esta capa se está renovando constantemente. Los melanocitos y las células de Langerhans son otras importantes células de la epidermis.

La dermis consiste principalmente en tejido conjuntivo y es mucho más gruesa que la epidermis. Es responsable de la flexibilidad de la piel y la resistencia mecánica, y también está implicada en la regulación de la temperatura corporal. La dermis suministra a la epidermis avascular nutrientes y contiene órganos sensoriales del tacto, la presión, el dolor y la temperatura (corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini, terminales nerviosas libres), así como vasos sanguíneos, fibras nerviosas, glándulas sebáceas y sudoríparas y folículos pilosos.

La capa subcutánea es la capa grasa por debajo de la piel y consiste en tejido conjuntivo laxo y mucha grasa. Actúa como cojín protector, aísla el cuerpo controlando la ganancia de peso y la pérdida de calor y tiene un fuerte impacto sobre el aspecto de la piel.

Existen dos tipos distintos de envejecimiento de la piel. El envejecimiento intrínseco tiene un origen genético, mientras que el envejecimiento extrínseco se debe a factores ambientales, tales como la exposición a la luz solar. El envejecimiento intrínseco, también conocido como proceso de envejecimiento natural, es un proceso continuo que normalmente comienza a mediados de la década de los veinte años de vida. Normalmente, una serie de factores

extrínsecos actúan junto con el proceso de envejecimiento normal para dar lugar al envejecimiento prematuro de la piel. El envejecimiento más prematuro se debe a la exposición al sol. Otros factores externos que envejecen prematuramente la piel son la repetición de expresiones faciales, los embarazos, las posturas al dormir y el tabaquismo.

- 5 A medida que la piel envejece, la producción de células en la piel se ralentiza y las células toman una forma anormal que afecta de forma adversa a la textura de la piel.
- La piel más joven tiene más células grasas en la dermis que la piel más vieja. Por tanto, la piel más vieja parece más transparente y más fina que la piel más joven.
 - 10 • Ciertos componentes de la piel se reducen con la edad. Los elementos de retención de agua y de potenciación de la textura en la estructura intercelular, tales como ceramidas, ácidos hialurónicos, polisacáridos, glicerina y muchos otros, se gastan y no se reponen. Por tanto, la piel más vieja tiende a estar más seca que la piel más joven.
 - 15 • Las estructuras de soporte de la piel, el colágeno y la elastina, se deterioran o se dañan. Se forman arrugas en las zonas dañadas de la piel debido a la disminución de la elastina, el colágeno, el ácido hialurónico y otros reactivos hidratantes.
 - La piel más vieja es más propensa a reacciones alérgicas, sensibilidades e irritación que la piel más joven debido a un sistema inmunitario debilitado.
 - Las células de la piel muertas no se desprenden con tanta rapidez y el recambio de células cutáneas nuevas puede disminuir ligeramente.
 - 20 • Por alguna razón desconocida, la piel continúa creciendo y se expande a la vez que los tejidos grasos de soporte de las capas inferiores de la piel y los huesos disminuyen. De forma simultánea, los músculos faciales pierden su forma y firmeza. Por tanto, la piel comienza a combarse y da a la cara un aspecto colgante.

En todo el mundo se han realizado enormes esfuerzos y grandes inversiones dirigidas a la lucha contra el envejecimiento de la piel. Se dispone de la aplicación transdérmica de colágeno, vitaminas y compuestos hidratantes y reafirmantes. Esto requiere al menos la aplicación diaria de estas sustancias debido a que su semivida en el cuerpo es muy corta.

Otro enfoque es la inyección subcutánea de rellenos dérmicos. Los rellenos permanentes se basan principalmente en derivados de silicona o una matriz de colágeno con esferas (de polimetilmetacrilato) no biodegradables. Los efectos secundarios de los rellenos dérmicos incluyen fibrosis, teratomas y distorsiones faciales debido al desplazamiento del relleno.

Los rellenos temporales se basan en inyecciones de compuestos biodegradables, tales como colágeno, polímeros sintéticos (poliacrilamida reticulada, normalmente clasificada como hidrogeles debido a sus propiedades de hinchamiento y retención de agua); y varias modificaciones de ácido hialurónico reticulado y estabilizado. Estos rellenos dérmicos se inyectan por vía subcutánea aproximadamente cada 3-8 meses.

También se ha usado la implementación de grasa autóloga, pero esto implica un proceso de curación lento y doloroso.

El ácido hialurónico se conoce como biomaterial para usar como matriz de liberación de fármacos de liberación controlada^{1,2,3,4}), como estructura para procedimientos celulares de ingeniería tisular^{5,6}, y en la patente de CA 2551121. El uso de ácido hialurónico como biomaterial/matriz para ingeniería tisular usa sus propiedades especiales. Es un polímero biocompatible soluble, se puede producir a partir de una fuente no animal (procesos de fermentación bacteriana) y se produce en una amplia gama de pesos moleculares. Asimismo, es muy fácil modificar químicamente el polímero de HA con varios grupos funcionales. Proporciona un medio nutritivo para cultivos celulares y su forma de gel permite el control de su fluidez. No obstante, su desventaja más importante reside en que su semivida es muy corta que, incluso con un nivel extremo de reticulación, varía desde pocas horas a aproximadamente dos semanas^{7,8,9}.

La modificación química del ácido hialurónico y la reticulación suele tener como resultado una pérdida de solubilidad, de modo que se reduce su capacidad de inyección. Uno de los modos de sortear esta barrera es dar al HA reticulado una forma de película o dispositivo en capas^{10,11}/micropartículas/perlas.

Las micropartículas de HA divulgadas en la patente de EE.UU. N° 6,969,531, en la que las partículas se procesan con reactivos químicos (tanto aglutinantes como agentes emulsionantes, por ejemplo tensioactivos). La patente de EE.UU. n° 7,163,701 divulga partículas de HA formadas en presencia de iones metálicos.

La unión del péptido a una perla o armazón de hialurónico es un enfoque conocido además de como herramienta de investigación como biomaterial^{12,13}. No obstante, esta modificación también sufre un incremento de hidrofobicidad, de modo que reduce la capacidad del compuesto a inyectar.

Las ficolinas forman un grupo de proteínas que tienen dominios de tipo colágeno y de fibrinógeno. Se identificaron primero como proteínas que se unen al TGF-β1. En seres humanos se han identificado tres tipos de ficolina. L-ficolina, H-ficolina y M-ficolina. Un polipéptido de ficolina consiste en un pequeño dominio en el extremo N, un

dominio de tipo colágeno, una región de cuello y un dominio de tipo fibrinógeno, que muestra similitud con las mitades en el extremo C de las cadenas beta y gamma del fibrinógeno. El dominio de tipo colágeno media en la asociación de los polipéptidos de ficolina en trímeros y el dominio en el extremo N contiene residuos de cisteína que permiten el ensamblaje covalente de los trímeros en oligómeros superiores con un aspecto "de tipo ramo". Esta organización supramolecular se asemeja a la de las colectinas, un grupo de lectinas de tipo C que tienen un CRD de tipo C en lugar del dominio de tipo fibrinógeno que se encuentra en las ficolinas. Asimismo, las colectinas y las ficolinas son funcionalmente similares. La proteína de unión a manosa (MBP) colectina es una proteína de defensa del suero del huésped en la que las CRD de tipo C reconocen matrices de GlcNAc y residuos de manosa de las superficies de los patógenos. La MBP inicia la rama lectinas del sistema del complemento a través de la activación de las proteasas asociadas con MBP (MASP), lo que conduce a la eliminación del patógeno diana. Dos de las tres ficolinas humanas, las ficolinas L y H, también son proteínas séricas que se unen a las superficies de los patógenos mediante la interacción con hidratos de carbono (y probablemente con otras moléculas) y desempeñan la activación del complemento a través de la asociación con MASP. La ficolina L también actúa como una opsonina, estimula la fagocitosis de los patógenos por los neutrófilos. Los polimorfismos de la ficolina L afectan a los niveles de proteína sérica y a la unión a azúcar y puede tener implicaciones fisiopatológicas. La tercera ficolina humana, la ficolina M, se encuentra en gránulos secretores de neutrófilos y monocitos, reconoce patógenos de un modo dependiente de hidratos de carbono y activa el complemento a través de MASP. La ficolina M también puede actuar como receptor fagocítico. Las ficolinas L y H se producen en el hígado, junto con la MBP, y las ficolinas M y H se producen en los pulmones, como las colectinas antimicrobianas SP-A y SP-D. Las ficolinas humanas y la MBP también participan en el reconocimiento y aclaramiento de las células apoptóticas. En los ratones hay dos ficolinas, A y B. La ficolina B se encuentra en los lisosomas de macrófagos activados y se sugiere que es el ortólogo de la ficolina M, pero parece que solo la ficolina A está asociada con las MASP y puede activar el complemento. El ortólogo de ratón de la ficolina H es un pseudogén.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el nuevo e inesperado hallazgo de que la proteína ficolina es capaz de unirse a las superficies celulares. La mayor parte de la investigación sobre ficolinas se refiere a su estructura (3D) y funcionalidad. Se ha elegido como fuente de péptidos basado en su estructura y capacidad reivindicada para unirse específicamente a la N-acetil-glucosamina. Basado en su estructura 3D, los péptidos se eligieron a partir de brazos unidos disponibles potencialmente para unirse a las células.

Por tanto, en uno de sus aspectos, la invención proporciona una composición farmacéutica para secuestrar células en tejido conjuntivo. La composición de la invención comprende un armazón biocompatible al que se han unido una o más proteínas o péptidos, en el que los péptidos o proteínas tienen secuencias de aminoácidos que son subsecuencias de la ficolina humana y son capaces de unirse a las células a secuestrar. Las células a secuestrar pueden ser, por ejemplo, fibroblastos o células endoteliales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tejido conjuntivo" se refiere a cualquier tejido del cuerpo que contiene colágeno, tal como tejido conjuntivo denso, tejido conjuntivo fibroso, tejido conjuntivo elástico, tejido adiposo, sangre.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría concreta, se cree que las composiciones farmacéuticas de la invención tienden a estimular el rejuvenecimiento de la piel uniendo y secuestrando células que migran a través del tejido de la piel e inmovilizando las células en el tejido de la piel. Las células inmovilizadas secretan sustancias tales como colágeno, elastina, ácido hialurónico, que se acumulan en la piel.

