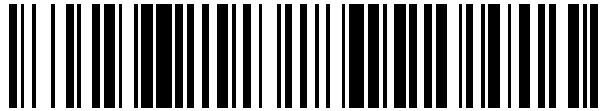


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 090**

51 Int. Cl.:

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2004 E 04705973 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 1589987**

54 Título: **Uso de péptidos derivados de la catelicidina LL-37 para usar en el tratamiento de heridas crónicas**

30 Prioridad:

29.01.2003 SE 0300207
05.02.2003 US 444964 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2014

73 Titular/es:

LIPOPEPTIDE AB (100.0%)
Karolinska Institutet Science Park (KISP),
Fogdevreten 2
171 65 SOLNA , SE

72 Inventor/es:

ST HLE-BÄCKDAHL, MONA;
HEILBORN, JOHAN;
CARLSSON, ANDERS y
BOGENTOFT, CONNY

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 467 090 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

Uso de péptidos derivados de la catelicidina LL-37 para usar en el tratamiento de heridas crónicas

La presente invención se refiere al péptido LL-37 para uso en el tratamiento de úlceras crónicas debidas a una insuficiencia venosa o debidas a una diabetes.

5 **Antecedentes de la invención**

Los epitelios constituyen la barrera primaria entre el huésped y el entorno potencialmente nocivo, y, por lo tanto, es vital la protección de esta interfase. Una herida representa una barrera rota y pone inmediatamente en marcha una serie de procesos íntimamente orquestados con la finalidad de restablecer rápidamente la integridad de la barrera. El cierre urgente de heridas ha evolucionado en los organismos superiores, separándose del proceso de regeneración completa del tejido que se ve en especies inferiores y que lleva mucho tiempo. Una cicatrización de heridas alterada representa un gran reto en la medicina clínica, yendo desde el retraso relativo en la cicatrización "normal" que se ve al aumentar la edad hasta las úlceras patológicas que no cicatrizan.

Las úlceras crónicas constituyen un problema clínico importante y, aunque nuestro conocimiento del proceso fisiológico de las heridas ha aumentado a lo largo de los últimos decenios, sólo se han alcanzado mejoras terapéuticas de poca importancia. Distintas etiologías pueden estar debajo del desarrollo de ulceraciones en diferentes estados clínicos pero, sea cual sea la causa, las úlceras que no cicatrizan se caracterizan por una incapacidad del epitelio para migrar, proliferar y cerrar el defecto en la barrera. El tipo más común de úlceras cutáneas crónicas es el de las úlceras en las piernas a causa de una insuficiencia venosa. Estos pacientes desarrollan edemas venosos periféricos con la subsiguiente ulceración de la piel, mientras que la circulación arterial permanece intacta. Las úlceras en las piernas y pies a causa de deficiencias arterioscleróticas son menos comunes.

Además, se desarrollan úlceras cutáneas en asociación con enfermedades inmunes tales como el pioderma gangrenoso y la vasculitis. El tratamiento actual incluye una inmunosupresión sistémica de larga duración y no siempre es eficaz. Los defectos epiteliales y úlceras en las membranas mucosas orales, genitales y gastrointestinales son comunes y causan mucha aflicción. Los mecanismos patológicos subyacentes no siempre están claros, tal como en las aftas y los líquenes erosivos, y el tratamiento es poco satisfactorio.

El cuidado tradicional de las heridas implica la separación, mecánica o enzimática, de los restos necróticos para permitir la formación de tejido de granulación. Las heridas que resultan intensamente colonizadas por bacterias pueden requerir un tratamiento antiséptico para evitar una infección invasiva. Se emplean numerosos agentes antimicrobianos tópicos, tales como yodo, clorhexidina, peróxido de hidrógeno, plata y antibióticos, pero se debe tener en cuenta el riesgo de efectos tóxicos de estos agentes sobre la matriz y la neoepidermis. Una vez que la herida está limpia de tejido necrótico, se deberían utilizar apósitos para promover la formación de tejido de granulación. Se dispone de una gran variedad de dichos apósitos, y numerosos estudios con animales y pruebas clínicas han demostrado su efecto beneficioso sobre la cicatrización de heridas.

Cierta proporción de las heridas permanecen resistentes a la terapia, y se necesita un tratamiento adicional. Durante el último decenio ha habido mucha convergencia en el potencial uso de factores de crecimiento para acelerar la reparación de heridas. Los factores de crecimiento son moléculas que controlan procesos celulares que son críticos en la reparación de los tejidos, incluyendo la migración y la proliferación celulares, la angiogénesis y la síntesis *de novo* de matriz extracelular. Se ha sugerido el efecto beneficioso de dichos factores de crecimiento en una gran variedad de pruebas (Scharffetter-Kochanek et al., *Basic Res. Cardiol.* 93: 1-3, 1999). Sin embargo, hasta la fecha, el tratamiento de úlceras crónicas con factores de crecimiento ha sido en gran medida decepcionante en la práctica clínica. En la actualidad, la becaplermina (Regranex[®]), autorizada en EE.UU. y Europa pero no en Suecia, es el único factor de crecimiento que se emplea, preferentemente en úlceras diabéticas en los pies. Se piensa que las razones del fracaso clínico de los factores de crecimiento en el tratamiento de las úlceras crónicas incluyen problemas de distribución y una rápida degradación.

En paralelo, se ha producido el desarrollo de terapias tisulares usando materiales autólogos y alogénicos en equivalentes de piel humana biodiseñados. Los queratinocitos epidérmicos cultivados constituyen un tratamiento eficaz para el cubrimiento de grandes zonas de piel dañada en, por ejemplo, pacientes con quemaduras, pero el tratamiento es costoso, lleva mucho tiempo y requiere servicios de laboratorio. Para proporcionar un sustrato dérmico se han utilizado múltiples estrategias, tales como un cadáver humano acelular y colágeno bovino con o sin células. Todos los métodos disponibles presentan considerables desventajas, tales como la posible transmisión de una enfermedad y unos costes elevados, y apenas son adecuados para un cuidado básico de las heridas.

Los péptidos antimicrobianos son moléculas efectoras del sistema inmune innato que sirven para proteger al huésped frente a microorganismos potencialmente nocivos. Se han conservado a través de la evolución y están muy extendidos en la naturaleza. En el ser humano sólo se han identificado hasta ahora unos pocos, entre los cuales las defensinas y el péptido antimicrobiano humano de catelicidina hCAP18 han sido implicados en la defensa epitelial

(Selsted et al., *J. Biol. Chem.* 258: 14.485-14.489, 1983).

El Documento WO 96/08508 se refiere al polipéptido humano FALL-39, así como a composiciones farmacéuticas que contienen dicho péptido y tienen una actividad antimicrobiana frente a bacterias. El péptido fue denominado FALL-39 por los cuatro primeros restos de aminoácido y consistía en la parte C-terminal de 39 aminoácidos de una proproteína concomitantemente identificada por tres grupos distintos (Cowland et al., *FEBS*, 1995; Agerberth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; Larrick et al., *FEBS Letters*, 1996). Se mostró que el péptido presenta una potente actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Una caracterización ulterior del péptido C-terminal demostró una secuencia más corta que comprendía 37 aminoácidos salvo los dos primeros (FA) para dar lugar a LL-37, que es la denominación actual aceptada (Gudmundsson et al., *Eur. J. Biochem.* 238: 325-332, 1996).

La proproteína fue denominada hCAP18, proteína antimicrobiana catiónica humana (en inglés, *human cationic antimicrobial protein*), y es un miembro de la familia de proteínas catelicidinas que consiste en la catelina, que se ha conservado a través de la evolución, y una parte C-terminal, variable en diferentes especies. En el hombre, la hCAP18 es el único miembro de esta familia de proteínas, mientras que, en otras especies, tales como el ratón y el cerdo, hay varios miembros. Se piensa que el péptido C-terminal LL-37 actúa extracelularmente, y no hay evidencia alguna de escisión intracelular de la proproteína. La hCAP18/LL-37 está presente en los leucocitos y en órganos barrera tales como la piel, las membranas mucosas, el epitelio respiratorio y los órganos reproductores. Parece que la localización de hCAP18/LL-37 en epitelios barrera es consistente con un papel protector del péptido en cuanto a prevenir una infección local y una invasión microbiana sistémica. LL-37 se describe como un péptido exento de cisteína que puede adoptar una conformación α -helicoidal anfipática, o anfifílica en otras palabras. Parece que se requiere una elevada condición catiónica en combinación con una estructura α -helicoidal anfipática estabilizada para el efecto antimicrobiano de dichos péptidos frente a bacterias Gram positivas y hongos, como se ha mostrado experimentalmente (Giangaspero et al., *Eur. J. Biochem.* 268: 5589-5600, 2001). Parece que la estructura anfipática y α -helicoidal es menos crítica para la muerte de bacterias Gram negativas. En asociación con la inflamación, la hCAP18/LL-37 está suprarregulada en el epitelio cutáneo (Frohman et al., *J. Biol. Chem.* 272: 15.258-15.263, 1997) y las membranas mucosas (Frohman Nilsson et al., *Infect. Immun.* 67: 2561-2566, 1999).

Técnica previa

Dorschner et al., *J. Invest. Dermatol.* 117: 91-97, 2001, demostraron que la expresión de catelicidinas estaba aumentada en pieles humana y murina después de una incisión y que la falta del gen homólogo murino de catelicidina impide la protección frente a una invasión de estreptococos del Grupo A en dichos ratones.

En el Documento WO 96/09322, Children's Medical Center Corporation, se describe que el péptido antibacteriano PR-39 posee actividad inductora de los sindecanos 1 y 4 y, por lo tanto, podría simultáneamente reducir una infección y, como una sinducina, influir en la acción de factores de crecimiento, componentes matriciales y otros efectores celulares implicados en la reparación tisular. Las sinducinas podrían ser administradas en un vehículo farmacéutico, tal como en liposomas convencionales.

El Documento EP 0 935 965 A1, Toray Industries, Inc., se refiere a un agente anti-pylori que contiene un péptido antimicrobiano, tal como el péptido PR-39 porcino, como un agente activo. Se concluye que la administración exógena de PR-39 ejerce actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* y acelera la cicatrización de úlceras gástricas en la rata. Se menciona FALL39 como uno de los miembros de la familia de catelinas.

En el Documento US 6.255.282, Helix Biomedix, Inc., se describen nuevos péptidos líticos sintéticos que comparten propiedades estructurales y funcionales de diferentes péptidos líticos conocidos. Se describe especialmente un péptido de 18 a aproximadamente 40 aminoácidos que tiene una conformación α -helicoidal. Sin embargo, no se mencionan los péptidos líticos de catelicidina.

Frohman Nilsson, *Thesis*, Karolinska Institutet, Estocolmo, 2001, demostró concomitantemente que la proteína antimicrobiana de catelicidina humana, hCAP18, es inducida en heridas en piel humana, con niveles elevados y liberación del péptido C-terminal activo, LL-37, en úlceras cicatrizantes fisiológicas pero no en úlceras no cicatrizantes crónicas. Se detectó hCAP18 en el lecho de la herida y en el epitelio durante la cicatrización normal de las heridas pero estaba ausente en el epitelio de las úlceras crónicas en las piernas y sólo se detectaba en el lecho de la herida y el estroma. Se especuló que bajos niveles de hCAP18 y la falta de la misma en el epitelio de las úlceras crónicas contribuyen a una cicatrización deteriorada.

Zasloff, *Nature* 415: 389-395, 2002, en una revisión de péptidos antimicrobianos, discute las diversas aplicaciones que han sido demostradas para dichos péptidos como agentes antiinfectivos y describe péptidos antimicrobianos en el desarrollo farmacéutico.

