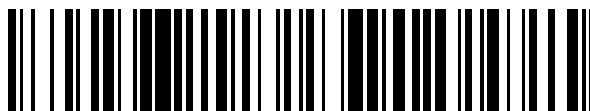


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 691**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/515 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2009 E 09829160 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2371840**

54 Título: **Polipéptido novedoso que tiene actividad de inducción de la angiogénesis y una actividad antibacteriana y uso del mismo para propósitos médicos**

30 Prioridad:

28.11.2008 JP 2008303502

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

12.06.2014

73 Titular/es:

**ANGES MG, INC. (100.0%)
7-7-15, Saito-Asagi
Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, JP**

72 Inventor/es:

**GEMBA, TAKEFUMI;
TOMIOKA, HIDEKI;
SATA, RYOKO;
TAMURA, NAO;
MAEDA, AKITO;
KANAMORI, TOSHIHIDE;
SAITO, YOSHIMI;
KOMABA, SHINTARO y
MORISHITA, RYUICHI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 467 691 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

Polipéptido novedoso que tiene actividad de inducción de la angiogénesis y una actividad antibacteriana y uso del mismo para propósitos médicos.

Campo Técnico

- 5 La presente invención se relaciona con polipéptidos novedosos que tienen una actividad de inducción de la angiogénesis y una actividad antibacteriana, un agente inductor de la angiogénesis que contiene el polipéptido, un agente para tratar una(s) herida(s) de la piel que contiene(n) el polipéptido, y un agente para prevenir la infección de la herida de la piel que contiene el polipéptido.

Antecedentes de la Técnica

- 10 En el tratamiento de varias enfermedades o lesiones que incluyen quemaduras, escaras, heridas, úlceras de la piel, úlceras de las piernas, úlceras diabéticas, enfermedad arterial oclusiva y arteriosclerosis obliterante, la angiogénesis es útil. Dado que la seria exacerbación de la condición patológica se puede inducir por la infección bacteriana en estas enfermedades, se requiere un agente inductor de la angiogénesis que tenga tanto una actividad antibacteriana como una actividad de inducción de la angiogénesis.

- 15 También, en heridas de la piel asociadas con la infección bacteriana, es útil un agente para tratar una(s) herida(s) que tiene una actividad antibacteriana. Por otra parte, en vista de la prevención de la posible infección futura, se desea que también se pueda utilizar un agente para tratar una(s) herida(s), que tenga una actividad antibacteriana para heridas que no están asociadas con la infección.

- 20 Como un polipéptido que tiene una actividad de inducción de la angiogénesis y una actividad antibacteriana, se conoce LL-37 (Literaturas de No Patente 1 y 2).

- 25 Adicionalmente, Nakagami et al., inventaron un polipéptido que tiene una actividad de crecimiento endotelial vascular, y a su vez, una actividad de inducción de la angiogénesis, y además descubrieron que el péptido tiene un péptido que tiene una actividad de inducción de la angiogénesis mayor que LL-37, y a continuación, presentaron la solicitud de la patente dirigida a lo mismo (Literatura de Patente 1). Adicionalmente, Nakagami et al., descubrieron el polipéptido AG30-5C, que consiste de 30 residuos de aminoácido y tiene una actividad de inducción de la angiogénesis mayor que la del péptido de Literatura de Patente 1, y a continuación, presentaron la solicitud de la patente dirigida a lo mismo (Literatura de Patente 2). Literatura de Patente 1 y 2 también sugiere que los polipéptidos tienen una actividad antibacteriana.

- 30 Además, se conoce como un agente terapéutico para escaras o úlcera de piel, una formulación que contiene FGF básico (bFGF) que consiste de 154 aminoácidos como un ingrediente efectivo (FIBLAST Spray (marca registrada)). Sin embargo, este bFGF no tiene una actividad antibacteriana.

Referencias de la Técnica Previa

Literatura de Patentes

Literatura de Patente 1 WO 2005/090564 A1

- 35 Literatura de Patente 2 WO 2008/096816 A1

Literaturas No Patente

- 40 Literatura No patente 1 Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R., "An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18.", J Clin Invest. 2003 Jun; 111(11):1665-72

Literatura No patente 2 Zanetti M., "Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity.," J Leukoc Biol. 2004 Jan; 75(1):39-48. Epub 2003 Jul 22.