El armazón de la composición es, preferentemente, biodegradable. En una realización preferida, la matriz se basa en un polímero de origen natural que existe en el cuerpo humano, tal como un polímero basado en ácido hialurónico. El ácido hialurónico se produce en forma disuelta como en el humor vítreo, el líquido sinovial y algunos fluidos tumorales, o como un gel como en el cordón umbilical, en ciertos tumores mesodérmicos y en la dermis. El ácido hialurónico se ha usado ampliamente como relleno dérmico. Tiene un elevado peso molecular y se considera seguro. La corta semivida normal del ácido hialurónico en el tejido (debido a los procesos de oxidación-reducción y enzimáticos) pueden extenderse ligeramente mediante, por ejemplo, reticulación química, que hace que el polímero insoluble en agua pueda tomar la forma de partículas. Esto disminuye la tasa de degradación también disminuyendo el área de superficie expuesta del polímero.

En una realización más preferida, el armazón comprende ácido hialurónico reticulado o una sal del mismo. Preferentemente, el ácido hialurónico tiene un peso molecular en el intervalo de $0,7 \times 10^6$ a 3×10^6 Dalton. El armazón puede estar en forma de perlas y puede estar en cualquier forma de administración que se requiera en cualquier aplicación.

La composición de la invención se puede usar como relleno dérmico. En este caso, la composición está, preferentemente, en una forma adecuada para inyección. En una realización preferida de la invención, el vehículo comprende ácido hialurónico. El ácido hialurónico soluble puede proporcionar un efecto de rejuvenecimiento rápido.

Los inventores han encontrado que los péptidos siguientes, todos con secuencias de aminoácidos que son subsecuencias de la secuencia de aminoácidos de la ficolina humana, pueden usarse en la composición farmacéutica de la invención.

- 5 a) el péptido, denominado en el presente documento "C-Fic" y que tiene la secuencia KGYNYSYKSEMKVSPA;
 b) el péptido, denominado en el presente documento "M-Fic" y que tiene la secuencia GGWTVFQRRVDGSVDFYRK; y
 c) el péptido, denominado en el presente documento "C-M Fic" y que tiene la secuencia KGYNYSYKSEMKFQRRVDGSVDFYRK.
 10 d) el péptido, denominado en el presente documento "M-Fic-K" que tiene la secuencia GGWTVFQRRMDGSVDFYRK;
 e) el péptido, denominado en el presente documento "C-M-Fic2K" que tiene la secuencia KGKYSYKGGWTVFQRRMDGSVDFYRK;
 f) el péptido, denominado en el presente documento "C-M-Fic-a-K" que tiene la secuencia
 15 KGKYSYKSEMKFQRRMDGSVDFYRK; y
 g) el péptido, denominado en el presente documento "C-M-Fic2" que tiene la secuencia KGKYSYKGGWTVFQRRMDGSVDFYRK;

En otro de sus aspectos, la invención proporciona una proteína o un péptido para usar en la composición farmacéutica de la invención.

- 20 La invención proporciona además el uso de la composición farmacéutica de la invención para tratar tejido conjuntivo, tal como tejido conjuntivo dérmico. Por ejemplo, la composición se puede usar como relleno dérmico, en cuyo caso la composición está, preferentemente, en una forma adecuada para la inyección. Por tanto, la invención también proporciona un relleno dérmico que comprende un armazón biocompatible al que se han unido una o más proteínas o péptidos, en el que los péptidos o proteínas tienen secuencias de aminoácidos que son subsecuencias de la ficolina humana y son capaces de unirse a células predeterminadas.
 25

La invención también proporciona un procedimiento para tratar tejido conjuntivo que comprende introducir en el tejido conjuntivo una composición farmacéutica de la invención. El tejido conjuntivo puede ser, por ejemplo, tejido dérmico, en cuyo caso la composición se administra, preferentemente, mediante inyección.

- 30 En la técnica se conocen bien procedimientos de reticulación de ácido hialurónico (HA). El ácido hialurónico puede reticularse a través de cada uno de los 3 grupos funcionales unidos a su estructura (el grupo carboxílico, el grupo hidroxílico y el grupo acetamido).

- Cada unidad de repetición de ácido hialurónico contiene un grupo carboxilato. Este grupo carboxilato puede reaccionar con dihidrazidas, tales como dihidrazida de ácido adípico, dihidrazida de ácido succínico, con o sin catálisis de EDC y/o sulfo-NHS (reticulación completa o parcial).
- 35 • Cada unidad de repetición de ácido hialurónico contiene cuatro grupos hidroxilo. Estos grupos hidroxilo pueden reaccionar con diepóxidos tales como éter de 1,4-butanodiol diglicidilo, éter de polietilenglicol diglicidilo y éter de polipropilenglicol diglicidilo.
- Los grupos hidroxilo pueden reaccionar también con dialdehídos para formar derivados de acetal/hemiacetal en condiciones ácidas, una reacción que conducirá a un reticulador éter.
- 40 • Cada grupo de repetición de ácido hialurónico contiene un grupo acetamido que puede sufrir desacetilización, dejando grupos amino libres. Después, los grupos amino se pueden reticular mediante la formación de amidas, imino o aminas secundarias.
- El grupo carboxílico del ácido hialurónico puede reaccionar con una carbodiimida hidrosoluble para formar O-acilisourea que después reaccionará con carboxilo adyacente para formar un anhídrido, que después
 45 reaccionará con un grupo hidroxilo para dar reticulaciones inter e intramoleculares.

- En una realización preferida de la invención, la reacción de reticulación es la base para la formación de perlas. Los geles solubles se pueden emulsionar en aceite de maíz, aceite TMC (triglicéridos de cadena media) u otro aceite adecuado, calentarse hasta 60 °C y después reticularse para dar una forma de gota. El tamaño de partícula de la perla se puede determinar mezclando la velocidad de la emulsión inversa. La reacción se realiza a temperatura elevada para acelerar el proceso y, también, para secar las perlas.
 50

Las perlas reticuladas se pueden precipitar mediante la adición de un disolvente orgánico tal como etanol. IPA (alcohol isopropílico), acetona, hexano o similares. Siendo insolubles en agua, las perlas se pueden purificar lavando con agua.

- 55 El nivel de reticulación se puede seleccionar para dotar a las perlas de una rigidez y estabilidad deseadas al tiempo que se dejan grupos, principalmente grupos carboxilo, disponibles para unión peptídica.

Los péptidos de la composición se pueden activar para la unión al armazón, por ejemplo mediante anhídrido succínico, para dar péptido-hemisuccinato, que después se pueden hacer reaccionar en presencia de EDC/sulfo-

NHS bien con carboxilatos libres o bien con colas libres de epóxido, o hidrazona en función del reticulador usado. Los péptidos se pueden activar y unir al HA antes de la reticulación.

Por tanto, en uno de sus aspectos, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para secuestrar células en tejido conjuntivo, como se define en las reivindicaciones.

- 5 En otro de sus aspectos, la invención proporciona una proteína o un péptido para usar en la composición farmacéutica de la invención.

La invención proporciona también el uso de la composición farmacéutica para tratar tejido conjuntivo.

La invención proporciona además el uso de una proteína o un péptido la preparación de la composición farmacéutica de la invención.

- 10 La invención en otro más de sus aspectos proporciona un relleno dérmico como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona un procedimiento para tratar tejido conjuntivo que comprende introducir en el tejido conjuntivo una composición farmacéutica de la invención.

Breve descripción de las figuras

- 15 Con el fin de entender la invención y de ver cómo se puede llevar a cabo en la práctica, a continuación se describirán realizaciones solo a modo de ejemplo no limitante, con referencia a las figuras adjuntas en las que:

La **Fig. 1** muestra la unión celular de FF1 a PreC y C-Fic-aK, 6 mg de péptido/ml;

La **Fig. 2** muestra la unión celular de FF1 a PreC, C-M-Fic y C-M-Fic-a-K a una concentración de 6 mg de péptido/ml y el péptido C-M-Fic a una concentración de 12 mg de péptido.

La **Fig. 3a** muestra la unión celular de FF1 a C-M-Fic2.

- 20 La **Fig. 3b** muestra la actividad de M-fic-K, y M-Fic en comparación con el control positivo PreC-gamma, 6 mg de péptido/ml.

La **Fig. 4** muestra la unión celular de FF1 a C-M-Fic, M-Fic y C-Fic durante un periodo de 24 horas (Fig. 4a) y 150 horas (Fig. 4b).

- 25 La **Fig. 5** muestra la unión celular de BAEC a C-M-Fic, M-Fic y C-Fic durante un periodo de 24 horas (Fig. 5a) y 150 horas (Fig. 5b).

La **Fig. 6** muestra la unión celular de FF1 a C-M-Fic, M-Fic y C-Fic a 6 mg de péptido/ml durante un periodo de 24 horas (Fig. 6a) y 150 horas (Fig. 6b);

La **Fig. 7** muestra la unión celular de BAEC a C-M-Fic, M-Fic y C-Fic a 6 mg de péptido/ml durante un periodo de 24 horas (Fig. 7a) y 150 horas (Fig. 7b);

- 30 La **Fig. 8** muestra las respuestas a la dosis de la unión celular de FF1 a perlas de sefarosa recubiertas con los péptidos C-Fic-6 y C-Fic-12 (Fig.8a), los péptidos M-Fic-6 y M-Fic-12 (Fig. 8b); y los péptidos C-M-Fic-6 y C-M-Fic-12 (Fig. 8c);

La **Fig. 9** muestra las respuestas a la dosis de la unión celular de BAEC a los péptidos C-Fic-6 y C-Fic-12 (Fig.9a), los péptidos M-Fic-6 y M-Fic-12 (Fig. 9b) y los péptidos M-Fic-6 y C-M-Fic-12 (Fig. 9c); diversos péptidos;

- 35 La **Fig. 10** muestra la microscopia óptica de Nomarsky de perlas recubierta de péptido tras la unión a FF1 tras 3 días de incubación (X100) (panel izquierdo, C-Fic, panel central C-M Fic, panel derecho M-C-Fic);

La **Fig. 11** muestra la microscopia óptica de Nomarsky de perlas recubiertas de péptido y su unión a FF1 tras 3 semanas de incubación (X100) (panel superior izquierdo, blanco, panel superior derecho C-Fic, panel inferior izquierdo M-fic, panel inferior derecho C-m-Fic);

- 40 La **Fig. 12** muestra la microscopia óptica de Nomarsky de perlas recubiertas de péptido y su unión a células endoteliales (BAEC) tras 3 semanas de incubación (X100) (panel superior izquierdo, blanco, panel superior derecho C-Fic, panel inferior izquierdo M-fic, panel inferior derecho C-m-Fic);

La **Fig. 13** muestra la toxicidad de C-Fic, M-Fic, and M-C-Fic a células FF1 (Fig. 13a) y BAEC (Fig. 13b) en un amplio intervalo de concentraciones de péptidos tras 48 horas;

- 45 La **Fig. 14** muestra la toxicidad de los diversos péptidos a células FF1 (Fig. 14a) Y BAEC (Fig. 14b) tras 5 días de incubación; y

La **Fig. 15** muestra la unión de células FF1 en suspensión a las perlas de sefarosa recubiertas.