El Documento EP 1 358 888 A1, Bals et al., que tiene una fecha de publicación de 5 de noviembre de 2003, se refiere al uso del péptido LL-37 para la prevención o el tratamiento de una enfermedad causada por un flujo sanguíneo reducido y la arteriosclerosis y para el tratamiento de heridas debidas a un suministro de sangre arterial

reducido. Se muestra la capacidad de LL-37 para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos y estimular la proliferación de células endoteliales. La invención se refiere completamente al efecto angiogénico y en ella no hay ninguna mención a epitelios.

- 5 Aunque se ha sugerido un uso terapéutico de péptidos antimicrobianos, en particular de LL-37, esto no se ha hecho efectivo hasta ahora. Con el péptido en concentraciones elevadas, LL-37 ejerce un efecto citotóxico. Sin embargo, los posibles efectos citotóxicos ejercidos por LL-37 son inhibidos en presencia de suero, pero se deberían evitar las formulaciones farmacéuticas que contienen suero a causa del riesgo de transmisión de enfermedades, la accesibilidad restringida y los costes elevados.

Sumario de la invención

- 10 El péptido antimicrobiano humano hCAP18 está suprarregulado en el epitelio cutáneo como una respuesta normal a un daño. Sin embargo, en úlceras no cicatrizantes crónicas en las piernas sólo se encontraron bajos niveles de hCAP18. Resulta notable que, en las úlceras crónicas en las piernas, hCAP18 y LL-37 estaban totalmente ausentes en el epitelio pero presentes en el infiltrado inflamatorio en el lecho de la herida y en el estroma. Hemos mostrado ahora que se induce hCAP18 durante la reepitelización de heridas en piel sometida a cultivo de órganos y que esta reepitelización era inhibida por anticuerpos contra LL-37 de un modo dependiente de la concentración. Estos hallazgos sugieren que LL-37 desempeña un papel crucial en el cierre de las heridas, actuando como un factor de crecimiento. La invención concierne al uso de LL-37, para compensar la falta de LL-37 natural producido *in vivo*, en el tratamiento de úlceras crónicas debidas a una insuficiencia venosa o debidas a una diabetes.

- 20 También se mostró que la suprarregulación de hCAP18 y/o la adición de péptido LL-37 estimulan la proliferación de células epiteliales y estromales normales, lo que sugiere que también se podrían potenciar la cicatrización normal de heridas y la regeneración epitelial normal.

También se halló que la citotoxicidad de LL-37 podría estar reducida en una composición que comprendiera ciertos lípidos.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La Figura 1 es un dibujo esquemático de la proteína hCAP18 de 18 kDa que consiste en un péptido señal, S.P. (del inglés, signal peptide), la parte conservada de catelina, y el péptido antimicrobiano LL-37, que es enzimáticamente cortado *in vivo*.

La Figura 2 es un dibujo esquemático de la familia de proteínas catelicidinas, que ilustra la diversidad de péptidos C-terminales en diferentes especies.

- 30 Las Figuras 3A, 3B y 3C muestran la secuencia de cDNA del vector pIRES2-EGFP que incluye la secuencia de codificación para hCAP18, usada para la expresión transgénica de hCAP18.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un péptido LL-37 así como a sales farmacéuticamente aceptables del mismo. LL-37 tiene la secuencia de aminoácidos ID. SEC. nº 1:

- 35 H-Leu-Leu-Gly-Asp-Phe-Phe-Arg-Lys-Ser-Lys-Glu-Lys-Ile-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Glu-Ser-OH, para uso en el tratamiento de úlceras crónicas debidas a una insuficiencia venosa o debidas a una diabetes.

Las sales farmacéuticamente aceptables contienen acetato.

La secuencia de aminoácidos del péptido de la invención se proporciona en la tabla siguiente.

ID. SEC. nº	Péptido	Secuencia de aminoácidos
1	LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES

- 40 Se puede utilizar LL-37 como un medicamento para la proliferación celular, la regeneración epitelial y la cicatrización de heridas normales o crónicas, y como un agente antimicrobiano.

Se cree que LL-37 tiene el potencial para formar una estructura α -helicoidal en condiciones fisiológicas.

Se pueden emplear un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

- a) ID. SEC. nº 1

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo para potenciar la proliferación de células epiteliales y/o estromales a través de un mecanismo no lítico, y para la regeneración epitelial y la cicatrización del epitelio y el estroma de heridas, en úlceras crónicas debidas a una insuficiencia venosa o debidas a una diabetes.

5 La presente invención se refiere especialmente al uso del péptido LL-37 que tiene la secuencia de aminoácidos ID. SEC. nº 1 en forma de una sal, preferiblemente una sal de acetato.

10 LL-37 posee una carga neta positiva (+5 - +7) en pH neutro debido a los restos de los aminoácidos catiónicos lisina y arginina en la estructura primaria. Los otros restos de aminoácido son apolares/hidrófobos o polares y neutros, o, en menor grado, polares y negativamente cargados, lo que hace que la molécula peptídica completa sea anfipática. Los péptidos de este tipo interaccionan electrostáticamente con las paredes fosfolipídicas negativamente cargadas de las células microbianas insertando la cara hidrófoba en la bicapa. Una reducción de la hidrofobia y/o la carga reduce el efecto antimicrobiano de los péptidos. Se ha mostrado que el efecto citotóxico ejercido por los péptidos sobre las células huésped, a menudo evaluado como actividad hemolítica, se correlaciona con sus efectos antimicrobianos (Chen et al., *FEBS Lett.* 236: 462-466, 1988). Diversos estudios han confirmado que esto también es cierto para otros péptidos antimicrobianos α -helicoidales anfipáticos.

15 Estudios sobre el péptido C-terminal, que tiene una longitud de 37 aminoácidos, de CAP18 de conejo (Cap18₁₀₆₋₁₄₂) han mostrado que se conserva la actividad antibacteriana de amplio espectro en la secuencia N-terminal muy básica de 20 restos, pero no si se trunca el extremo N (Larrick et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2534-2539, 1993).

Se puede sintetizar LL-37 usando un sintetizador automático de péptidos y métodos estándares para las síntesis de péptidos.

20 La invención se refiere al uso del péptido LL-37 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de las úlceras crónicas. Dichas úlceras crónicas pueden ser debidas a una insuficiencia venosa, tales como las úlceras de las piernas, o debidas a una diabetes. Los péptidos de la invención pueden ser también utilizados para el tratamiento de heridas debidas a traumas o quemaduras. Los péptidos descritos pueden ser especialmente utilizados para la regeneración de tejido epitelial, y para potenciar la regeneración epidérmica después de una microdermoabrasión.

25 Además de ser tóxico para la célula, LL-37 es rápidamente degradado en el entorno de las heridas. Se ha mostrado recientemente que la serina proteinasa 3 es responsable de la escisión extracelular de hCAP18 (Sørensen et al., *Blood* 97: 3951-3959, 2001).

30 Con objeto de evitar la descomposición del péptido y reducir además la citotoxicidad intrínseca, el péptido puede ser formulado con un vehículo lipídico polar. Dicha formulación debería facilitar la administración del péptido a la herida y proporcionará además una liberación ininterrumpida del péptido después de la administración. La estabilidad del péptido resultará mejorada tanto *in vivo* como *in vitro*.

El péptido de catelicidina, además de ser LL-37 en el ser humano, puede proceder de especies animales diferentes, y es, por ejemplo, SC5 de oveja, Bac5 de vaca, PR-39 de cerdo, CRAMP de ratón y p15 de conejo; véase la Figura 2.

35 Una bicapa se refiere normalmente a las disposiciones laminares de lípidos polares en agua. Las cadenas acílicas forman la parte hidrófoba interna, y los grupos de cabeza polar la parte hidrófila de la bicapa. Como ejemplos de dichos lípidos polares que forman bicapas, sean de origen natural o sintético, se pueden mencionar la fosfatidilcolina, el fosfatidilglicerol, el digalactosil-diacilglicerol, la esfingomielina y similares. Dependiendo de la concentración de dichos lípidos polares en disolventes polares, tales como el agua, se pueden formar liposomas o geles viscosos del tipo líquido-cristalino laminar.

40 La composición farmacéutica puede comprender un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

a) ID. SEC. nº 1

en forma de sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en combinación con un vehículo que consiste en una disolución acuosa y un lípido polar formador de bicapas.

45 Los lípidos polares formadores de bicapas preferidos que se van a mezclar o formular con el péptido son aquellos que son neutros en cuanto a la carga. Son especialmente útiles los digalactosil-diacilgliceroles y otros glicolípidos, tales como las glicosil-cerámidas, sean naturales o sintéticos, en que un componente de carbohidrato no iónico constituye el grupo de cabeza polar. Son menos preferidos, aunque aún útiles, los lípidos polares que son iónicos dipolares y neutros en condiciones fisiológicas, tales como la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y la esfingomielina. Los menos preferidos son aquellos lípidos polares que están negativamente cargados y forman por

50 ello complejos fuertes con el péptido positivamente cargado.

Dicho vehículo lipídico polar que forma bicapas es preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en

fosfolípidos, galactolípidos y esfingolípidos.

Un lípido polar formador de bicapas especialmente preferido es el digalactosil-diacilglicerol o las mezclas de lípidos polares ricas en digalactosil-diacilgliceroles, a causa de la muy buena tolerabilidad cutánea de esta clase de lípidos polares. Los digalactosil-diacilgliceroles son una clase de lípidos que pertenecen a la familia de los glicolípidos, componentes bien conocidos de las membranas de las células vegetales. Una de las clases más abundantes contiene dos unidades de galactosa, y la nomenclatura y la abreviatura comúnmente utilizadas de aquélla es digalactosil-diacilglicerol, DGDG, a la que a veces se hace referencia como galactolípidos. Se han investigado los galactolípidos, principalmente el DGDG y los materiales ricos en DGDG, y se ha hallado que son materiales tensoactivos de interés en aplicaciones industriales tales como alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. En el Documento WO 95/20944 se describe el uso de un material rico en DGDG, un "material galactolípido", como un material formador de bicapas en disolventes polares para usos farmacéutico, nutricional y cosmético. En dicha solicitud no se describe el uso de galactolípidos en combinación con péptidos y proteínas en general, ni particularmente con un péptido de la presente invención.

Se puede utilizar una composición farmacéutica en donde el vehículo lipídico polar formador de bicapas sea una mezcla de lípidos polares rica en digalactosil-diacilgliceroles.

Otro aspecto preferido de la invención es una composición farmacéutica en donde el péptido está en forma de acetato. Un péptido preferido es LL-37 en forma de una sal de acetato. Se puede utilizar una composición farmacéutica que comprenda una combinación de un acetato de LL-37 y CPL-Galactolipid como vehículo lipídico formador de bicapas. El CPL-Galactolipid es una marca comercial de una fracción galactolípida que consiste en 50-70% en peso de digalactosil-diacilgliceroles y 30-50% de otros lípidos polares.

La relación entre el péptido en forma de sal y un vehículo galactolípido en la composición farmacéutica debería ser preferiblemente de 1:5 a 1:50, especialmente de 1:10 a 1:25, en peso.

Además del lípido formador de bicapas, el vehículo contiene también una disolución acuosa. Una disolución acuosa se refiere a una disolución que tiene propiedades fisiológica o farmacéuticamente aceptables en cuanto a pH, fuerza iónica, isotonicidad, etc. Como ejemplos se pueden mencionar disoluciones isotónicas de agua y otros disolventes biocompatibles, disoluciones acuosas, tales como disoluciones salinas y disoluciones de glucosa, y materiales formadores de hidrogeles. La disolución acuosa puede estar tamponada, tal como la disolución salina tamponada con fosfato, PBS (del inglés, phosphate-buffered saline).

La composición farmacéutica puede comprender además excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como un conservante para evitar el crecimiento microbiano en la composición, antioxidantes, agentes para impartir isotonicidad, agentes colorantes y similares. En las suspensiones acuosas, las composiciones se pueden combinar con agentes suspendedores y estabilizantes.