Divulgación de la Invención

Problemas que se Resuelven por la Invención

5 Un objeto de la presente invención es proveer los polipéptidos novedosos que tienen una actividad de inducción de la angiogénesis superior y una actividad antibacteriana mayor que los polipéptidos conocidos, un nuevo agente inductor de la angiogénesis que contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo, un nuevo agente para tratar una(s) herida(s) de la piel incluyendo una úlcera de la piel o una herida intratable que contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo, y un nuevo agente para tratar una(s) herida(s) de la piel asociada(s) con la infección que contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo.

Medios para Resolver los Problemas

10 Los presentes inventores estudiaron intensivamente para descubrir los polipéptidos que tienen una actividad de inducción de la angiogénesis superior y una mayor actividad antibacteriana que los polipéptidos descritos en la Literatura de Patente 1 y 2, completando así, la presente invención.

Es decir, la presente invención provee:

- (1) Un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en cualquiera de SEQ ID NOs: 1 a 6.
- 15 (2) Un agente inductor de la angiogénesis que comprende el polipéptido de acuerdo con (1), como un ingrediente efectivo.
- (3) El agente inductor de la angiogénesis de acuerdo con (2), en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido se muestra en la SEQ ID NO: 1, 2 o 3.
- (4) Un agente antibacteriano, que comprende el polipéptido de acuerdo con (1), como un ingrediente efectivo.
- 20 (5) Un método para inducir la angiogénesis, dicho método que comprende la administración de una cantidad efectiva del polipéptido de acuerdo con (1) a un mamífero necesitado de la angiogénesis.
- (6) Uso del polipéptido de acuerdo con (1), para la producción de un agente inductor de la angiogénesis.
- (7) Un polipéptido para inducir la angiogénesis, que es el polipéptido de acuerdo con (1).
- 25 (8) Un agente para la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel, dicho agente que comprende el polipéptido de acuerdo con (1) como un ingrediente efectivo.
- (9) El agente para la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel de acuerdo con (8), en donde la(s) herida(s) de la piel es(son) seleccionada(s) del grupo que consiste de heridas de la piel causadas por heridas de corte, heridas quirúrgicas, erosiones, quemaduras, escaras, heridas intratables, úlceras de la piel, úlceras de las piernas, úlceras diabéticas, enfermedad arterial oclusiva y arteriosclerosis ocluyente.
- 30 (10) El agente para la prevención, mejora o tratamiento de acuerdo con (9), en donde la herida de la piel es una herida intratable.
- (11) El agente para la prevención, mejora o tratamiento de acuerdo con (9), en donde la herida de la piel es una herida asociada con la infección.
- 35 (12) Un agente para la prevención, mejora o tratamiento de infección bacteriana en una(s) herida(s) de la piel, que comprende el polipéptido de acuerdo con (1) como un ingrediente efectivo.
- (13) Un método para la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel o infección bacteriana en una(s) herida(s) de la piel, que comprende la administración de una cantidad efectiva del polipéptido de acuerdo con (1) a un mamífero.
- 40 (14) Uso del polipéptido de acuerdo con (1) para producir un agente para la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel o infección bacteriana en una(s) herida(s) de la piel.
- (15) Un polipéptido para la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel o infección bacteriana en una(s) herida(s) de la piel, que es el polipéptido de acuerdo con (1).

Efectos de la Invención

La presente invención provee polipéptidos novedosos que tienen una excelente actividad de inducción de la angiogénesis y una excelente actividad antibacteriana. La presente invención también provee un agente inductor nuevo de la angiogénesis que contiene el polipéptido como ingrediente efectivo, un agente nuevo para tratar una(s) herida(s) de la piel incluyendo heridas de corte, heridas quirúrgicas, erosiones, varias úlceras de la piel, heridas intratables que contienen el polipéptido como ingrediente efectivo, y un agente nuevo para tratar una(s) herida(s) de la piel asociada con la infección que contiene el polipéptido como ingrediente efectivo. Dado que los agentes para el tratamiento de una(s) herida(s) de la presente invención tienen tanto una actividad para prevenir y/o tratar una infección como una actividad para promover la regeneración del tejido de la herida, son excelentes como un agente terapéutico de un agente para tratar una(s) herida(s) de la piel.