Ejemplos

- 50 **Materiales y procedimientos**

Soluciones:

a. Una solución de HCl 1mM para la activación de perlas de CNBr Sefarosa a 4 °C.

b. Tampón de acoplamiento que contiene NaHCO₃ 0,1M y NaCl 0,5N ajustado a un pH de 8,3.

- 55 c. Solución de bloqueo para bloquear los grupos activos restantes en el gel de PERLAS SEPHAROSE que contienen glicina 0,2M, a pH 8,0 a 4 °C.

d. Tampón acetato que contiene tampón acetato 0,1M a pH 4,0, NaCl 0,5M, soluciones peptídicas. La Tabla 1 muestra los péptidos que se usaron.

Tabla 1	
Péptido	Secuencia
C-Fic	KGYNYSYKSEMKVPAK
M-Fic	GGWTVFQRRVDGSVDFYRK
C-M-Fic	KGYNYSYKVSEMKFQRRVDGS VDFYRK
C-Fic-a-K	KGKYSYKVSEMKVPAK *
M-Fic-K	GGWTVFQRRMDGSVDFYRK
CM-Fic-a-K	KGKYSYKVSEMKFQRRMDG SVDFYRK
CM-Fic-2	KGKYSYKGGWTVFQRRMDG SVDFYR
CM-Fic-2K	KGKYSYKGGWTVFQRRMDG SVDFYRK
Controles	
C-M-g	KTRWYSMKKTTMKVFQKRLV GSVDFKK
preCy	KTRWYSMKKTTMKIIPFNR
*solo para comparación.	

Las soluciones peptídicas (2 mg/ml) se prepararon en tampón de acoplamiento. Para los péptidos insolubles, los péptidos secos se predisolviaron en 50 μ l de DMSO antes de la adición del tampón de acoplamiento. La concentración exacta de las soluciones peptídicas se determinó mediante espectrofotometría a DO₂₈₀.

Péptidos de acoplamiento a perlas de Sepharose

En una minicolumna de poliestireno (Fig. 1) desechable, adecuada para la preparación de una columna de filtración en gel de 0,5-2 ml (Pierce, Prod #29920) se introdujeron 100 mg de perlas de CNBr-Sepharose secas (rendimientos 350 μ l de gel-perlas de Sepharose hinchadas). La parte inferior de las columnas se bloquean mediante un filtro de vidrio grueso y un tapón.

A la columna se añadieron 3 - 4 ml de volumen total de la solución de HCl (1 mM) y se forzó el paso del líquido a presión de vacío a través del gel. Este proceso se repitió 5 veces. El alícuota final de HCl se aspiró hasta que aparecieron grietas en la torta de gel. Alícuotas de 2 - 3 ml del tampón de acoplamiento se añadieron inmediatamente a las perlas lavadas y se aspiraron. Esta etapa se repitió 4-5 veces. El elevado pH hidroliza y abre los grupos activos.

Unión al péptido

Una solución peptídica en tampón de acoplamiento preparada como se ha indicado en lo que antecede se añadió inmediatamente a las perlas de Sepharose SEPHAROSE BEADS, que se usaron para fijar los péptidos para todos los ensayos in vitro en la columna hasta una unión final de 6 mg de péptido por ml de gel de SEPHAROSE BEADS. La columna se cerró y se agitó durante la noche a 4 °C muy suavemente par evitar el agrietamiento mecánico de las SEPHAROSE BEADS. Se retiró la tapa inferior de la columna y la solución de ligando/tampón se recogió como las perlas de Sepharose sedimentada en el filtro. La DO₂₈₀ del tampón recogido se comprobó para determinar la concentración de péptido no acoplado. El gel se lavó/aspiró con 5 volúmenes (- 2 ml) de tampón de acoplamiento y se mezcló suavemente. Todos los grupos activos restantes en el gel se bloquearon con tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. El gel con perlas de Sepharose con péptidos se lavó después con 2 ciclos cada uno de 5 volúmenes de gel de:

- a. Tampón acetato 0,1M
- B. Tampón de acoplamiento
- c. Tampón de almacenamiento: tampón de acoplamiento-azida:tampón de acoplamiento que contiene NaN_3 0,1 % (concentración final)

5 Las perlas de Sepharose se almacenaron hasta su uso a 4-8 °C. Antes de usar, las perlas estaban en un tubo Eppendorff 4 veces durante 3 minutos cada uno con PBS o medio.

Ensayo de unión celular en monocapas

10 Los péptidos analizados (Tabla 1) se acoplaron a perlas de Sepharose a dos concentraciones: 6 y 12 mg/ml de perlas de Sepharose. Las Sepharose Beads que sufrieron el procedimiento de acoplamiento sin adición de péptido ("Sepharose Beads *desnudas*") sirvieron como control negativo (denominado en el presente documento "Sepharose Beads – *blanco*"). Se realizó un ensayo de unión celular con 2 tipos de células normales. Células endoteliales de aorta bovina (BAEC) y fibroblastos de prepucio humano (FF1). Se añadieron perlas de Sepharose a placas de cultivo de 12 pocillos con monocapa subconfluente de las células cultivadas (se añadieron 100-300 perlas a cada pocillo). La fracción de perlas de Sepharose unidas a la monocapa se monitorizó a tiempos diferentes.

15 Ensayo de unión celular en suspensiones celulares

20 La unión de FF1 en suspensión a péptidos unidos a perlas de Sepharose se siguió usando el ensayo MTS. El ensayo de MTS usa tetrazolio, que es captado por células viables y convertido en formazán, que tiene un pico de absorción lumínica a 492 nm. La absorbancia lumínica a 492 (DO_{492}) es directamente proporcional al número de células vivas unidas a las perlas. Se usaron curvas de calibración para transformar las lecturas de DO_{492} en el número de célula.

Resultados

25 La Fig. 1 muestra la unión celular de FF1 a PreC y C-Fic-aK, 6 mg de péptido/ml. Los resultados indican una tasa similar de unión celular del péptido analizado en comparación con el control positivo. Ambos péptidos alcanzan un 100 % de unión celular en menos de 24 horas.

30 La Fig. 2 muestra la unión celular de FF1 a PreC, C-M-Fic y C-M-Fic-a-K a una concentración de 6 mg de péptido/ml y el péptido C-M-Fic a una concentración de 12 mg de péptido. Todos los péptidos analizados se unieron a las células con una cinética similar a la de la proteína control positiva PreC. La concentración más alta del péptido C-M-Fic (12 mg/ml) mostró una unión celular ligeramente más rápida en comparación con la concentración menor (6 mg/ml). La modificación del péptido peptide C-M-Fic para producir el péptido C-M-Fic-aK aceleró la cinética de la unión celular.

35 La Fig. 3a muestra la unión celular de FF1 a C-M-Fic2. C-M-Fic2-K difiere de C-M-Fic2 en la adición de un grupo lisina. Tanto C-M-Fic2 como C-M-Fic2-K muestran un buen perfil cinético de unión celular (unión rápida) y alcanzan una unión del 100 %. No obstante, una adición de un grupo FITC (altamente hidrófobo) inhibe la tasa y, probablemente, la extensión total de la unión celular.

40 La Fig. 3b muestra la actividad de M-fic-K, y M-Fic en comparación con el control positivo PreC-gamma, 6 mg de péptido/ml. Como se observa también en la comparación de C-M-Fic2 y C-M-Fic2-K (Fig. 3a), la adición de un grupo lisina tuvo como resultado un cambio espectacular en la actividad, aunque M-Fic fue inicialmente inferior al control positivo.

45 La Fig. 4 muestra la unión celular de FF1 a C-M-Fic, M-Fic y C-Fic y blanco (perlas sin recubrir) a una concentración de 12 mg de péptido/ml durante 24 horas (Fig. 4a). Las perlas de Sepharose Blanco no tienen ninguna capacidad de unión celular, de modo que se confirma que los péptidos son la fuente de la unión. Se pueden mostrar varios perfiles cinéticos de diferentes péptidos ya dentro de las primeras 12 horas. Algunos muestran un tiempo de retraso antes de la unión celular, mientras que otros muestran una respuesta inmediata. Los péptidos también difieren en su capacidad máxima de unión (algunos alcanzan un 100 % y algunos se unen a aproximadamente un 50 % de las células). La Fig. 4b muestra la misma lista de péptidos tras 150 horas. De particular interés es la observación de que incluso el péptido más lento (C-Fic) alcanza una unión celular del 100 % tras un periodo de tiempo.

50 La Fig. 5 muestra la unión celular de BAEC a C-M-Fic, M-Fic, C-Fic y al blanco, concentración de 12 mg de péptido/ml durante 24 horas (Fig. 5a). Como en el grupo de prueba de péptidos se detectan varios perfiles. La Fig. 5b sigue la unión de BAEC tras 150 horas, en la que todos los péptidos alcanzan una unión celular completa.

55 La Fig. 6 muestra la unión celular de FF1 a C-M-Fic, M-Fic y C-Fic y blanco (6a tras 24 horas y 6b tras 150 horas) a una concentración de 6 mg péptido/ml durante 24 horas (Fig. 6a). Comparando los resultados con la Fig. 4, se observa un evidente descenso de la tasa de unión. Esta es una prueba de respuesta a la dosis, lo que permite diferenciar entre los péptidos activos a 12 mg/ml. C-fic pierde su actividad, C-M-fic se ve fuertemente afectado por la dosis menor, mientras que M-fic parece retener la mayor parte de su actividad.

60 La Fig. 7 muestra la unión celular de BAEC a C-M-Fic, M-Fic, C-Fic y el blanco, 6 mg de péptido/ml durante 24 horas (Fig. 7a) y 150 horas (Fig. 7b). En comparación con los resultados con 12 mg/ml (Fig.5), las BAEC parecen ser más sensibles a la disminución de la dosis. Esto es evidente tanto a corto como a largo plazo.