La naturaleza coloidal de la composición hace posible preparar asépticamente la composición usando una operación final de esterilización por filtración.

Con objeto de formar un gel, el péptido puede ser preferiblemente formulado con un material formador de hidrogeles. Los ejemplos de materiales formadores de hidrogeles son polímeros sintéticos, tales como poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli(ácido acrílico), polietilenglicol, copolímeros de bloques poloxámeros, y similares; polímeros semisintéticos, tales como éteres de celulosa, incluyendo carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxipropilcelulosa y etilhidroxietilcelulosa, y similares; y gomas naturales, tales como goma arábica, carragenano, quitosano, pectina, almidón, goma xantana y similares.

Es ventajoso emplear un hidrogel que sea mucoadhesivo. A este respecto, es particularmente útil emplear ácido hialurónico y derivados del mismo, poli(ácidos acrílicos) reticulados de los tipos carbómero y policarbófilo, polímeros que forman rápidamente geles, que son conocidos por adherirse fuertemente a membranas mucosas.

También es ventajoso utilizar copolímeros de bloques del tipo poloxámero, es decir, polímeros que consisten en bloques de polietilenglicol y polipropilenglicol. Ciertos poloxámeros dispersados en agua son termorreversibles: a temperatura ambiental son poco viscosos pero presentan un acusado aumento de viscosidad a temperaturas elevadas, lo que da lugar a la formación de un gel a la temperatura corporal. De este modo se puede prolongar el tiempo de contacto de una formulación farmacéutica administrada a la herida relativamente tibia y, por lo tanto, se puede mejorar la eficacia del péptido incorporado.

La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la invención puede ser formulada para administración tópica o entérica, es decir, para las administraciones oral, bucal, sublingual, mucosa, nasal, bronquial, rectal y vaginal.

Los ejemplos no restrictivos de composiciones farmacéuticas para administración tópica son disoluciones, composiciones pulverizables, suspensiones, emulsiones, geles y membranas. Si se desea, se puede utilizar una

venda o una tirita o gasa a las que se ha añadido la composición farmacéutica. Para la administración entérica se pueden emplear tabletas, cápsulas, disoluciones o suspensiones.

Se puede emplear un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos

a) ID. SEC. nº 1,

5 en forma de sales o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo, para la proliferación *in vitro* de células epiteliales y/o estromales a través de un mecanismo no lítico.

Dicha proliferación puede ser especialmente utilizada para la proliferación *in vitro* de células epiteliales y estromales autólogas humanas.

10 Un medio de crecimiento para cultivar células eucarióticas, tales como células epiteliales y/o estromales, comprende LL-37 en combinación con un medio basal. Se puede añadir un agente reductor de la citotoxicidad, tal como suero. Se ha hallado que la apolipoproteína A-I (apoA-I) es la principal proteína ligante de LL-37 en el plasma humano y actúa como un agente supresor de LL-37 (Wang et al., *J. Biol. Chem.* 273: 33.115-33.118, 1998; Sørensen et al., *J. Biol. Chem.* 274: 22.445-22.451, 1999), lo que sugiere un mecanismo implicado en la regulación de un péptido de catelicidina. El agente reductor de la citotoxicidad puede ser también un lípido polar formador de bicapas, tal como
15 un lípido seleccionado del grupo que consiste en fosfolípidos, galactolípidos y esfingolípidos, como se describió anteriormente.

20 El medio basal del medio de crecimiento se basa en agua doblemente destilada y un número de los ingredientes siguientes: sales inorgánicas, rojo fenol, glucosa, timidina, y hipoxantina, HEPES, piruvato sódico, aminopterina, aminoácidos y vitaminas. Para el cultivo *in vitro* de células epiteliales, tales como, por ejemplo, queratinocitos, el medio de crecimiento puede consistir en medio basal y un kit promotor del crecimiento que incluya a) péptido LL-37 en una disolución de sal, b) penicilina + estreptomina, c) insulina, d) transferrina, e) triyodotironina, f) hidrocortisona, g) toxina colérica, y un agente reductor de la citotoxicidad seleccionado, tal como suero o un lípido polar. Para el cultivo *in vitro* de células estromales, tales como, por ejemplo, fibroblastos, un medio de crecimiento puede consistir en medio basal y un kit promotor del crecimiento que incluya a) péptido LL-37 en una disolución de sal, b) penicilina + estreptomina, y un agente reductor de la citotoxicidad seleccionado, tal como suero o un lípido polar.
25

30 Se puede usar un método para potenciar la expansión *in vitro* de células epiteliales y estromales autólogas humanas para un trasplante de células *in vivo*, en donde las células son aisladas de un trozo extirpado de piel sana, dichas células aisladas son cultivadas *in vitro* en dicho medio de crecimiento, y las células cultivadas son posteriormente recolectadas y usadas para el tratamiento de heridas, tales como úlceras y lesiones por quemaduras.

Se puede utilizar un kit promotor del crecimiento que comprenda el péptido LL-37 o un péptido como el descrito y un lípido polar formador de bicapas y reductor de la citotoxicidad, opcionalmente en combinación con antibióticos, medios basales y otros aditivos convencionales en recipientes separados.

35 Se puede llevar a cabo la transfección de queratinocitos humanos autólogos con una construcción de cDNA de hCAP18 de longitud completa para el trasplante celular a úlceras y quemaduras. La construcción de cDNA es diseñada para permitir la regulación de la expresión génica de hCAP18 mediante un mecanismo de cambio (Resnitzky et al., *Mol. Cell. Biol.* 14: 1669-1679, 1994). Los queratinocitos humanos autólogos se obtienen de un trozo de piel sana extirpado del paciente. Los queratinocitos son aislados y son multiplicados en cultivo celular del modo descrito. Los queratinocitos son transfectados con la construcción de cDNA. Los queratinocitos transfectados son adicionalmente multiplicados *in vitro* y devueltos al paciente.
40

Finalmente, también se puede utilizar una construcción génica que comprenda la secuencia de cDNA completa de hCAP18 que tiene la secuencia ID. SEC. nº 20, para la transfección de células epiteliales y/o estromales con objeto de potenciar la proliferación de dichas células.

Ejemplos

45 Ejemplo 1. Preparación de péptidos sintéticos

50 Se sintetizó el péptido LL-37 de acuerdo con una síntesis en fase sólida con la estrategia del 9-fluorenilmetoxicarbonilo/terc-butilo. El péptido crudo, como sal de trifluoroacetato, fue purificado por HPLC y fue finalmente aislado mediante liofilización (lote 971/26, de PolyPeptide Laboratories A/S, Hilleröd, Dinamarca). Se determinó la pureza por medio de HPLC e integración de áreas y se halló que era de 99%. El peso molecular fue analizado usando espectrometría de masas y se correspondía con el valor teórico de 4493 g/mol para la base libre. El análisis de la composición de aminoácidos mostró que las cantidades relativas de cada aminoácido se correspondían con los valores teóricos para LL-37. Se calculó el contenido de péptido a partir de los resultados del

análisis de aminoácidos y se halló que era de 73%, siendo el resto contraiones y disolvente residual.

Se sintetizaron varias tandas de LL-37, y el péptido LL-37 usado en los Ejemplos 2 y 5 siguientes estaba en forma de la sal de acetato.

Se sintetizaron consiguientemente los péptidos LL-36 y LL-38 en forma de acetato.

5 Los diferentes péptidos usados en los siguientes ejemplos y ensayos fueron los siguientes.

Péptido	Contraión	Lote	Pureza % de área	Contenido de péptido % (peso/peso)	Usado en	Año de fabricación
LL-37	Trifluoroacetato	YS 5253	98		Ej. 3, 4, 6, 7 Ensayo 3	1997
LL-37	Trifluoroacetato	971/26	99	73	Ensayo 5	2002
LL-37	Acetato	990/37/A	99	83	Ej. 2, 5 Ensayo 4	2003
LL-38	Acetato	990/38			Ensayo 4	2003
LL-36	Acetato	990/39			Ensayo 4	2003

Ejemplo 2. Preparación de una composición farmacéutica que comprende una mezcla de péptido LL-37 y vehículo lipídico

Se preparó una composición farmacéutica usando los ingredientes siguientes:

Ingrediente	Concentración
LL-37	100 ppm*
CPL-Galactolipid	0,20 %
Glicerol al 2,6% en agua estéril	hasta el 100%

10 *ppm = partes por millón (en peso)

Se pesaron el péptido LL-37, en forma de la sal de acetato (lote 990/37/A), y el vehículo lipídico, CPL-Galactolipid, obtenido de Lipocore Holding AB, un material lipídico rico en digalactosil-diacilgliceroles y preparado a partir de avenas, en un matraz de vidrio de 50 ml de capacidad. Se mezclaron suavemente los dos ingredientes y luego se añadió la disolución de glicerol. La mezcla fue sacudida enérgicamente durante 120 minutos y fue luego dejada en reposo durante 1 hora. La composición resultante era una dispersión fina y homogénea. Se mantuvo refrigerada hasta su uso.

Ejemplo 3. Preparación de mezclas acuosas que comprenden el péptido LL-37 y un vehículo lipídico

Se prepararon mezclas de LL-37, en forma de la sal de trifluoroacetato (lote 971/26), y un vehículo lipídico polar formador de bicapas usando los ingredientes siguientes (los porcentajes son en peso por peso).

20 Tabla 1.

Ingrediente	A1	A2	B1	B2	C1	C2
LL-37	100 ppm	–	90	–	92	–
CPL-Galactolipid	0,19%	0,20%	–	–	–	–
Epikuron 200	–	–	0,19%	0,19%	–	–
CPL-Sphingomyelin	–	–	–	–	0,19%	0,19%
DMEM	hasta el 100%	hasta el 100%	hasta el 100%	hasta el 100%	hasta el 100%	hasta el 100%

25 CPL-Galactolipid, obtenido de Lipocore Holding AB, es una fracción galactolipídica cromatográficamente purificada procedente de avenas, Epikuron 200, obtenido de Lucas Meyer GmbH, es fosfatidilcolina de soja, y CPL-Sphingomyelin, obtenido de Lipocore Holding AB, es esfingomielina cromatográficamente purificada procedente de leche bovina. DMEM (del inglés, Dulbecco's modified Eagle's medium), medio de Eagle modificado por Dulbecco, de Invitrogen Corp., es una disolución acuosa que contiene sales inorgánicas, glucosa, rojo fenol, aminoácidos y

vitaminas.

- Se pesaron el péptido LL-37 y el vehículo lipídico en un matraz de vidrio y luego se añadió DMEM. Las dispersiones resultantes fueron sacudidas enérgicamente usando una mezcladora Heidolph Promax a una frecuencia de 200/min durante 1,5 horas y fueron dejadas equilibrarse y sedimentar durante aproximadamente 3 horas a temperatura ambiental. Luego se realizó una evaluación visual y se obtuvieron los resultados siguientes: todas las muestras eran dispersiones turbias y no hubo diferencias de turbiedad entre las muestras B1, B2, C1 y C2. La única diferencia observada fue entre las muestras A1 y A2; la primera, que contenía el péptido, era significativamente menos turbia que la segunda, sin el péptido. A su vez, la muestra A2 era ligeramente menos turbia que las muestras B1, B2, C1 y C2. Estas observaciones indican una interacción más fuerte entre los dos componentes en la muestra A1, lo que da lugar a una dispersión con un tamaño medio de partícula más pequeño en comparación con la muestra A2 exenta de péptido pero también en comparación con el resto de las muestras correspondientes. Después de un día de almacenamiento a temperatura ambiental, las muestras A1 y A2 no se habían alterado, es decir, ambas eran dispersiones homogéneas y A1 era menos turbia que A2, mientras que los matraces de vidrio de las otras cuatro muestras presentaban considerables sedimentos en el fondo.
- Las tres mezclas de péptido y vehículo lipídico polar son útiles para diversos fines, tales como, por ejemplo, como sistemas de distribución y para ensayos en cultivos celulares; sin embargo, puesto que el tiempo de conservación de las mezclas de péptido y galactolípido es considerablemente mayor (sin sedimentación) que el de las otras, dichas mezclas son las más preferidas para un uso práctico.