Breve Descripción de los Dibujos

- Fig. 1 muestra los resultados obtenidos mediante el examen del efecto de los polipéptidos de la presente invención en el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF). Los valores son valores relativos obtenidos tomando el valor medido de un grupo control negativo (Control) como 100.
- Fig. 2A muestra los resultados obtenidos midiendo la capacidad para formar el tejido de granulación en el modelo de disco de papel impregnado con la formulación de bFGF como un control positivo. Los términos 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$ significan las dosificaciones de 0.1 $\mu\text{g/disco}$, 1.0 $\mu\text{g/disco}$ y 10 $\mu\text{g/disco}$, respectivamente.
- Fig. 2B muestra los resultados obtenidos midiendo la capacidad para formar el tejido de granulación en un modelo de disco de papel impregnado con SR-1, uno de los polipéptidos de la presente invención. Los términos 25 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ y 2.5 mg/mL significan las dosificaciones de 1.0 $\mu\text{g/disco}$, 10 $\mu\text{g/disco}$ y 100 $\mu\text{g/disco}$, respectivamente.
- Fig. 2C muestra los resultados obtenidos midiendo la capacidad para formar el tejido de granulación en un modelo de disco de papel impregnado con SR-2, uno de los polipéptidos de la presente invención. Los términos 25 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ significan las dosificaciones de 1.0 $\mu\text{g/disco}$, 10 $\mu\text{g/disco}$ y 100 $\mu\text{g/disco}$, respectivamente.
- Fig. 2D muestra los resultados obtenidos midiendo la capacidad para formar el tejido de granulación en el modelo de disco de papel impregnado con SR-3, uno de los polipéptidos de la presente invención. Los términos 25 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ significan las dosificaciones de 1.0 $\mu\text{g/disco}$, 10 $\mu\text{g/disco}$ y 100 $\mu\text{g/disco}$, respectivamente.
- Fig. 2E muestra los resultados obtenidos midiendo la capacidad para formar el tejido de granulación en el modelo de disco de papel impregnado con SR-4, uno de los polipéptidos de la presente invención. Los términos 25 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ significan las dosificaciones de 1.0 $\mu\text{g/disco}$, 10 $\mu\text{g/disco}$ y 100 $\mu\text{g/disco}$, respectivamente.
- Fig. 2F muestra los resultados obtenidos midiendo la capacidad para formar el tejido de granulación en un modelo de disco de papel impregnado con SR-5, uno de los polipéptidos de la presente invención. Los términos 25 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ significan las dosificaciones de 1.0 $\mu\text{g/disco}$, 10 $\mu\text{g/disco}$ y 100 $\mu\text{g/disco}$, respectivamente.
- Fig. 3A muestra los resultados obtenidos mediante la administración de SR-1, uno de los polipéptidos de la presente invención, a una herida de corte, y luego la medición de tensión del cierre de la herida de la herida de corte.
- Fig. 3B muestra los resultados obtenidos mediante la administración de SR-2, uno de los polipéptidos de la presente invención, a una herida de corte, y luego la medición de la tensión del cierre de la herida de la herida de corte.
- Fig. 3C muestra los resultados obtenidos mediante la administración de SR-3, uno de los polipéptidos de la presente invención, a una herida de corte, y luego la medición de la tensión del cierre de la herida de la herida de corte.
- Fig. 3D muestra los resultados obtenidos mediante la administración de SR-4, uno de los polipéptidos de la presente invención, a una herida de corte, y luego la medición de la tensión del cierre de la herida de la herida de corte.
- Fig. 3E muestra los resultados obtenidos mediante la administración de SR-5, uno de los polipéptidos de la presente invención, a una herida de corte, y luego la medición de la tensión del cierre de la herida de la herida de corte.
- Fig. 3F muestra los resultados obtenidos mediante la administración de la formulación de bFGF, un control, a una herida de corte, y luego la medición de la tensión del cierre de la herida de la herida de corte.