La Fig. 8 muestra las respuestas a las dosis de la unión celular de FF1 a perlas de Sepharose recubiertas con

uno de los péptidos o sin recubrimiento (SB-blanco). C-Fic (Fig. 8a,) no tiene reactividad a 6mg/ml. M-Fic (Fig. 8b,) retiene su actividad a la concentración menor. La unión celular de FF1 a C-M-Fic (Fig. 8c) se ve fuertemente afectada por la disminución y alcanza una unión celular del 100 % únicamente tras 96 horas (en comparación con 20 horas a la dosis más alta). Los resultados presentados en la Fig. 8 son de más de 150 horas.

La Fig. 9 muestra las respuestas a las dosis de la unión celular de BAEC a cada péptido. C-Fic (Fig. 9a,) pierde completamente la reactividad a 6mg/ml. Existe una ligera disminución en la tasa de unión de M-Fic a la concentración más baja (Fig. 9b,) y la unión celular de BAEC a C-M-Fic (Fig. 9c) tiene una tasa más lenta a la concentración más baja.

Se pudieron extraer las conclusiones siguientes:

1. Las perlas de Sepharose no se unieron solas a la monocapa celular de ningún tipo celular. Por tanto, la reactividad de la unión celular mostrada en los demás experimentos se puede atribuir a los péptidos.
2. A una concentración de 12 mg de péptido/ml, todos los péptidos analizados alcanzan una unión celular del 100 % a un tiempo relativamente corto, tanto con FF1 como con BAEC.
3. En general, las BAEC interaccionaron con los péptidos más rápido que FF1.
4. Se analizó un enfoque de la respuesta a la dosis, con el fin de ajustar la detección selectiva entre los diversos péptidos.
5. Incluso a una concentración de 6 mg/ml, M-fic alcanzó la unión celular saturada en un plazo de 24 horas. C-M-fic alcanzó la unión celular saturada en un plazo d 96 horas. A esta concentración, C-fic era inactiva. Para BAEC se obtuvieron resultados similares, pero para estas células C-fic también mostró alguna actividad.

La Fig. 10 muestra la microscopia óptica de Nomarsky de perlas recubierta de péptido tras la unión a FF1 tras 3 días de incubación (X100) (panel izquierdo, C-Fic, panel central C-M Fic, panel derecho M-C-Fic); Cabe destacar los agregados de células y perlas formados con los péptidos M-fic, C-M-Fic.

La Fig. 11 muestra microscopia óptica de Nomarsky de perlas recubiertas con péptido y su unión a FF1 tras 3 semanas de incubación (X100). (panel superior izquierdo, blanco, panel superior derecho C-Fci, panel inferior izquierdo M-FIC, panel inferior derecho, C-M-Fic). Se observa la misma respuesta que en a Fig. 10, pero en los lugares en los que las células se han agregado, el agregado era más pronunciado incluso con menos péptidos activos.

La Fig. 12 muestra microscopia óptica de Nomarsky de perlas recubiertas con péptido y su unión a células endoteliales (BAEC) tras 3 semanas de incubación (X100). (panel superior izquierdo, blanco, panel superior derecho C-Fci, panel inferior izquierdo M-FIC, panel inferior derecho, C-M-Fic). Cabe destacar la formación de tubos pequeños asociados con perlas de Sepharose unidas a M-fic y CM-Fic.

A tiempos de incubación más prolongados, los péptidos inmovilizaron además FF1 a las perlas formando agregados célula-perla estables. Esta unión aumentó con el tiempo sin perder el efecto, como se muestra en las Figs. 10 y 11 para los diferentes péptidos analizados. Las perlas de Sepharose recubiertas con los péptidos activos forman en la placa estructuras 3D a una densidad celular alta.

Con las BAEC, las células se movilizaron a los mismos péptidos. En la Fig. 12 es evidente que las perlas de sepharose recubiertas con los péptidos activos indujeron agregados y estructuras de tipo tubo.

M-fic tuvo la actividad más alta y C-M-Fic también fue activa.

Ensayo de toxicidad para los diferentes péptidos:

Se realizó un ensayo de toxicidad para determinar la toxicidad de los péptidos analizados a una de las líneas celulares usadas. Se sembraron 15×10^3 células (FF1 o BAEC) en placas de plástico de 96 pocillos. Tras una incubación durante la noche, a los pocillos se añadieron concentraciones crecientes de péptidos en el intervalo de 0,1-300 $\mu\text{g/ml}$. La supervivencia celular se comprobó mediante el ensayo MTS tras 2 y 5 días, y se normalizó con el número celular de los controles (sin péptido).

La Fig. 13 muestra la toxicidad de C-Fic, M-Fic, and M-C-Fic a células FF1 (Fig. 13a) y BAEC (Fig. 13b) en un amplio intervalo de concentraciones de péptidos tras 48 horas. La Fig. 14 muestra la toxicidad de los diversos péptidos a células FF1 (Fig. 14a) Y BAEC (Fig. 14b) tras 5 días de incubación.

Unión de células en suspensión a constructos péptido-perla

La Fig. 15 muestra la unión de células FF1 en suspensión a las perlas de Sepharose recubiertas. En las perlas recubiertas con C-fic y CM -fic, la unión celular era estable durante al menos tres días. Para C-M-fic, se detecta un incremento en el número celular después del primer día, lo que indica una proliferación de células. Para las perlas recubiertas con C-fic, la unión celular disminuyó durante el primer día y después permaneció estable.

Conclusiones

1. En general, los péptidos a la concentración menor del péptido de 6 ml/mg unido a una tasa más lenta a cualquier tipo celular en comparación con la concentración más alta (12 de mg/ml).
- 5 2. C-fic a una concentración de 6 mg de péptido/ml no se unió a FF1 o a BAEC. La extensión de la unión celular fue de aproximadamente 30 % tras 96 horas de incubación.
3. M-fic y C-M-fic alcanzaron la unión saturada tras 72 horas de incubación.
4. La mayoría de los péptidos no eran tóxicos en un amplio intervalo de concentraciones analizadas. A concentraciones muy altas (>100 µg/ml), se observó alguna potenciación de la proliferación para alguno de los péptidos.
- 10 5. C-M-fic mostró alguna toxicidad menor a concentraciones muy altas (>100 µg/ml) para ambos tipos celulares y la exposición prolongada (5 días). A concentraciones altas de este péptido, la supervivencia celular, normalizada con respecto a los controles, fue de aproximadamente el 50 %.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para secuestrar células en tejido conjuntivo, que comprende:
- (a) un armazón biocompatible;
 - (b) uno o más péptidos o proteínas seleccionados de:
 - 5 (i) un péptido o una proteína que tienen una secuencia de aminoácidos que es una subsecuencia de ficolina humana capaz de unirse a las células a secuestrar, seleccionándose el péptido o la proteína del grupo que comprende al menos:
 - (a) el péptido C-Fic que comprende la secuencia KGYNYSYKSEMKVRPA;
 - (b) el péptido M-Fic que comprende la secuencia GGWTVFQRRVDGSVDFYRK; y
 - 10 (c) el péptido C-M-Fic que comprende la secuencia KGYNYSYKVSEMKFQRRVDGSVDFYRK;
 - (d) el péptido M-Fic-K que comprende la secuencia GGWTVFQRRMDGSVDFYRK;
 - (e) el péptido C-M-Fic2K que comprende la secuencia KGYKYSYKGGWTVFQRRMDGSVDFYRK;
 - (f) el péptido C-M-Fic-a-K que comprende la secuencia KGYKYSYKVSEMKFQRRMDGSVDFYRK; y
 - (g) el péptido C-M-Fic2 que comprende la secuencia KGYKYSYKGGWTVFQRRMDGSVDFYR;
 - 15 estando unido el péptido al armazón; y
 - (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células a secuestrar se seleccionan de entre fibroblastos y células endoteliales.
3. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el armazón es biodegradable.
- 20 4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el armazón está en forma de perlas.
5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el armazón comprende ácido hialurónico o una sal del mismo.
- 25 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el ácido hialurónico o la sal ácida están reticulados.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en una forma adecuada para inyección.
- 8 Una proteína o un péptido para usar en la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionados del grupo que comprende al menos:
- 30 (a) el péptido C-Fic que comprende la secuencia KGYNYSYKSEMKVRPA;
 - (b) el péptido M-Fic que comprende la secuencia GGWTVFQRRVDGSVDFYRK; y
 - (c) el péptido C-M-Fic que comprende la secuencia KGYNYSYKVSEMKFQRRVDGSVDFYRK;
 - (d) el péptido M-Fic-K que comprende la secuencia GGWTVFQRRMDGSVDFYRK;
 - (e) el péptido C-M-Fic2K que comprende la secuencia KGYKYSYKGGWTVFQRRMDGSVDFYRK;
 - 35 (f) el péptido C-M-Fic-a-K que comprende la secuencia KGYKYSYKVSEMKFQRRMDGSVDFYRK; y
 - (g) el péptido C-M-Fic2 que comprende la secuencia KGYKYSYKGGWTVFQRRMDGSVDFYR.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar en el tratamiento de tejido conjuntivo.
- 40 10. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el tejido conjuntivo es tejido conjuntivo dérmico.
11. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que la composición está en una forma adecuada para inyección.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para usar como relleno dérmico.
- 45 13. Un relleno dérmico que comprende:
- (a) un armazón biocompatible;
 - (b) uno o más péptidos o proteínas seleccionados de:
 - 50 (i) un péptido o una proteína que tienen una secuencia de aminoácidos que es una subsecuencia de ficolina humana capaz de unirse a uno o más tipos celulares predeterminados, seleccionándose el péptido o la proteína del grupo que comprende al menos:

- 5
- (a) el péptido C-Fic que comprende la secuencia KGYNYSYKSEMKVRPA;
 - (b) el péptido M-Fic que comprende la secuencia GGWTVFQRRVDGSVDFYRK; y
 - (c) el péptido C-M-Fic que comprende la secuencia KGYNYSYKVSEMKFQRRVDGSVDFYRK;
 - (d) el péptido M-Fic-K que comprende la secuencia GGWTVFQRRMDGSVDFYRK;
 - (e) el péptido C-M-Fic2K que comprende la secuencia KGYKYSYKGGWTVFQRRMDGSVDFYRK;
 - (f) el péptido C-M-Fic-a-K que comprende la secuencia KGYKYSYKVSEMKFQRRMDGSVDFYRK; y
 - (g) el péptido C-M-Fic2 que comprende la secuencia KGYKYSYKGGWTVFQRRMDGSVDFYR.