Ejemplo 4. Preparación de mezclas acuosas que comprenden una mezcla de péptido LL-37 y vehículo lipídico

- Se prepararon muestras de LL-37, en forma de trifluoroacetato (lote 971/26), y un vehículo lipídico polar formador de bicapas usando los ingredientes siguientes (los porcentajes son en peso por peso).

Tabla 2.

Ingrediente	Muestra D	Muestra E	Muestra F	Muestra G	Muestra H	Muestra I	Muestra J
LL-37	96 ppm	100 ppm	100 ppm	103 ppm	100 ppm	100 ppm	100 ppm
CPL-Galactolípido	0,21%	–	–	–	0,20%	–	–
PC de soja, 40%	–	0,21%	–	–	–	–	–
PC de yema de huevo, 60%	–	–	0,21%	–	–	–	–
DOPC, 99%	–	–	–	0,20%	–	–	–
PC de soja, 70%	–	–	–	–	–	0,20%	–
PC de soja, 94%	–	–	–	–	–	–	0,20%
PBS	hasta el 100%	hasta el 100%	hasta el 100%	hasta el 100%	hasta el 100%	hasta el 100%	hasta el 100%

- CPL-Galactolípido, fabricado por LTP Lipid Technologies Provider AB, es una fracción galactolípida cromatográficamente purificada procedente de avenas. Los diferentes fosfolípidos usados fueron fosfatidilcolina (PC; del inglés, *phosphatidylcholine*) de soja, aproximadamente 40% (Sigma; P-3644); PC de yema de huevo secada, aproximadamente 60% (Sigma; P-5394); dioleilfosfatidilcolina (DOPC; del inglés, *dioleylphosphatidylcholine*) sintética, aproximadamente 99% (Sigma; P-6354); PC de soja, aproximadamente 70% (Lipoid S75); y PC de soja, aproximadamente 94% (Lipoid S100). PBS es disolución salina tamponada con fosfato, de Invitrogen Corp. (Dulbecco's; n° 14190-094 del catálogo).

Todos los lípidos polares investigados tienen temperaturas de transición de fase por fusión de cadenas muy por debajo de 0 °C, es decir, en el intervalo de -10 a -15 °C, cuando están totalmente hidratados.

- Se pesaron el péptido LL-37 y el vehículo lipídico en un matraz de vidrio de 100 ml de capacidad y luego se añadió PBS. El volumen total era aproximadamente 30 ml. Las muestras fueron sacudidas enérgicamente usando una mezcladora ST (tipo B1, E. Büchler, Tübingen) ajustada a 5,5 (que corresponde a una frecuencia aproximada de 150/min) durante 2 horas y fueron dejadas equilibrarse y sedimentar durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiental. Luego se registró la turbiedad de las dispersiones resultantes a 400-800 nm en un espectrofotómetro UV-VIS UV-160A de Shimadzu. Las mediciones se realizaron frente a agua pura a temperatura ambiental usando una célula de cubeta de 10 mm. Los datos de turbiedad de la Tabla 3 se presentan como % de transmisión a 600 nm. También se realizaron evaluaciones visuales de las dispersiones. Se repitieron las mediciones de turbiedad después de uno y dos días de almacenamiento de las dispersiones a temperatura ambiental.

Tabla 3. Datos de turbiedad

Turbiedad ($\lambda = 600 \text{ nm}$)	Muestra D	Muestra E	Muestra F	Muestra G	Muestra H	Muestra I	Muestra J
30 min	64,1%	70,9%	5,1%	1,7%	68,6%	18,6%	1,4%
1 día	57,3%	65,6%	–	–	67,0%	19,8%	–
2 días	57,2%	65,5%	–	–	66,9%	20,5%	–

A partir de las evaluaciones visuales se concluyó que todas las mezclas formaban dispersiones más o menos turbias; las muestras D, E, H e I formaban las dispersiones menos turbias, lo que se manifiesta en la máxima transmisión de luz en la Tabla 3, mientras que las muestras F, G y J formaban las dispersiones más turbias y, en consecuencia, daban lugar a la mínima transmisión de luz detectada por el espectrofotómetro. Después de un día de almacenamiento a temperatura ambiental, todas las muestras F, G y J con la turbiedad inicialmente elevada (baja transmisión) habían experimentado sedimentación y no fueron sometidas a medición. Todas las muestras D, E, H e I eran dispersiones estables y daban lugar a datos de turbiedad reproducibles después de uno y dos días tras la preparación.

Las muestras D y H son duplicados, conteniendo ambas CPL-Galactolipid, pero la muestra H tenía una relación ponderal de péptido a galactolípido ligeramente mayor. Esto daba lugar a una turbiedad ligeramente menor (mayor transmisión) en la muestra H, lo que sugiere que la interacción entre péptido y lípido en esta muestra es más fuerte que en la muestra D, lo que conduce a complejos/agregados más pequeños que dan lugar a una menor turbiedad.

Las muestras D, E, H e I fueron adicionalmente examinadas con respecto a la estabilidad coloidal a 2-8 °C durante 2 meses.

Tabla 4. Datos de estabilidad

Muestra	Aspecto	Estabilidad
D	dispersión turbia fina, ligera sedimentación, sedimento fácil de redispersar	aceptable
E	dispersión turbia, ligera sedimentación, crecimiento microbiano	inaceptable
H	dispersión turbia fina, ligera sedimentación, sedimento fácil de redispersar	aceptable
I	dispersión turbia, ligera sedimentación, crecimiento microbiano	inaceptable

Estos datos y observaciones muestran que dos mezclas de péptido y vehículo lipídico polar son mejores que el resto de las mezclas examinadas. Los vehículos que contienen CPL-Galactolipid (muestras D y H) y PC de soja, aproximadamente 40% (muestra E), dan lugar a los sistemas más finamente dispersos con la estabilidad coloidal más prolongada; sin embargo, es sólo el CPL-Galactolipid el que es aceptable para uso farmacéutico ya que el material fosfolipídico con fosfatidilcolina a sólo el 40% solamente puede ser utilizado para aplicaciones técnicas. Estos datos demuestran de nuevo la utilidad del material galactolipídico en diversas aplicaciones farmacéuticas, por ejemplo, como un sistema vehicular para péptidos.

Ejemplo 5. Preparación de mezclas acuosas que comprenden contenidos variables de péptido LL-37 y contenidos variables de galactolípido

Se prepararon una disolución madre de péptido LL-37 (sal de acetato; lote 990/37/A) en PBS, 995 ppm, y una disolución madre de CPL-Galactolipid, 1,00%, en PBS. Se mezclaron partes alícuotas de las disoluciones madre más PBS adicional en viales de vidrio de 20 ml de capacidad con tapones de goma y cápsulas de aluminio. Las composiciones de las mezclas se presentan en la Tabla 5. Después de dejar que las mezclas se equilibraran a temperatura ambiental durante 1 hora, los viales fueron sacudidos en posición horizontal en una mezcladora ST (tipo B1, E. Büchler, Tübingen) ajustada a 7,5 (que corresponde a una frecuencia aproximada de 190/min), durante 1 hora. Luego se dejó que las mezclas se equilibraran y sedimentaran durante la noche a temperatura ambiental. Los aspectos de las mezclas después de uno y cinco días a 4 °C fueron evaluados de este modo: coloidal claro, ligeramente turbio, turbio, y lechoso, y los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5.

Número de muestra	LL-37 (ppm)	Galactolípido (%)	Péptido:lípido (peso/peso)	Aspecto después de 1 día	Aspecto después de 5 días
01	247	0,135	1:5,5	dispersión turbia, sedimento	dispersión turbia, sedimento
02	181	0,133	1:7,4	disolución coloidal clara	disolución coloidal clara, ligero sedimento
03	116	0,133	1:11	disolución coloidal clara	disolución coloidal clara
04	50,5	0,135	1:27	disolución coloidal clara	disolución coloidal clara
05	16,5	0,133	1:81	dispersión ligeramente turbia, homogénea	dispersión ligeramente turbia, homogénea
06	8,2	0,135	1:165	dispersión turbia, homogénea	dispersión turbia, homogénea
07	–	0,133	–	dispersión turbia, homogénea	dispersión turbia, homogénea
08	248	0,266	1:11	disolución coloidal clara	disolución coloidal clara, ligero sedimento
09	182	0,267	1:15	disolución coloidal clara	disolución coloidal clara
10	116	0,266	1:23	disolución coloidal clara	disolución coloidal clara
11	49,8	0,268	1:54	dispersión ligeramente turbia, homogénea	dispersión ligeramente turbia, homogénea
12	17,1	0,266	1:156	dispersión ligeramente turbia, homogénea	dispersión ligeramente turbia, homogénea
13	8,9	0,265	1:298	dispersión ligeramente turbia, homogénea	dispersión ligeramente turbia, homogénea
14	–	0,265	–	dispersión ligeramente turbia, homogénea	dispersión ligeramente turbia, homogénea
15	247	0,532	1:22	disolución coloidal clara	disolución coloidal clara
16	182	0,532	1:29	dispersión ligeramente turbia, homogénea	dispersión ligeramente turbia, homogénea
17	116	0,533	1:46	dispersión turbia, homogénea	dispersión turbia, homogénea
18	49,2	0,533	1:108	dispersión turbia, homogénea	dispersión turbia, homogénea
19	16,5	0,534	1:324	dispersión turbia, homogénea	dispersión turbia, homogénea
20	8,2	0,532	1:649	dispersión turbia, homogénea	dispersión turbia, homogénea
21	–	0,533	–	dispersión turbia, homogénea	dispersión turbia, homogénea
22	248	0,799	1:32	dispersión turbia, homogénea	dispersión turbia, ligero sedimento
23	182	0,802	1:44	dispersión lechosa, homogénea	dispersión lechosa, ligero sedimento
24	115	0,801	1:70	dispersión lechosa, homogénea	dispersión lechosa, ligero sedimento
25	50,1	0,799	1:159	dispersión lechosa, homogénea	dispersión lechosa, ligero sedimento
26	16,8	0,799	1:476	dispersión lechosa, homogénea	dispersión lechosa, ligero sedimento
27	8,6	0,798	1:928	dispersión lechosa, homogénea	dispersión lechosa, ligero sedimento
28	–	0,798	–	dispersión lechosa, homogénea	dispersión lechosa, ligero sedimento

Es evidente que ciertas relaciones de péptido LL-37 a galactolípido dan lugar a un aspecto en disolución que indica la presencia de complejos pequeños, con un tamaño más pequeño que el de las partículas de las correspondientes muestras sin LL-37. Una disolución clara indica una estabilidad coloidal superior.

Ejemplo 6. Mediciones conformacionales

Las mediciones del dicroísmo circular (CD; del inglés, *circular dichroism*) de LL-37 en disolución pueden revelar información acerca de cambios conformacionales. La actividad antibacteriana de LL-37 depende de la conformación: un elevado contenido de estructura helicoidal da lugar a una potente acción antibacteriana y a una elevada actividad citotóxica (Johansson et al., *J. Biol. Chem.* 273: 3718-3724, 1998). Se ha hallado que la conformación α -helicoidal de LL-37 depende del contraión, el pH y la concentración de péptido (Johansson et al., *J. Biol. Chem.* 273: 3718-3724, 1998). También se sabe que cierta fracción del péptido tiene una estructura α -helicoidal en disolución acuosa y que esta estructura puede ser promovida por la presencia de aditivos tales como lípidos, transformándola de un estado aleatorio en una hélice α (Turner et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2206-2214, 1998).