Modo de llevar a cabo la invención

Como se describe anteriormente, las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención se muestran en cada una de SEQ ID NOs: 1 a 6. Todos estos polipéptidos son sustancias nuevas.

5 La secuencia de aminoácidos de AG30-5C, que es el polipéptido descrito en la Literatura de Patente 2, se muestra en la SEQ ID NO: 7. Como se describe concretamente en la Literatura de Patente 2 y los Ejemplos a continuación, AG30-5C tiene una actividad antibacteriana y una actividad de inducción de la angiogénesis. Se demostró que los polipéptidos descritos anteriormente de la presente invención tienen una actividad de inducción de la angiogénesis y una actividad antibacteriana. Y, como se describe concretamente en los Ejemplos a continuación, los polipéptidos que son los ejemplos de la presente invención tienen una actividad de inducción de la angiogénesis superior y una actividad antibacteriana mayor que AG30-5C.

10 En general, en relación con un compuesto farmacéutico de un polipéptido(s), las técnicas para aumentar la estabilidad del polipéptido(s) *in vivo*, en donde una(s) cadena(s) de azúcar y/o una cadena(s) de polietilenglicol (PEG) es(son) adicionada(s) al polipéptido(s), o en donde un D-aminoácido(s) es(son) utilizado(s) como al menos una parte de los aminoácidos que constituyen el o los polipéptidos, son ampliamente conocidas y utilizadas. La adición de una(s) cadena(s) de azúcar y/o una(s) cadena(s) de PEG a un polipéptido, o el uso de un D-aminoácido(s) como al menos una parte de los aminoácidos que constituyen un polipéptido hace más poco probable que el polipéptido se descomponga mediante una(s) peptidasa(s) *in vivo*, y a su vez, hace más larga la vida media del polipéptido *in vivo*. También es bien conocido que la acetilación del terminal N y/o la amidación del terminal C de un péptido aumenta la estabilidad del péptido. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos que se modifican con estas conocidas modificaciones para la estabilización *in vivo*, mientras que tienen una actividad antibacteriana. Y, el término "polipéptido" como se utiliza en este documento y en las reivindicaciones anexas incluye los polipéptidos que se modifican con una(s) modificación(es) para la estabilización *in vivo*, a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. Cuando los polipéptidos de la presente invención son tales polipéptidos que se modifican con modificaciones para la estabilización, la secuencia de aminoácidos de su fracción polipéptido se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6 como se describe anteriormente (en donde el aminoácido que es acetilado o amidado como se menciona anteriormente se considera como el mismo aminoácido como un aminoácido que no es acetilado o amidado). En consecuencia, los polipéptidos que se modifican con las modificaciones para la estabilización incluyen un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NOs: 1 a 6, para la cual una estructura(s) similar a PEG para la estabilización es(son) adiciona(s), o en donde al menos una parte de sus aminoácidos se cambia en isómero D, o cuyo terminal N es acetilado y/o cuyo terminal C es amidado, o que se modifica con la combinación de estas modificaciones.

15 La adición de una cadena de azúcar a un polipéptido es bien conocido, y se describe, por ejemplo, en Sato M, Furuike T, Sadamoto R, Fujitani N, Nakahara T, Niikura K, Monde K, Kondo H, Nishimura S., "Glycoinsulins: dendritic sialyloligosacárido-displaying insulins showing a prolonged blood-sugar-lowering activity", J Am Chem Soc. 2004 Nov 3;126(43):14013-22, y Sato M, Sadamoto R, Niikura K, Monde K, Kondo H, Nishimura S., "Site-specific introduction of sialic acid into insulin.", Angew Chem Int Ed Engl. 2004 Mar 12;43(12):1516-20. Una cadena de azúcar se puede unir al terminal N, al terminal C o al aminoácido entre estos, pero se prefiere que una cadena de azúcar este unida al terminal N o al terminal C, con el fin de no inhibir la actividad del polipéptido. Y, el número de las cadenas de azúcar preferiblemente es uno o dos, más preferiblemente uno. La cadena de azúcar preferiblemente es de mono- a tetra-sacárido, más preferiblemente disacárido o trisacárido. La(s) cadena(s) de azúcar se puede(n) unir directamente a un grupo(s) amino libre(s) o un grupo(s) carboxilo en el polipéptido, o a través de una(s) estructura(s) espaciadora(s) tal como una cadena de metileno cuyo número de átomos de carbono es aproximadamente 1 a 10.