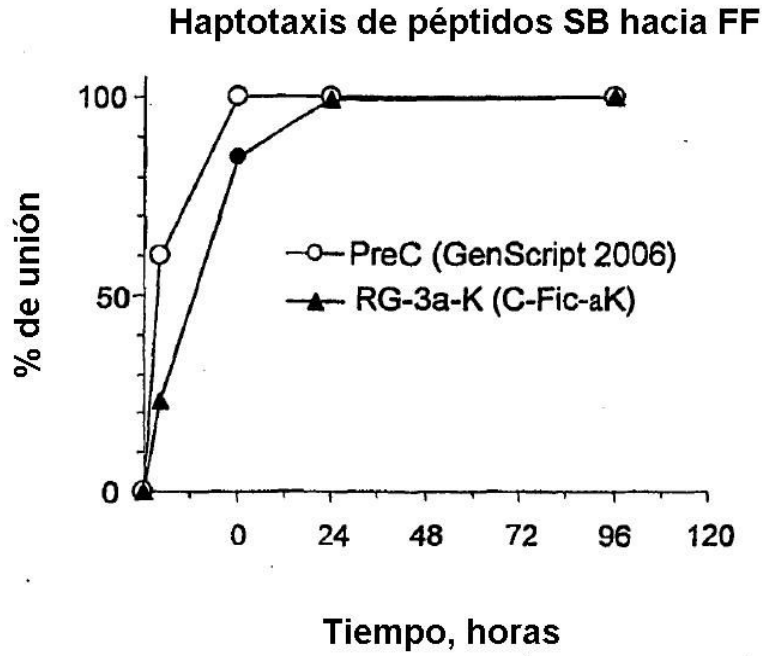


Fig. 1

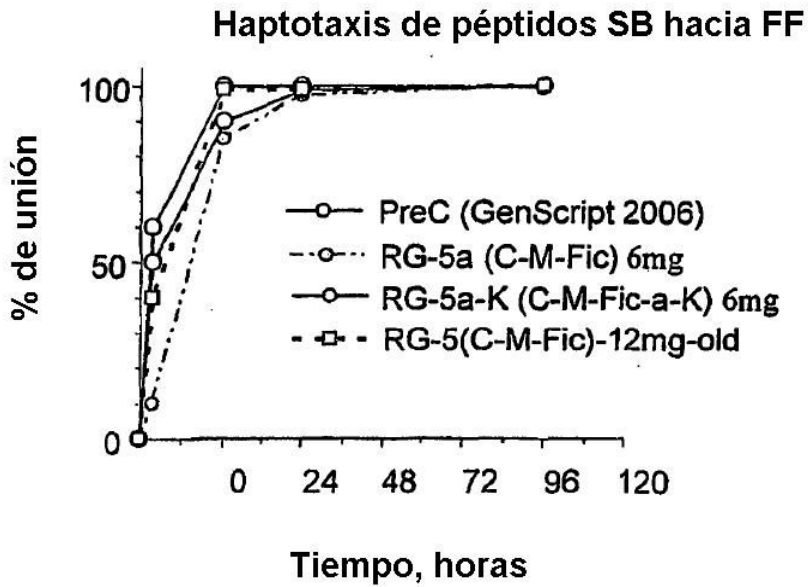


Fig. 2

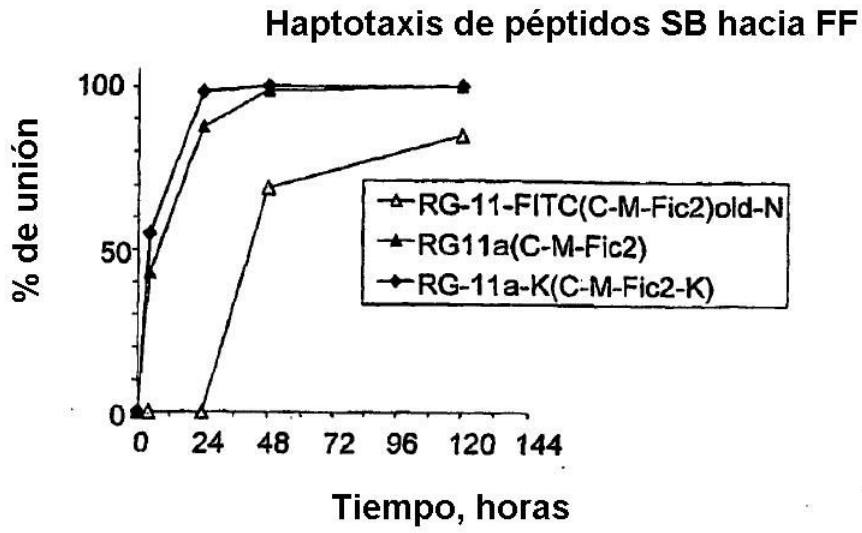


Fig. 3A

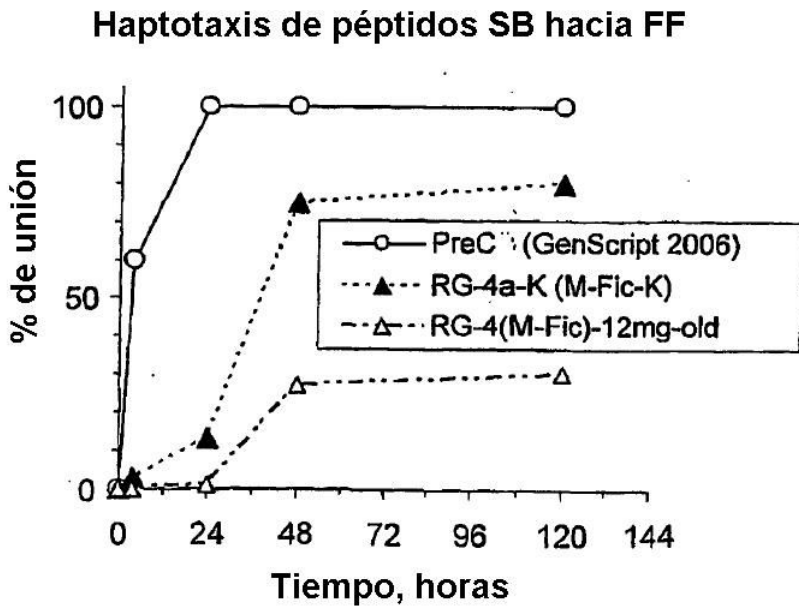


Fig. 3B

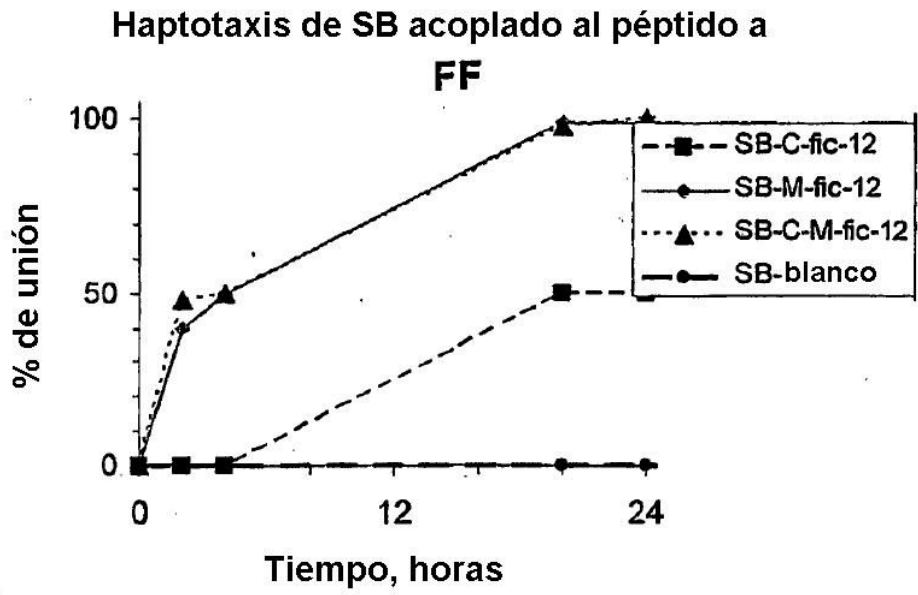


Fig. 4A

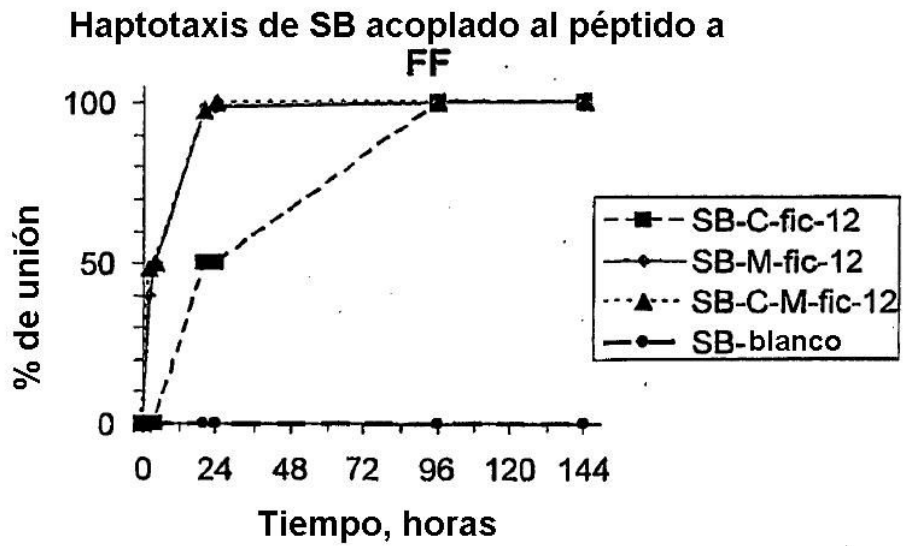


Fig. 4B

Haptotaxis de SB acoplado a péptido a BAEC

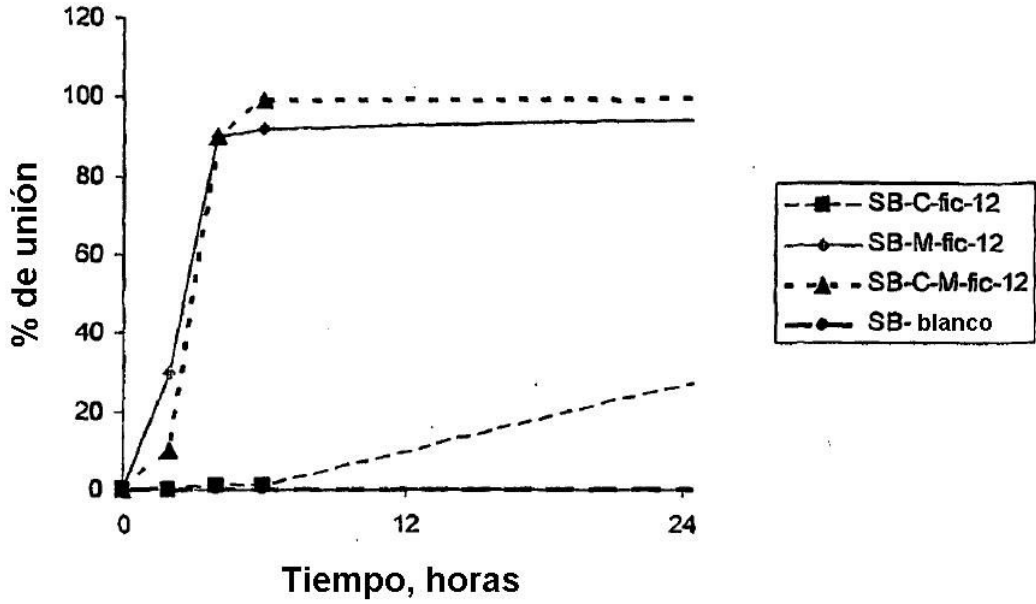


Fig. 5A

Haptotaxis de SB acoplado a péptido a BAEC

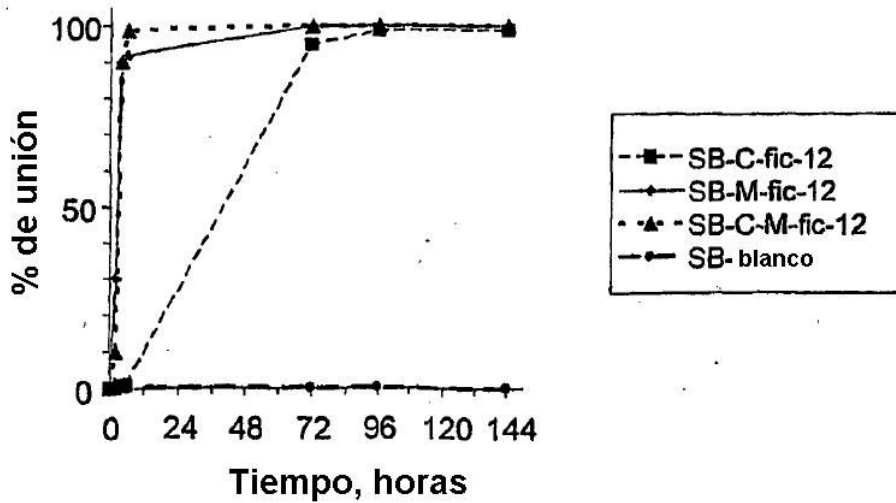