Se prepararon muestras para mediciones de dicroísmo circular (CD) en una disolución acuosa 10 mM de tampón de fosfato, pH de 7,0, que contenía 200 ppm de LL-37 (en forma del trifluoroacetato, lote 971/26), con y sin CPL-Galactolipid al 0,40%. Las muestras, 20 ml en matraces de vidrio de 50 ml de capacidad, fueron sacudidas enérgicamente con una mezcladora ST (tipo B1, E. Büchler, Tübingen) ajustada a 7,5 (que corresponde a una frecuencia aproximada de 220/min), durante 2 horas. Luego se dejó que las muestras se equilibraran y sedimentaran durante la noche a 2-8 °C.

Se registraron espectros de CD en un espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco Inc.). El compartimento de muestras con la célula de cubeta (longitud de paso de 1 mm) fue colocado cerca del fotomultiplicador con objeto de reducir los efectos de dispersión lumínica de las dispersiones. Las muestras fueron sometidas a medición a temperatura ambiental y escaneadas de 280 a 200 nm a una velocidad de 20 nm/min, con una resolución de 1 nm y 3 acumulaciones por ensayo. Los resultados se expresan como la elipticidad media por resto, $[\theta]$, y el porcentaje de conformación α -helicoidal a 222 nm se estima mediante la fórmula siguiente: $([\theta]_{222} + 3900) \cdot 100/41.900$.

Las mediciones de CD sobre 200 ppm de LL-37 en disolución de tampón de fosfato 10 mM, pH de 7,0, reveló una estructura secundaria α -helicoidal por mínimos dicroicos dobles a 208 y 222 nm. El mínimo a 222 nm se utilizó para calcular el porcentaje de estructura α -helicoidal, del que se halló que era aproximadamente 63%. Cuando se añadió el galactolípido en una concentración de 0,40% (peso/peso) a la misma disolución tampón, la estructura α -helicoidal de LL-37 resultó prácticamente inafectada, con una estructura α -helicoidal aproximada de 64%.

Una conformación helicoidal potenciada está relacionada con una actividad antibacteriana aumentada. Se especula con que la estructura secundaria es también relevante para la capacidad de LL-37 para cicatrizar heridas, donde un elevado porcentaje de estructura α -helicoidal significa una actividad potenciada. En una disolución acuosa de tampón esto también significa una elevada citotoxicidad, pero, en presencia de galactolípido, se conserva la estructura secundaria y, por lo tanto, la actividad resulta inafectada, mientras que la citotoxicidad resulta disminuida.

Se empleó un fosfolípido aniónico sintético, palmitoil-oleil-fosfatidilglicerol (POPG; Sigma-Aldrich, P6956), como una referencia y se examinó usando unas condiciones experimentales iguales a las anteriormente descritas. Se halló un menor porcentaje de estructura α -helicoidal, 58%, cuando estaba presente este lípido, lo que indica que la conformación y, por lo tanto, la actividad de LL-37 están más influidas por el fosfolípido negativamente cargado que por el galactolípido neutro. Sin embargo, resulta más importante que, después de un mes de almacenamiento a 4 °C, la muestra presentaba una separación parcial, con sedimentos en el fondo del recipiente. Un suave sacudimiento dio lugar a una dispersión gruesa. En el mismo momento también se observaron sedimentos en la correspondiente muestra basada en galactolípido, aunque en un grado menor, que podían ser redispersados hasta una dispersión fina mediante una suave agitación.

Ejemplo 7. Ensayos de citotoxicidad

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* son valiosas para la evaluación de la toxicidad de materiales que entran en íntimo contacto con tejidos vivos.

Se examinaron formulaciones seleccionadas en cuanto a citotoxicidad *in vitro* en células de mamífero cultivadas (fibroblastos L 929 de ratón). El diseño del ensayo se basó en la Farmacopea de EE.UU., edición 26ª, método <87>, y en la norma ISO 10993-5.

Se mezclaron las formulaciones D y E (véanse el Ejemplo 4 y la Tabla 2) con medio completo para cultivo celular (medio HAM F12 con suero bovino fetal al 10%) en las concentraciones de 10, 2, 0,4 y 0,08% (volumen/volumen). Estas disoluciones de ensayo se emplearon para tratar cultivos celulares por triplicado durante 24 horas. Se incluyeron cultivos no tratados, testigos negativos (tratados con un extracto de polipropileno) y testigos positivos [tratados con un extracto de poli(cloruro de vinilo) estabilizado con estaño] por triplicado.

Ambas formulaciones mostraron una toxicidad de nula a ligera (grado 0-1 de citotoxicidad) cuando se examinaron en una concentración de 10% (volumen/volumen) y una toxicidad nula (grado 0 de citotoxicidad) en las concentraciones de 2%, 0,4% y 0,008% (volumen/volumen).

El ensayo de citotoxicidad con una disolución testigo positivo que contenía 100 ppm de LL-37 en PBS causó una toxicidad moderada (grado 2 de citotoxicidad) con las cuatro concentraciones examinadas (mezclas al 10, 2, 0,4 y 0,08% de la disolución con medio para cultivo celular). Este nivel de toxicidad se define como que el 20-50% de las células mueren o muestran signos morfológicos de toxicidad. La escala va de 0 a 4 y, cuando se examinan extractos de ensayo de dispositivos médicos, los grados 3 y 4 indican el fracaso del ensayo. Esta disolución testigo positivo es considerablemente más tóxica que las formulaciones D y E, que no mostraron toxicidad o sólo mostraron una leve toxicidad.

Experimentos biológicos

Basándose en nuestros recientes hallazgos de que

- 10 – se induce hCAP18/LL-37 en membranas cutáneas y mucosas en asociación con inflamación y heridas, y
- hCAP18/LL-37 está ausente en el epitelio de las úlceras crónicas a pesar de una inflamación masiva,

planteamos la hipótesis de que hCAP18/LL-37 está implicado en la capacidad regenerativa del epitelio cutáneo. Se llevaron a cabo los experimentos siguientes para probar esta hipótesis.

15 Ensayo 1. Investigación del patrón de expresión de hCAP18/LL-37 en la cicatrización de heridas humanas no inflamatorias

Muestras tisulares

Se obtuvo piel humana de una cirugía rutinaria para reducción abdominal o de mama. Bajo condiciones estériles, se realizaron heridas de grosor completo por el lado epidérmico con un punzón de 3 mm para biopsias. Estas heridas *ex vivo* fueron extirpadas con un punzón de 6 mm para biopsias y fueron posteriormente transferidas a placas de 24 pocillos y cubiertas con 2 ml de medio. Dichas heridas se reepitelizan reproduciblemente en 4-7 días (Kratz et al., *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 28: 107-112, 1994; Inoue et al., *J. Invest. Dermatol.* 104: 479-483, 1995; Kratz et al., *Microsc. Res. Tech.* 42: 345-350, 1998). El medio, DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, GIBCO) que contenía suero de ternera fetal (FCS; del inglés, fetal calf serum) al 10% y antibióticos (PEST = 50 U/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomina), se cambió cada tercer día. Las heridas fueron recogidas en diferentes momentos, a los 2, 4 y 7 días después de su formación, y fueron instantáneamente congeladas. El experimento se repitió cuatro veces en total. Se utilizaron cuatro donantes diferentes y se realizaron heridas por triplicado en cada experimento para cada condición. En cada experimento sólo se utilizó piel de un único donante.

Preparación de sondas de RNA

30 Para detectar mRNA para el gen hCAP18 y para la inmunorreactividad hacia hCAP18/LL-37, llevamos a cabo hibridación *in situ* e inmunohistoquímica sobre muestras de heridas que representaban todos los momentos de la reepitelización secuencial. Para la hibridación *in situ* usamos sondas de RNA antisentido y sentido marcadas con ³⁵S, y el experimento se llevó a cabo del modo descrito (Frohm Nilsson et al., *Infect. Immun.* 67: 2561-2566, 1999).

Preparación de anticuerpo LL-37

35 Para la inmunohistoquímica, generamos y preparamos un anticuerpo policlonal LL-37 de la manera siguiente: se preparó el péptido LL-37 (lote YS 5253, EuroDiagnostica AB, Malmö, Suecia) en forma de sal de trifluoroacetato de acuerdo con la estrategia de Fmoc usando una síntesis en fase sólida (Fields y Noble, 1990) y se purificó mediante HPLC hasta una pureza de 98%. La actividad biológica del péptido fue confirmada en un ensayo antibacteriano. El péptido se utilizó para la inmunización de tres conejos de acuerdo con un protocolo estándar (AgriSera, Vännäs, Suecia). Se purificó por afinidad el antisuero policlonal usando péptido LL-37 sintético y se evaluó el antisuero purificado mediante un ensayo ELISA. Se diluyó la concentración de IgG del suero inmune hasta 0,5 mg/ml. Se recogió suero preinmune de cada conejo, y la concentración de IgG era 2 mg/ml.

Inmunohistoquímica

45 Todas las biopsias fueron instantáneamente congeladas e idénticamente manipuladas. En resumen, se incubaron cortes criostáticos de 6-7 µm de grosor con el anticuerpo LL-37 en diluciones 1:1000 y 1:2000 y se tiñeron de acuerdo con el método indirecto de la peroxidasa usando un kit Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cortes fueron contrateñidos con disolución de hematoxilina de Mayer. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces para asegurar la reproducibilidad. Como testigos, se procesaron cortes tisulares consecutivos en paralelo sin adición de anticuerpo primario y usando IgG preinmune de conejo (DAKO, Glostrup, Dinamarca) como anticuerpo primario.

50 Resultados

En el momento 0 h hubo una moderada expresión de proteína LL-37 y mRNA de hCAP18 en la capa basal de la epidermis por todo el tejido, consistente con nuestros hallazgos previos de una expresión constitutiva de hCAP18 en la epidermis basal. Las heridas recogidas en diferentes momentos durante la reepitelización presentaban una clara señal de proteína LL-37 y mRNA de hCAP18 en el epitelio, que migraba para cubrir la superficie herida. Ninguna de las células de la matriz dérmica subyacente fue positiva para hCAP18/LL-37. Estos resultados indican que se produce síntesis *de novo* de hCAP18 en los queratinocitos durante la reepitelización sin inflamación y apoyan nuestra hipótesis de que hCAP18 puede estar ligado a la regeneración epitelial.

Ensayo 2. Inhibición de la reepitelización de heridas cutáneas humanas *ex vivo* con anticuerpo LL-37

Se añadió anticuerpo LL-37, preparado en el Ensayo 1, a 2 ml de medio por pocillo (DMEM, + FCS al 10% y PEST) hasta una dilución final de anticuerpo de 1:10, 1:100 y 1:1000. Como testigo usamos el correspondiente suero preinmune con una concentración final de IgG igual a la dilución 1:10 del antisuero LL-37, y un conjunto de heridas tratadas sólo con medio. Cada condición experimental se realizó por triplicado y se repitió dos veces. Se cambiaron los medios cada tercer día y se añadió anticuerpo LL-37 o suero preinmune del modo anteriormente descrito. Las heridas *ex vivo* se recogieron 2, 4 y 7 días después de la formación de las heridas. Todas las muestras fueron instantáneamente congeladas, seccionadas hasta compleción y montadas en portaobjetos Superfrost Plus antes de la tinción con hematoxilina-eosina. Los cortes que representaban la máxima reepitelización en el centro de las heridas fueron seleccionados para evaluación. Se investigó la capacidad proliferativa de los queratinocitos por medio de inmunohistoquímica, representando todas las condiciones de tratamiento el marcador Ki67 de proliferación [antisuero monoclonal Ki67 de ratón (DAKO, Glostrup, Dinamarca) en dilución 1:25] en las heridas.

Resultados

El tratamiento con anticuerpo LL-37 produjo una inhibición, dependiente de la concentración, de la reepitelización. En ninguna de las heridas tratadas con anticuerpo LL-37 en la mayor concentración (1:10) se consiguió la reepitelización. En estas heridas, solo queratinocitos sueltos con un aspecto aplanado frágil habían migrado desde el borde de cada herida. Las heridas tratadas con LL-37 en la concentración media (1:100) mostraron una reepitelización retardada; estas heridas resultaron prácticamente curadas el día 7 pero no el día 4. Además, el epitelio era más delgado y los queratinocitos tenían un aspecto frágil. Las heridas tratadas con anticuerpo LL-37 en la menor concentración (1:1000) no diferían de las heridas testigo, que se habían curado todas el día 4 con un epitelio robusto de 2-3 capas. Las heridas testigo tratadas sólo con medio y con anticuerpo IgG testigo se curaron de igual forma. En las heridas testigo, la mayoría de las células de la lengua de reepitelización fueron positivas para el marcador Ki67 de proliferación, mientras que no hubo células positivas para Ki67 en las heridas tratadas con LL-37 en dilución 1:10. Concluimos de este experimento que LL-37 puede estar críticamente implicado en la reepitelización cutánea y que la capacidad proliferativa parecía estar preferentemente afectada ya que el bloqueo con anticuerpo LL-37 permitía la migración inicial de células sueltas desde el borde de la herida pero evitaba eficazmente más proliferación de los queratinocitos.

Ensayo 3. Proliferación de células HaCat por tratamiento con péptido LL-37 biológicamente activo sintético *per se* y en combinación con un vehículo lipídico polar

Se usaron células HaCat para estos experimentos. Las células HaCat son una línea celular inmortalizada de queratinocitos humanos (Boukamp et al., *J. Cell Biol.* 106: 761-771, 1988) que es adecuada para una investigación experimental con queratinocitos. Se cultivaron células HaCat en medio (DMEM, + FCS al 10% y PEST). Ambos tipos de cultivos celulares fueron tratados con LL-37 bioactivo sintético (lote YS 5253). Además, se añadió una mezcla de LL-37 (114 µg/ml) y CPL-Galactolipid (0,2%) en medio que contenía suero al 2 o 10% para evaluar la capacidad para aumentar la proliferación e inhibir la citotoxicidad. Se recolectaron células en diferentes momentos (24 h, 48 h, 72 h y 96 h) y se contaron mediante citometría de flujo (Becton-Dickinson) y se tiñeron mediante azul de tripán para evaluar la viabilidad. Un valor positivo para azul de tripán indica que la membrana celular ha resultado dañada. También se determinaron la proliferación y la viabilidad midiendo la actividad mitocondrial (WST-1, Roche, Cook et al., *Anal. Biochem.* 179: 1-7, 1989).

Tabla 6. Proliferación de células HaCat a las 96 horas, evaluada por citometría de flujo.

EGF (nM)	LL-37 (µg/ml)	Conc. de suero (%)	Número de células (valor medio)	Azul de tripán + (%)	Proliferación aumentada (%)
–	–	10	32.270	< 1	0
1,7	–	10	42.000	< 1	30
–	25	10	36.470	< 1	13
–	50	10	40.950	< 1	27
–	100	10	66.430	< 1	100

EGF (nM)	LL-37 (µg/ml)	Conc. de suero (%)	Número de células (valor medio)	Azul de tripán + (%)	Proliferación aumentada (%)
-	25	2	32.130	< 1	0
-	50	2	53.620	30-50	Sin efecto citotóxico relevante
-	100	2	15.120	100	Sin efecto citotóxico relevante

El aumento de proliferación celular se calcula por comparación con la línea de base (-EGF). Se presentan los valores medios de muestras por triplicado/condición en tres experimentos separados.

Tabla 7. Proliferación y viabilidad de células HaCat a las 48 horas, medidas mediante la actividad mitocondrial (WST-1).

EGF (nM)	LL-37 (µg/ml)	Conc. de suero (%)	Absorbancia	Azul de tripán + (%)	Proliferación aumentada (%)
-	-	10	0,622	< 1	0
1,7	-	10	1,107	< 1	77
-	100	10	1,110	< 1	78

5 El aumento de proliferación celular se calcula por comparación con la línea de base (-EGF). Se presentan los valores medios de 6 muestras/condición en un experimento.

Tabla 8. Proliferación de células HaCat a las 72 horas, evaluada por citometría de flujo.

EGF (nM)	LL-37 (µg/ml)	Lípido (0,2%)	Conc. de suero (%)	Número de células (valor medio)	Azul de tripán + (%)	Proliferación aumentada (%)
-	-	-	10	55.207	< 1	0
1,7	-	-	10	85.050	< 1	54
1,7	-	+	10	87.640	< 1	58
-	100	-	10	88.853	< 1	61
-	100	+	10	91.980	< 1	66
-	100	-	2	150.500	100	Sin efecto citotóxico relevante
-	100	+	2	87.360	< 1	58

El aumento de proliferación se calcula por comparación con la línea de base (-EGF). Se presentan los valores medios de muestras por triplicado/condición por triplicado en un experimento.

10 Resultados

15 El tratamiento de células HaCat con el péptido LL-37 dio lugar a un aumento, dependiente de la concentración, de la proliferación. Esto indica que el péptido LL-37 tiene la capacidad para estimular la proliferación de queratinocitos hasta un nivel que iguala o sobrepasa el del EGF, el patrón de oro para la proliferación de células epiteliales. Hemos utilizado EGF en concentración 1,7 nM ya que ésta ha sido establecida como óptima para estimular la proliferación de queratinocitos en cultivo y ha llegado a ser una condición de cultivo estándar (Cohen et al., *Dev. Biol.* 12: 394-407, 1965). Las células HaCat son células epiteliales muy proliferativas y resulta interesante que LL-37 pueda aumentar aún más la proliferación de estas células. El efecto citotóxico inducido por LL-37 en concentración de 100 µg/ml, en suero al 2%, resultó completamente anulado cuando se añadió lípido a la mezcla, lo que indica que el lípido es capaz de sustituir al suero en esta condición experimental.

20 El ensayo ha mostrado que LL-37 bioactivo sintético (25-100 µg/ml) añadido a cultivos celulares de células HaCat, en medios con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, aumenta la proliferación de un modo dependiente de la concentración. Sin embargo, si el péptido (100 µg/ml) era añadido a un cultivo de queratinocitos en un medio que contenía FCS al 2%, todos los queratinocitos se volvían positivos para la tinción con azul de tripán, lo que indicaba un efecto citotóxico sobre estas células.

25 La actividad citotóxica de la catelicidina resulta inhibida por la presencia de suero, un mecanismo del cual se piensa que protege a las células huésped de efectos potencialmente nocivos. Nuestros datos confirman que el efecto citotóxico de LL-37 resulta inhibido en presencia de suero (10%). Además, la mezcla de LL-37 (25 µM) y vehículo lipídico polar (0,2%), en el medio que contiene la menor concentración de suero (FCS al 2%), inhibe el efecto citotóxico y aumenta la proliferación. Estos datos sugieren que el vehículo lipídico polar tiene una capacidad protectora similar a la del suero, sin interferir en la bioactividad de LL-37.

30

Datos esenciales muestran que los queratinocitos humanos son hechos proliferar de la misma manera que las células HaCat.

Ensayo 4. Proliferación de células HaCat por tratamiento con los péptidos sintéticos LL-36, LL-37 y LL-38

5 Se cultivaron células HaCat en medio (DMEM, + FCS al 10% y PEST). Se sembraron células HaCat en placas de 96 pocillos (Falcon, EE.UU.) en la concentración de 2000 células por pocillo. Se sembraron las células a las -48 horas y se estimularon con los péptidos sintéticos LL-37, LL-36 y LL-38 en diferentes concentraciones a la hora 0 y después de 48 horas.

10 El ensayo se realizó en un experimento con 6 pocillos en cada condición. Se añadieron 37 GBq/milimol de ³H-timidina {THYMIDINE, [METHYL-³H]-740,0 GBq/milimol (20,00 Ci/milimol), 1,0 ml de etanol:agua, 7:3, Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, Massachusetts, EE.UU.} a cada pocillo y se realizó una incubación durante 12-17 horas. La proliferación fue evaluada por la incorporación de ³H-timidina mediante un contador de centelleo en estado líquido (MicroBeta Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, Massachusetts, EE.UU.) después de 72 y 96 horas.

Tabla 9. Proliferación de células HaCat por LL-37 a las 96 horas, evaluada por la incorporación de ³H-timidina después de 72 y 96 horas.

LL-37 (µg/ml)	Conc. de suero (%)	Cuentas por minuto (valor medio)	Desviación estándar (+/-)	Proliferación aumentada (%)
0	10	52.774	11.639	0
1,00	10	75.445	32.827	43
5,00	10	102.353	33.808	94
10,00	10	73.548	8424	39
25,00	10	76.510	10.550	45
50,00	10	65.119	8565	23

15 El aumento de proliferación celular (índice de proliferación) se calcula por comparación con la línea de base (Testigo = 0 µg/ml). Se presentan los valores medios de cuatro muestras por condición en un experimento.

Tabla 10. Células HaCat estimuladas por el péptido LL-36. Proliferación evaluada por la incorporación de ³H-timidina después de 96 horas.

LL-36 (µg/ml)	Conc. de suero (%)	Cuentas por minuto (valor medio)	Desviación estándar (+/-)	Proliferación aumentada (%)
0	10	69.323	7511	0
1,00	10	86.253	10.770	24
5,00	10	116.381	14.570	68
10,00	10	70.157	3660	1
25,00	10	72.674	7965	5
50,00	10	68.560	11.699	-1

20 El aumento de proliferación celular (índice de proliferación) se calcula por comparación con la línea de base (Testigo = 0 µg/ml). Se presentan los valores medios de cuatro muestras por condición en un experimento.

Tabla 11. Células HaCat estimuladas por el péptido LL-38. Proliferación evaluada por la incorporación de ³H-timidina después de 96 horas.

LL-38 (µg/ml)	Conc. de suero (%)	Cuentas por minuto (valor medio)	Desviación estándar (+/-)	Proliferación aumentada (%)
0	10	79.191	15.277	0
1,00	10	82.008	7911	4
5,00	10	68.694	16.599	-13
10,00	10	57.293	8512	-28
25,00	10	54.294	14.335	-31
50,00	10	48.701	6080	-39

El aumento de proliferación celular (índice de proliferación) se calcula por comparación con la línea de base (Testigo = 0 µg/ml). Se presentan los valores medios de cuatro muestras por condición en un experimento.

Ensayo 5. Proliferación de fibroblastos humanos por tratamiento con el péptido LL-37

El péptido LL-37 usado en este ensayo y los siguientes fue como el descrito en el Ejemplo 1 (lote 971/26). Los fibroblastos, un tipo de células estromales, se obtuvieron de piel lesionada y no lesionada de pacientes con úlceras crónicas en las piernas a causa de una insuficiencia venosa. Se tomaron con punzón biopsias (4 mm) del borde de las heridas, incluyendo el 50% de la zona epitelializada, y de piel no lesionada de la región de la rodilla. Se excluyeron los individuos con una historia de diabetes mellitus, insuficiencia arterial o enfermedad inflamatoria crónica. También se excluyeron los pacientes con signos de eczema en el borde de las úlceras o signos clínicos de infección o que estuvieran siendo sometidos a un tratamiento sistémico o tópico con antibióticos en el momento de la biopsia. Todos los pacientes incluidos fueron tratados con apósitos locales inertes y vendajes de compresión estándares.

Se pusieron fibroblastos en cultivo usando la técnica del explante (Hehenberger et al., *Cell Biochem. Funct.* 15: 197-201, 1997). Se sembraron los fibroblastos en placas de 96 pocillos (Falcon, EE.UU.) en la concentración de 2000 células por pocillo. Se sembraron las células a las -48 horas y se estimularon con el péptido sintético LL-37 en diferentes concentraciones a la hora 0. El ensayo se realizó en un experimento con 6 pocillos en cada condición. Se determinaron la proliferación y la viabilidad midiendo la actividad mitocondrial (WST-1, Roche) después de 24 horas y 48 horas. Véanse la Tabla 12 y la Tabla 13 siguientes. El aumento de proliferación celular (índice de proliferación) se calcula por comparación con la línea de base (Testigo = 0 µg/ml). Se presentan los valores medios de seis muestras por condición en un experimento.