Fig. 5B

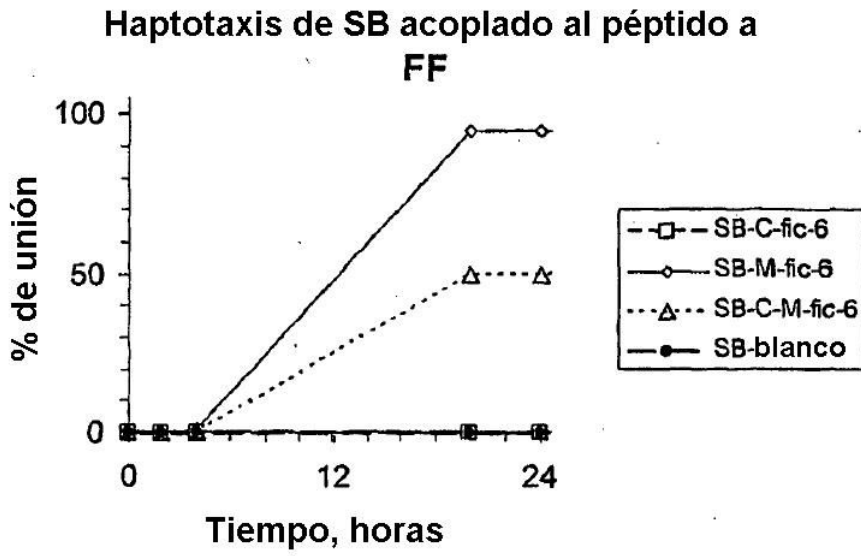


Fig. 6A

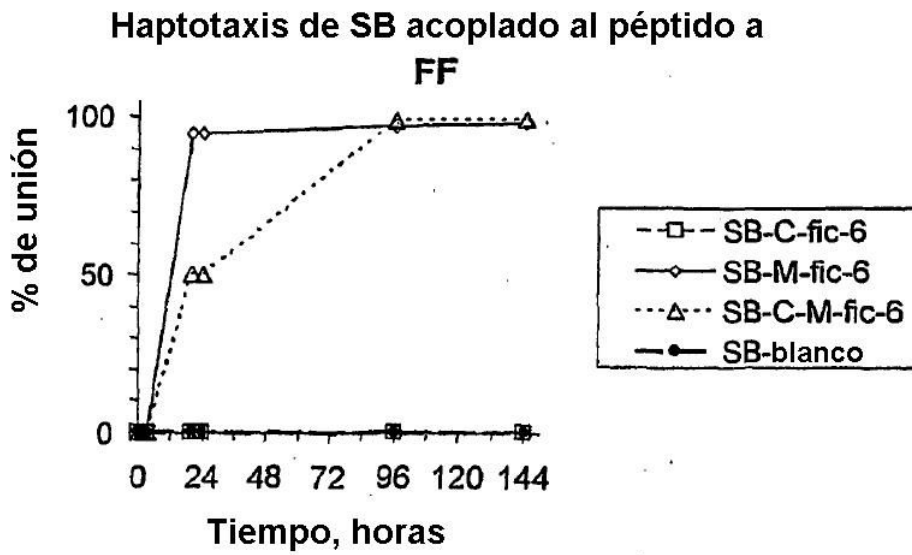


Fig. 6B

Haptotaxis de SB acoplado al péptido a BAEC

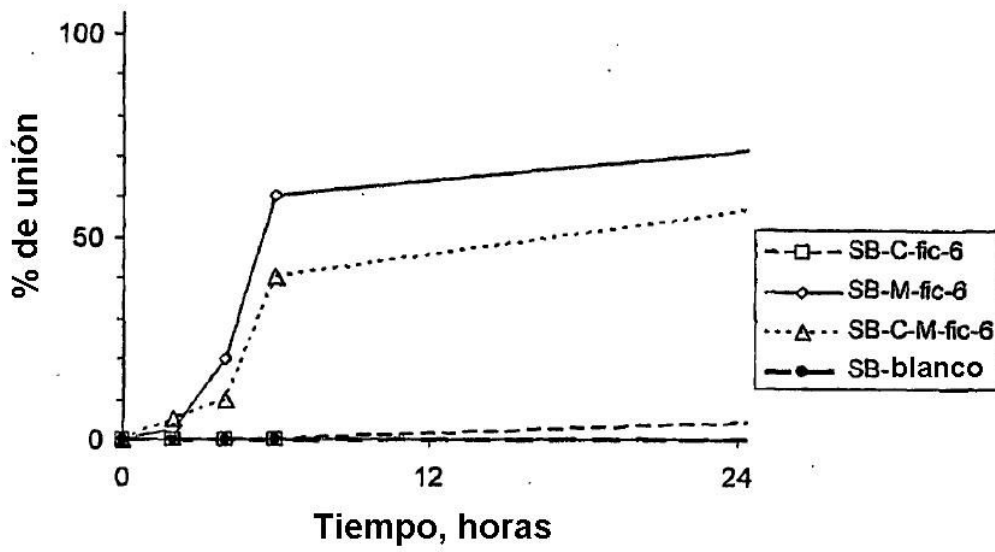


Fig. 7A

Haptotaxis de SB acoplado al péptido a BAEC

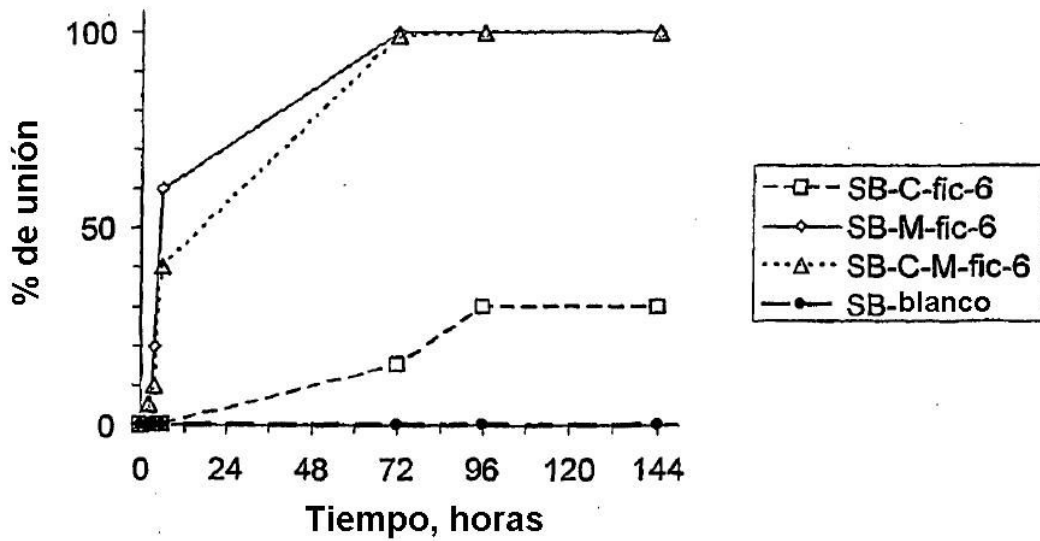


Fig. 7B

Haptotaxis de SB acoplado al péptido a FF

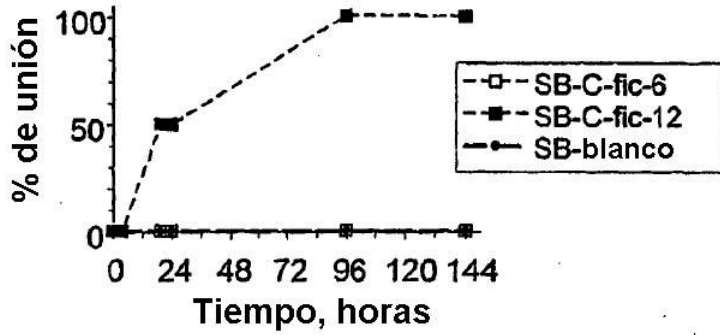


Fig. 8A

Haptotaxis de SB acoplado al péptido a FF