Tabla 12. Fibroblasto humano de herida, estimulado por LL-37. Proliferación y viabilidad de fibroblastos humanos medidas mediante la actividad mitocondrial (WST-1) a las 48 horas.

LL-37 (µg/ml)	Lípido (0,2%)	Conc. de suero (%)	Absorbancia	Desviación estándar (+/-)	Proliferación aumentada (%)
-	-	10	0,785	0,020	0
25	-	10	1,171	0,242	49
50	-	10	1,073	0,199	37
100	-	10	0,955	0,187	22
100	+	2	0,960	0,122	22

Tabla 13. Fibroblasto normal humano, estimulado por el péptido LL-37. Proliferación y viabilidad de fibroblastos humanos medidas mediante la actividad mitocondrial (WST-1) a las 48 horas.

LL-37 (µg/ml)	Conc. de suero (%)	Absorbancia	Desviación estándar (+/-)	Proliferación aumentada (%)
-	10	0,560	0,019	0
25	10	0,597	0,067	7
50	10	0,626	0,076	12
100	10	0,669	0,051	19

Ensayo 6. Expresión transgénica de hCAP18 en células HEK293 y proliferación de células HEK293-hCAP18

Un fragmento *Bfa1* del clon 3057931 de Image (ref) que contenía la secuencia de codificación completa para hCAP18 incluyendo los 16 pares de bases de la región 5' no traducida fue subclonado en el sitio *Sma1* del vector bicistrónico pIRES2-EGFP (BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, EE.UU.). Se transfectaron células renales embrionarias humanas, HEK293, usando Fugene (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, EE.UU.) bajo condiciones estándares y se sometieron a selección durante dos semanas con 400 ng/ml de antibiótico G418 (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Las células fueron separadas por la expresión de EGFP con un citómetro de flujo MoFlo® para separación celular a alta velocidad (DakoCytomation, Fort Collins, Colorado, EE.UU.) usando el software Summit™ para el análisis de los datos, y se cuantificó su expresión de CAP18 mediante inmunotransferencia. Se establecieron similarmente líneas celulares testigo por transfección con el vector que sólo expresaba EGFP.

Para el ensayo de proliferación, se recolectaron líneas celulares con una confluencia de 70% y se sembraron en placas de 24 pocillos. Después de 24 horas, se cambió el medio y se cultivaron las células en 2 ml de medio (OPTIMEM, Gibco BRL, Life Technologies, Escocia) complementado con FCS al 5% y PEST. Todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. Se cambió el medio cada segundo día. Luego se recolectaron las líneas celulares

el día 6 y se contaron mediante citometría de flujo. Se midió la viabilidad celular con azul de tripán; todas las condiciones < 5% de las células fueron positivas para azul de tripán. El aumento de proliferación celular (índice de proliferación) se calcula por comparación con la línea de base (HEK293-EGFP). Se presentan los valores medios de muestras triplicadas por condición en un experimento.

- 5 Tabla 14. Proliferación de células HEK293-hCAP18 a las 144 horas, evaluada mediante citometría de flujo.

Tipo celular	Conc. de suero (%)	Número de células (valor medio)	Desviación estándar (+/-)	Proliferación aumentada (%)
HEK293-EGFP	5	169.063	63.726	0
HEK293-hCAP18	5	485.884	88.168	187

También se evaluó la proliferación de las células HEK293-hCAP18 mediante la incorporación de ³H-timidina, y los resultados obtenidos se presentan a continuación en la Tabla 15. El aumento de proliferación celular (índice de proliferación) se calcula por comparación con la línea de base (HEK293-EGFP). Se presentan los valores medios de cuatro muestras por condición en un experimento.

- 10 Tabla 15. Proliferación de células HEK293-hCAP18 a las 144 horas, evaluada mediante la incorporación de ³H-timidina después de 96 horas.

Tipo celular	Conc. de suero (%)	Cuentas por minuto (valor medio)	Desviación estándar (+/-)	Proliferación aumentada (%)
HEK293-EGFP	0,1	364	118	0
HEK293-hCAP18	0,1	796	206	111
HEK293-EGFP	0,5	811	459	0
HEK293-hCAP18	0,5	2271	792	180
HEK293-EGFP	1	744	433	0
HEK293-hCAP18	1	2303	359	209
HEK293-EGFP	2	767	334	0
HEK293-hCAP18	2	3483	771	354
HEK293-EGFP	5	958	414	0
HEK293-hCAP18	5	6088	1783	534
HEK293-EGFP	10	1806	664	0
HEK293-hCAP18	10	6541	2827	262

Ensayo 7. Cultivo de células humanas para trasplante en diferentes medios de crecimiento

Cultivo de células epiteliales

- 15 Se extirpa un trozo de piel, 1x1 cm, de la piel sana del paciente. Se trocea la piel y se trata con tripsina/EDTA (0,05/0,01%), y se añaden 2-5x10⁶ células de los queratinocitos reunidos a 1,5x10⁶ células 3T3 pretratadas con mitomicina (4 µg/ml, 2 h) en matraces para cultivo de 75 cm². Se añade medio A de crecimiento que contiene péptido LL-37. Se recolectan las células en forma de láminas mediante tratamiento con tripsina y se trasplantan al paciente.

- 20 El medio A de crecimiento se utiliza para el cultivo *in vitro* de células epiteliales tales como, por ejemplo, queratinocitos, y consiste en medio basal y un kit promotor del crecimiento (GPK; del inglés, growth promoting kit) que incluye a) péptido LL-37 en una disolución salina, b) penicilina + estreptomina, c) insulina, d) transferrina, e) triyodotironina, f) hidrocortisona, g) toxina colérica, y un agente reductor de la citotoxicidad seleccionado, tal como suero o un lípido polar.

25 Cultivo de células estromales

Se obtienen células estromales de una biopsia cutánea de 4 mm, se limpian de tejido subcutáneo y se siembran en placas para cultivo celular usando la técnica del explante, para obtener fibroblastos primarios. Se utiliza el medio B de crecimiento para cultivar la biopsia. Se recolectan las células mediante tratamiento con tripsina y se devuelven al paciente.

- 30 El medio B de crecimiento se utiliza para el cultivo *in vitro* de células estromales tales como, por ejemplo,

fibroblastos, y consiste en medio basal y un kit promotor del crecimiento que incluye a) péptido LL-37 en una disolución salina, b) penicilina + estreptomicina, y un agente reductor de la citotoxicidad seleccionado, tal como suero o un lípido polar.

5 El medio basal se basa en agua doblemente destilada que contiene sales inorgánicas, rojo fenol, glucosa, timidina, y hipoxantina, HEPES, piruvato sódico, aminopterina, aminoácidos y vitaminas.

Sumario de los experimentos

10 En resumen, se ha demostrado que se produce LL-37 en el epitelio cutáneo durante la cicatrización normal de heridas y que se requiere LL-37 para que se produzca la reepitelización. También hemos mostrado que no se encuentra LL-37 endógeno en el epitelio de las úlceras crónicas. Por lo tanto, proponemos que el tratamiento con LL-37, así como con fragmentos N-terminales de dicho péptido, y derivados funcionales del mismo proporciona una estrategia racional para promover la cicatrización de dichas úlceras. Además, la adición de LL-37 y la expresión transgénica de hCAP18/LL-37 también estimulan la proliferación de células sanas, lo que indica que se puede emplear LL-37 para potenciar tanto las reparaciones epiteliales normal y deficiente *in vivo* como la proliferación de células epiteliales *in vitro* para el trasplante de células autólogas. Hemos identificado también un adecuado sistema vehicular y de distribución que reduce la citotoxicidad y tiene el potencial de proteger frente a la rápida degradación *in vivo* de LL-37 y otros péptidos de catelicidina.

15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido LL-37 que tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de úlceras crónicas debidas a una insuficiencia venosa.
- 5 2. El péptido para uso en el tratamiento de úlceras crónicas según la Reivindicación 1, en donde dicha úlcera crónica es una úlcera en la pierna.
3. Un péptido LL-37 que tiene la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de úlceras crónicas debidas a una diabetes.
4. El péptido para uso en el tratamiento de úlceras crónicas según cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en donde dicho péptido LL-37 está en forma de una sal de acetato.