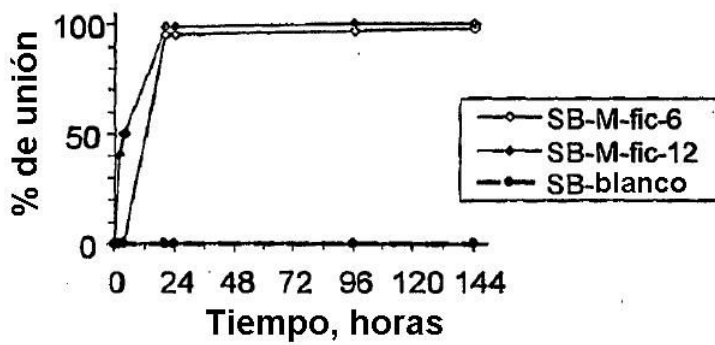


Fig. 8B

Haptotaxis of peptide coupled SB to FF

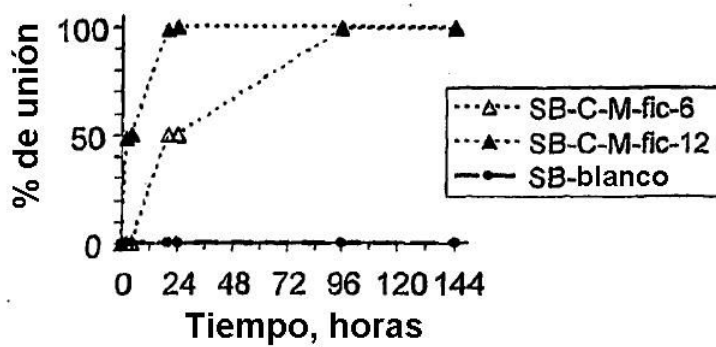


Fig. 8C

Haptotaxis de SB acoplado a péptido a BAEC

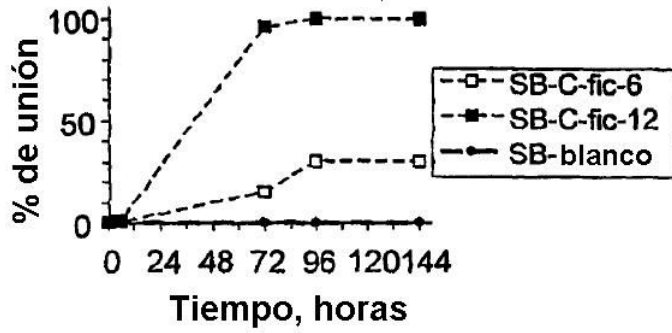


Fig. 9A

Haptotaxis de SB acoplado a péptido a BAEC

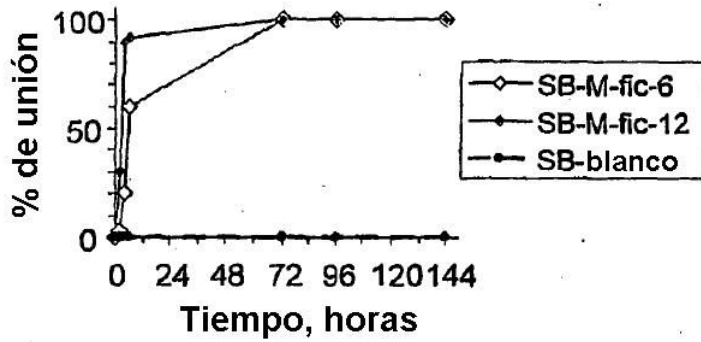


Fig. 9B

Haptotaxis de SB acoplado a péptido a BAEC

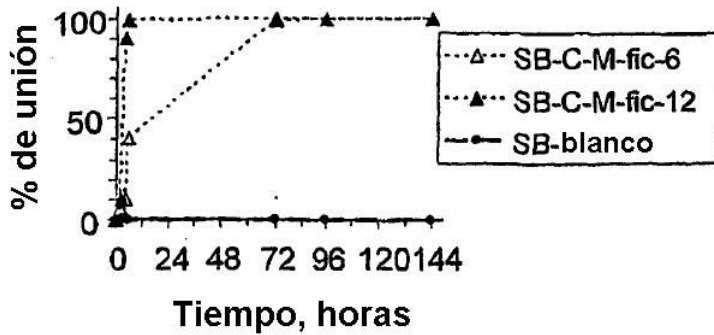


Fig. 9C

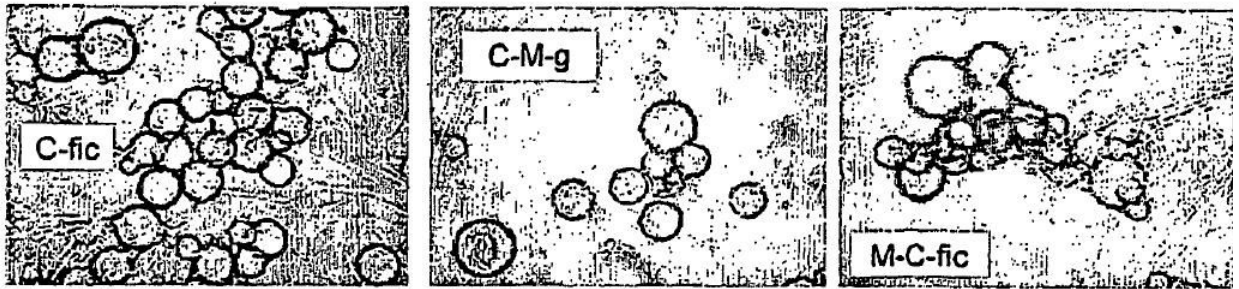


Fig. 10