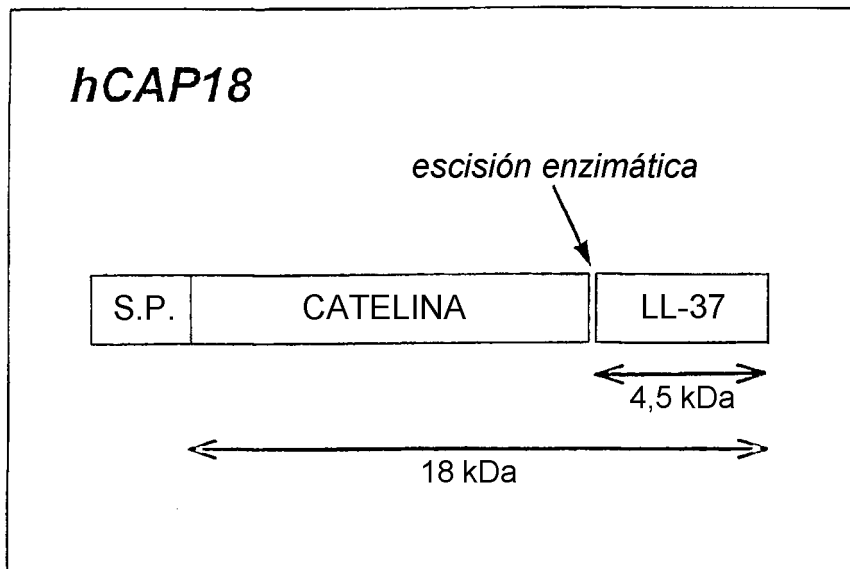


FIGURA 1

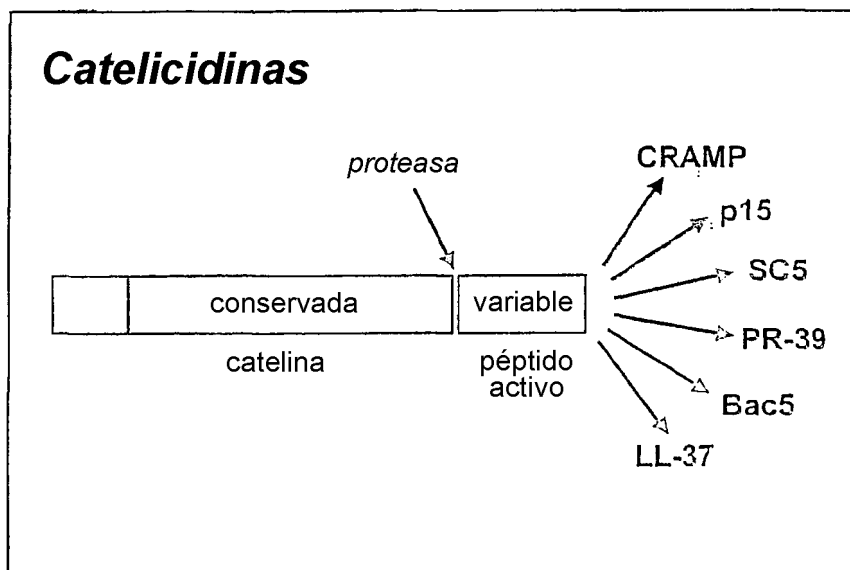


FIGURA 2

El vector pIRES2-EGFP que incluye la secuencia de codificación para hCAP18

```

TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
TGGAGTTCGG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG
CCCAACGACC CCCGCCCAT TACGTCATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
AACGCCAATA GGGACTTTC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT
AAACTGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCC
CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
CATGACCTTA TGGGACTTTC CTTACTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTGCGTA
ACAACCTCCG CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
GTCTATATAA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC CGTCAGATCC GCTAGCGCTA
CCGGACTCAG ATCTCGAGCT CAAGCTTCGA ATTCTGCAGT CGACGGTACC
GCGGGCCCTA GAGGGAGGCA GACATGGGGA CCATGAAGAC CCAAAGGGAT
GGCCACTCCC TGGGGCGGTG GTCCTGGTGC CTCCTGCTGC TGGGCGTGGT
GATGCCTCTG GCCATCATTG CCCAGGTCCT CAGCTACAAG GAAGCTGTGC
TTCGTGCTAT AGATGGCATC AACCAGCGGT CCTCGGATGC TAACCTCTAC
CGCCTCCTGG ACCTGGACCC CAGGCCACG ATGGATGGNG ACCCAGACAC
GCCAAAGCCT GTGAGCTTCA CAGTGAAGGA GACAGTGTGC CCCAGGACGA
CACAGCAGTC ACCAGAGGAT TGTGACTTCA AGAAGGACGG GCTGGTGAAG
CGGTGTATGG GGACAGTGAC CCTCAACCAG GCCAGGGGCT CCTTTGACAT
CAGTTGTGAT AAGGATAACA AGAGATTTGC CCTGCTGGGT GATTTCTTCC
GGAAATCTAA AGAGAAGATT GGCAAAGAGT TTTAAAAGAAT TGTCCAGAGA
ATCAAGGATT TTTTGC GGAA TCTTGTACCC AGGACAGAGT CCTAGGGATC
CGCCCTCTC CCTCCCCCC CCCTAACGTT ACTGGCCGAA GCCGCTTGGA
ATAAGGCCGG TGTGCGTTTG TCTATATGTT ATTTTCCACC ATATTGCCGT
CTTTTGCAA TGTGAGGGCC CGGAAACCTG GCCCTGTCTT CTTGACGAGC
ATTCTAGGG GTCTTTCCC TCTCGCCAA GGAATGCAAG GTCTGTTGAA
TGTCGTGAAG GAAGCAGTTC CTCTGGAAGC TTCTTGAAGA CAAACAACGT
CTGTAGCGAC CCTTTGCAGG CAGCGGAACC CCCCACCTGG CGACAGGTGC
CTCTGCGGCC AAAAGCCACG TGTATAAGAT ACACCTGCAA AGGCGGCACA
ACCCAGTGC CACGTTGTGA GTTGGATAGT TGTGGAAAGA GTCAAATGGC
TCTCCTCAAG CGTATTCAAC AAGGGGCTGA AGGATGCCCA GAAGGTACCC
CATTGTATGG GATCTGATCT GGGGCTCGG TGCACATGCT TTACATGTGT
TTAGTCGAGG TTAAAAAAC GTCTAGGCC CCCGAACCAC GGGGACGTGG
TTTTCTTTG AAAAACACGA TGATAATATG GCCACAACCA TGGTGAGCAA
GGGCGAGGAG CTGTTCACCG GGGTGGTGCC CATCCTGGTC GAGCTGGACG
GCGACGTAAA CGGCCACAAG TTCAGCGTGT CCGGCGAGGG CGAGGGCGAT
GCCACCTACG GCAAGCTGAC CCTGAAGTTC ATCTGCACCA CCGCAAGCT
GCCCGTGCCC TGGCCCACCC TCGTGACCAC CCTGACCTAC GCGGTGCAGT
GCTTCAGCCG CTACCCCGAC CACATGAAGC AGCACGACTT CTTCAAGTCC
GCCATGCCCG AAGGCTACGT CCAGGAGCGC ACCATCTTCT TCAAGGACGA
CGGCAACTAC AAGACCCGCG CCGAGGTGAA GTTCGAGGGC GACACCCTGG
TGAACCGCAT CGAGCTGAAG GGCATCGACT TCAAGGAGGA CGGCAACATC

```

(continúa en la Figura 3B)

FIGURA 3A

(continuación de la Figura 3A)

CTGGGGCACA AGCTGGAGTA CAACTACAAC AGCCACAACG TCTATATCAT
GGCCGACAAG CAGAAGAACG GCATCAAGGT GAACTTCAAG ATCCGCCACA
ACATCGAGGA CGGCAGCGTG CAGCTCGCCG ACCACTACCA GCAGAACACC
CCCATCGGCG ACGGCCCCGT GCTGCTGCCC GACAACCACT ACCTGAGCAC
CCAGTCCGCC CTGAGCAAAG ACCCCAACGA GAAGCGCGAT CACATGGTCC
TGCTGGAGTT CGTGACCGCC GCCGGGATCA CTCTCGGCAT GGACGAGCTG
TACAAGTAAA GCGGCCGCGA CTCTAGATCA TAATCAGCCA TACCACATTT
GTAGAGGTTT TACTTGCTTT AAAAAACCTC CCACACCTCC CCCTGAACCT
GAAACATAAA ATGAATGCAA TTGTTGTTGT TAACTTGTTT ATTGCAGCTT
ATAATGGTTA CAAATAAAGC AATAGCATCA CAAATTTAC AAATAAAGCA
TTTTTTTCAC TGCATTCTAG TTGTGGTTTG TCCAAACTCA TCAATGTATC
TTAAGGCGTA AATTGTAAGC GTTAATATTT TGTTAAAATT CGCGTTAAAT
TTTTGTAAA TCAGCTCATT TTTTAACCAA TAGGCCGAAA TCGGCAAAAT
CCCTTATAAA TCAAAGAAT AGACCGAGAT AGGGTTGAGT GTTGTTCAG
TTTGGAAACA GAGTCCACTA TTAAGAACG TGGACTCCAA CGTCAAAGGG
CGAAAAACCG TCTATCAGGG CGATGGCCCA CTACGTGAAC CATCACCTA
ATCAAGTTTT TTGGGGTCGA GGTGCCGTAA AGCACTAAAT CGGAACCCTA
AAGGGAGCCC CCGATTTAGA GCTTGACGGG GAAAGCCGGC GAACGTGGCG
AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG
TGTAGCGGTC ACGCTGCGCG TAACCACCAC ACCCGCCGCG CTTAATGCGC
CGCTACAGGG CGCGTCAGGT GGCACTTTC GGGGAAATGT GCGCGGAACC
CCTATTTGTT TATTTTTCTA AATACATTCA AATATGTATC CGCTCATGAG
ACAATAACCC TGATAAATGC TTCAATAATA TTGAAAAAGG AAGAGTCCTG
AGGCGGAAAG AACCAGCTGT GGAATGTGTG TCAGTTAGGG TGTGGAAAGT
CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC AAAGCATGCA TCTCAATTAG
TCAGCAACCA GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT
GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG CCCCTAACTC
CGCCCATCCC GCCCCTAACT CCGCCAGTT CCGCCATTC TCCGCCCAT
GGCTGACTAA TTTTTTTTAT TTATGCAGAG GCCGAGGCCG CCTCGGCCTC
TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTTGGAGGC CTAGGCTTTT
GCAAAGATCG ATCAAGAGAC AGGATGAGGA TCGTTTCGCA TGATTGAACA
AGATGGATTG CACGCAGGTT CTCCGGCCGC TTGGGTGGAG AGGCTATTCG
GCTATGACTG GGCACAACAG ACAATCGGCT GCTCTGATGC CGCCGTGTTT
CGGCTGTCAG CGCAGGGGCG CCCGTTCTT TTTGTCAAGA CCGACCTGTC
CGGTGCCCTG AATGAACTGC AAGACGAGGC AGCGCGGCTA TCGTGGCTGG
CCACGACGGG CGTTCCTTGC GCAGCTGTGC TCGACGTTGT CACTGAAGCG
GGAAGGGACT GGCTGCTATT GGGCGAAGTG CCGGGGCAGG ATCTCCTGTC
ATCTCACCTT GCTCCTGCCG AGAAAGTATC CATCATGGCT GATGCAATGC
GGCGGCTGCA TACGCTTGAT CCGGCTACCT GCCCATTGCA CCACCAAGCG
AAACATCGCA TCGAGCGAGC ACGTACTCGG ATGGAAGCCG GTCTTGTCGA
TCAGGATGAT CTGGACGAAG AGCATCAGGG GCTCGCGCCA GCCGAAGTGT
TCGCCAGGCT CAAGGCGAGC ATGCCCGACG GCGAGGATCT CGTCGTGACC
CATGGCGATG CCTGCTTGCC GAATATCATG GTGGAAAATG GCCGCTTTTC
TGGATTCATC GACTGTGGCC GGCTGGGTGT GGCGGACCGC TATCAGGACA
TAGCGTTGGC TACCCGTGAT ATTGCTGAAG AGCTTGCGCG CGAATGGGCT

(continúa en la Figura 3C)

FIGURA 3B

(continuación de la Figura 3B)

GACCGCTTCC	TCGTGCTTTA	CGGTATCGCC	GCTCCCGATT	CGCAGCGCAT
CGCCTTCTAT	CGCCTTCTTG	ACGAGTTCTT	CTGAGCGGGA	CTCTGGGGTT
CGAAATGACC	GACCAAGCGA	CGCCCAACCT	GCCATCACGA	GATTTTCGATT
CCACCGCCGC	CTTCTATGAA	AGGTTGGGCT	TCGGAATCGT	TTTCCGGGAC
GCCGGCTGGA	TGATCCTCCA	GCGCGGGGAT	CTCATGCTGG	AGTTCTTCGC
CCACCCTAGG	GGGAGGCTAA	CTGAAACACG	GAAGGAGACA	ATACCGGAAG
GAACCCGCGC	TATGACGGCA	ATAAAAAGAC	AGAATAAAAC	GCACGGTGTT
GGGTCGTTTG	TTCATAAACG	CGGGGTTCGG	TCCCAGGGCT	GGCACTCTGT
CGATACCCCA	CCGAGACCCC	ATTGGGGCCA	ATACGCCCGC	GTTTCTTCCT
TTTCCCCACC	CCACCCCCCA	AGTTCGGGTG	AAGGCCCAGG	GCTCGCAGCC
AACGTCGGGG	CGGCAGGCC	TGCCATAGCC	TCAGGTACT	CATATATACT
TTAGATTGAT	TTAAACTTC	ATTTTTAATT	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA
TCCTTTTTGA	TAATCTCATG	ACCAAATCC	CTAACGTGA	GTTTTTCGTT
CACTGAGCGT	CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC
TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT	GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	CCACCGCTAC
CAGCGGTGGT	TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC	TACCAACTCT	TTTTCCGAAG
GTAAGTGGCT	TCAGCAGAGC	GCAGATACCA	AATACTGTCC	TTCTAGTGTA
GCCGTAGTTA	GGCCACCACT	TCAAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATAACC
TCGCTCTGCT	AATCCTGTTA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	CGATAAGTCG
TGTCTTACCG	GGTTGGACTC	AAGACGATAG	TTACCGGATA	AGGCGCAGCG
GTCGGGCTGA	ACGGGGGGTT	CGTGCACACA	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA
CCTACACCGA	ACTGAGATAC	CTACAGCGTG	AGCTATGAGA	AAGCGCCACG
CTTCCCGAAG	GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT	CCGGTAAGCG	GCAGGGTCGG
AACAGGAGAG	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	GGGAAACGCC	TGGTATCTTT
ATAGTCCTGT	CGGGTTTCGC	CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTTGTGA
TGCTCGTCAG	GGGGGCGGAG	CCTATGGAAA	AACGCCAGCA	ACGCGGCCTT
TTTACGGTTC	CTGGCCTTTT	GCTGGCCTTT	TGCTCACATG	TTCTTTCTTG
CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA	TTACCGCCAT	GCAT

FIGURA 3C