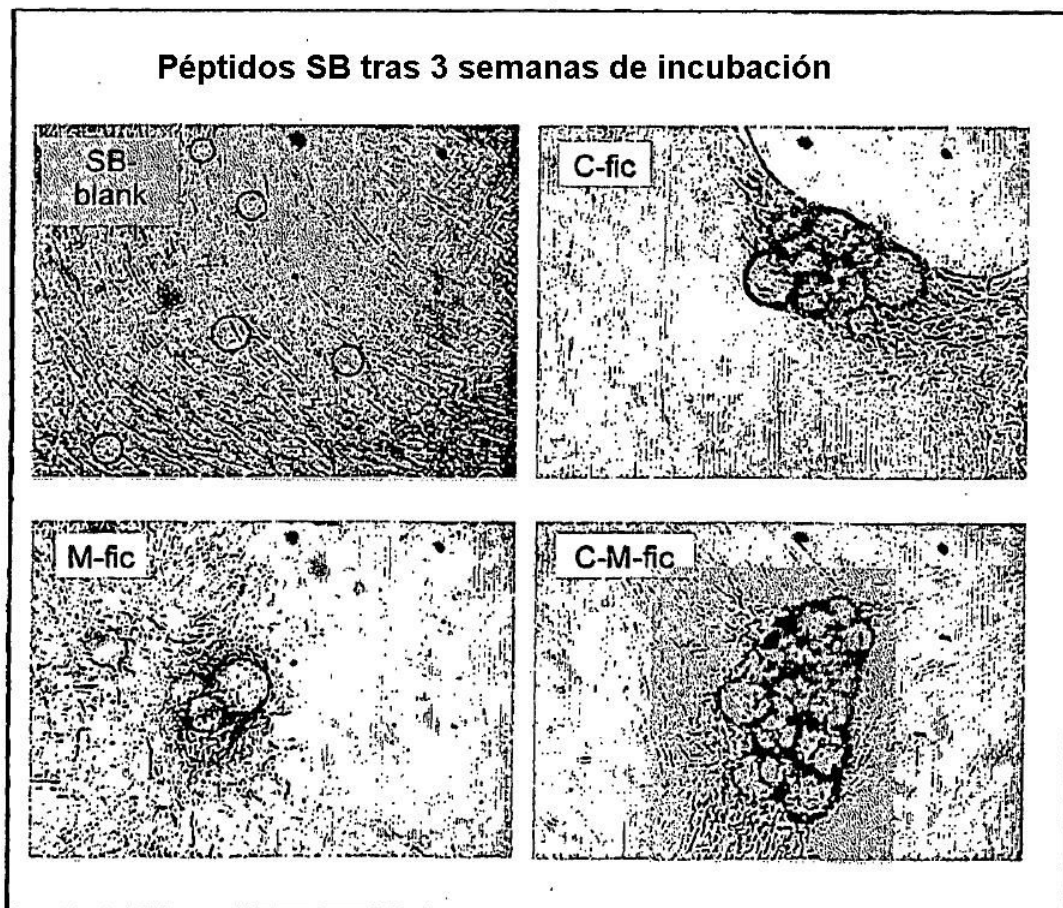


Fig. 11

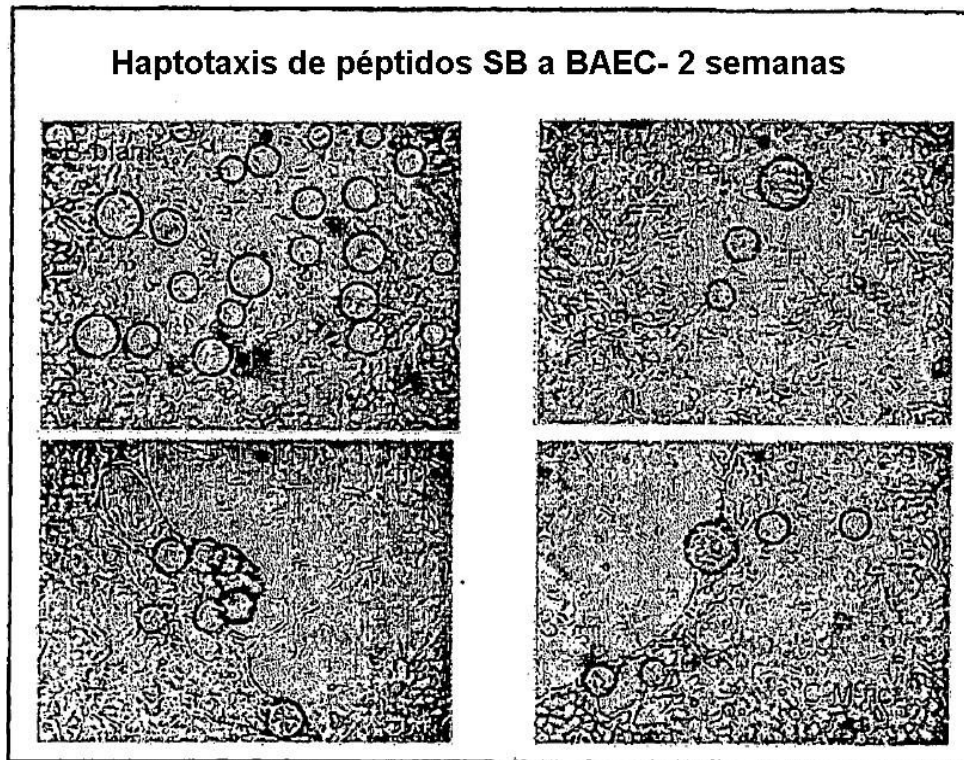


Fig. 12

Toxicidad de nuevos péptidos de ficolina con FF-48 horas

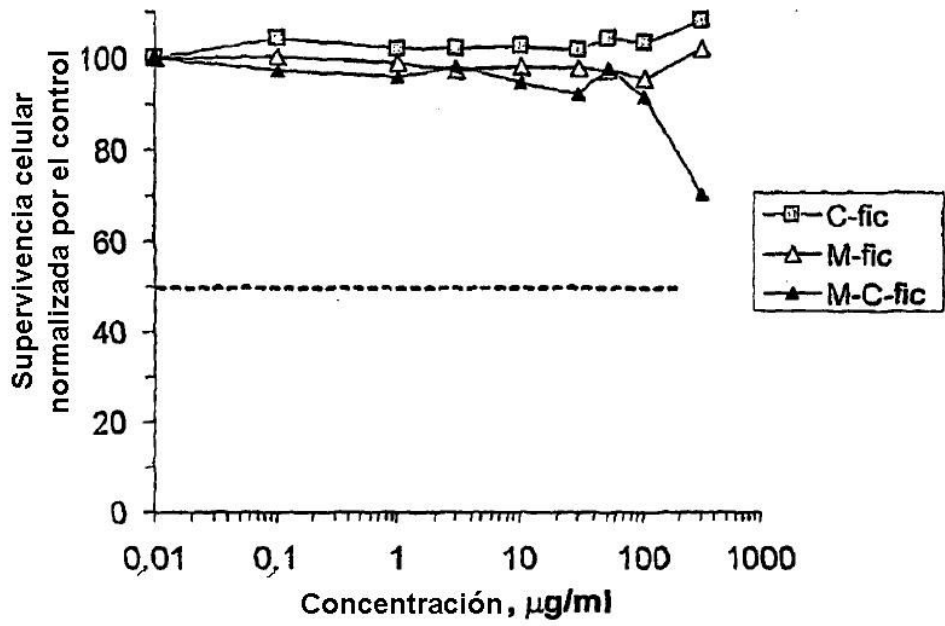


Fig. 13A

Toxicidad de nuevos péptidos de ficolina con BAEC - 48 horas

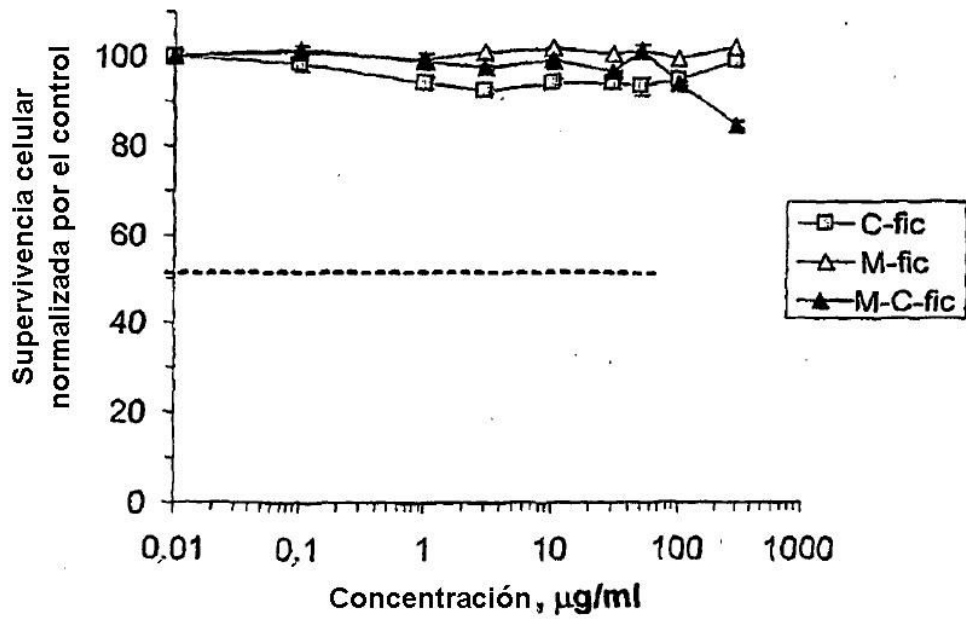


Fig. 13B

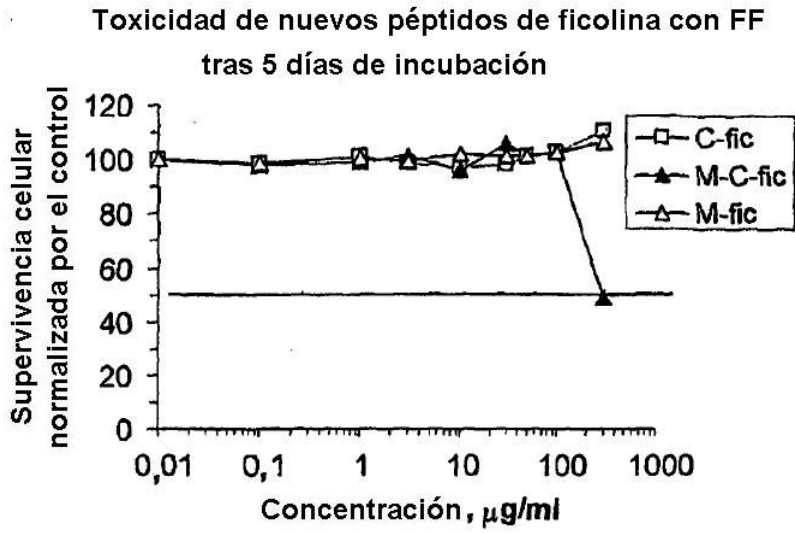


Fig. 14A

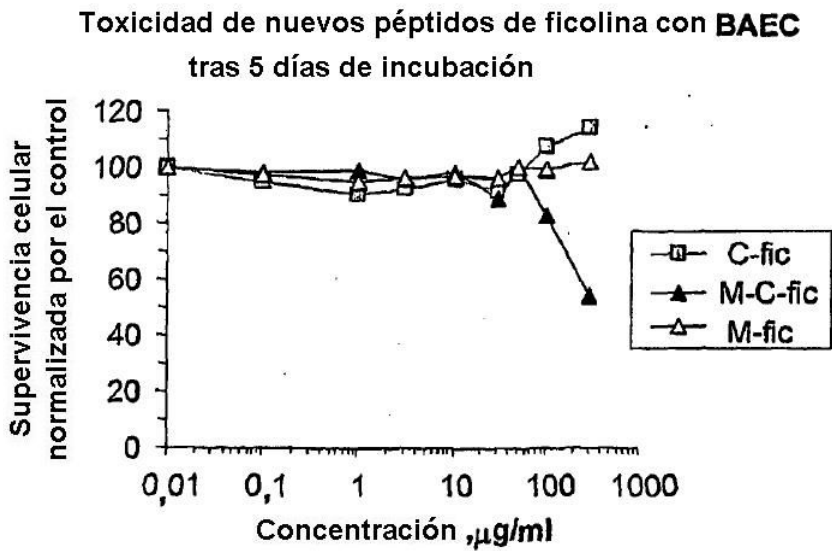


Fig. 14B

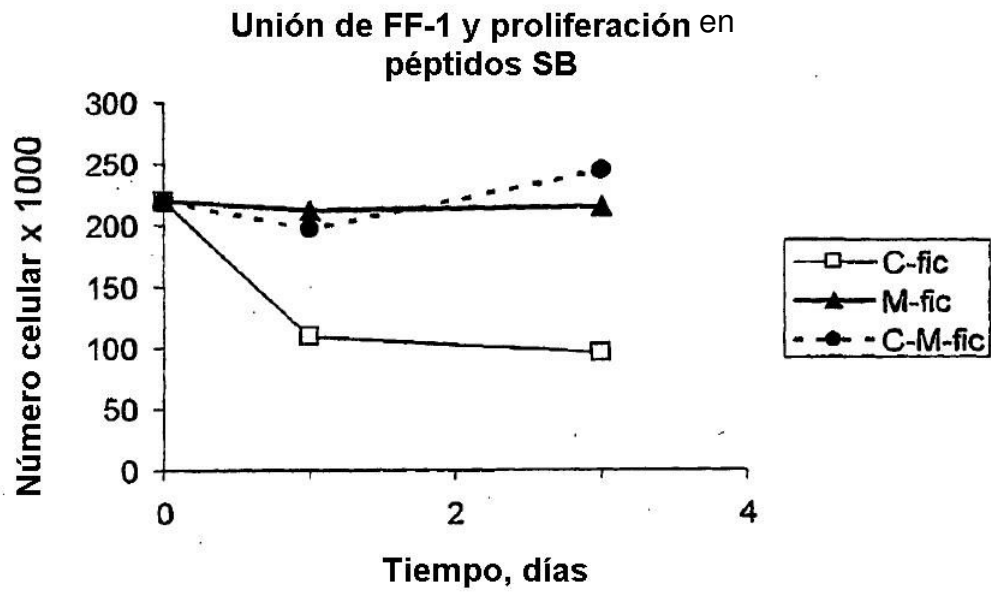


Fig. 15