20 La adición de una cadena de PEG a un polipéptido también es bien conocida, y se describe, por ejemplo, en Ulbricht K, Bucha E, Poschel KA, Stein G, Wolf G, Nowak G., "The use of PEG-Hirudin in chronic hemodialysis monitored by the Ecarin Clotting Time: influence on clotting of the extracorporeal system and hemostatic parameters.", Clin Nephrol. 2006 Mar;65(3):180-90, and Dharap SS, Wang Y, Chandna P, Khandare JJ, Qiu B, Gunaseelan S, Sinko PJ, Stein S, Farmanfarmanian A, Minko T., "Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH péptido.", Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Sep 6; 102(36):12962-7. Una cadena de PEG se puede unir a un terminal N, un terminal C o un aminoácido entre estos, y una o dos cadenas de PEG por lo general se unen a un grupo(s) amino libre(s) y/o grupo(s) carboxilo sobre el polipéptido. El peso molecular de la cadena de PEG no se limita particularmente, pero por lo general aproximadamente 3000 a 7000, preferiblemente aproximadamente 5000.

25 El método para cambiar al menos una parte de los aminoácidos que constituyen el polipéptido en el isómero D también es bien conocido, y se describe, por ejemplo, en Brenneeman DE, Spong CY, Hauser JM, Abebe D, Pinhasov A, Golian T, Gozes I., "Protective peptides that are orally active and mechanistically nonchiral.", J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jun;309(3):1190-7, and Wilkemeyer MF, Chen SY, Menkari CE, Sulik KK, Chames ME., "Ethanol antagonist peptides: structural specificity without stereospecificity.", J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jun; 309(3):1183-9. Al menos una parte de los aminoácidos que constituyen el polipéptido puede ser un D-aminoácido(s),

pero se prefiere que todos los aminoácidos que constituyen el polipéptido sean D-aminoácidos, con el fin de inhibir la actividad del polipéptido tan poco como sea posible.

Los polipéptidos que son los ingredientes efectivos de los agentes inductores de la angiogénesis de la presente invención se pueden producir fácilmente por medio de métodos convencionales tales como un método de síntesis química utilizando un sintetizador de péptido disponible comercialmente. Además, las modificaciones descritas anteriormente para la estabilización también se pueden llevar a cabo por medio de métodos bien conocidos como se describe en cada uno de los documentos mencionados anteriormente.

Dado que los polipéptidos de la presente invención tienen una alta actividad de inducción de la angiogénesis, se pueden utilizar como un agente inductor de la angiogénesis, y también se pueden utilizar como un agente para tratar una(s) herida(s) de la piel.

En la presente descripción, el término "agente inductor de la angiogénesis" se refiere a un agente que puede inducir y/o aumentar la angiogénesis en el sitio donde el agente ha sido administrado y en la proximidad del mismo en casos donde el agente se ha administrado por vía tópica a un cuerpo vivo. La inducción de la angiogénesis se puede evaluar por medio de un método conocido tal como medición del flujo sanguíneo en dicho sitio. Cuando el agente se administra por vía tópica a un sitio de la herida, el agente induce y/o aumenta la angiogénesis para promover la granulación y regeneración del tejido de la piel y para promover así la cicatrización.

En la presente descripción, el término "agente antibacteriano" se refiere a un agente que tiene un efecto para matar las bacterias que ya han infectado o suprimido o reducido su crecimiento, o un efecto para suprimir y/o inhibir la infección por bacterias, en el caso donde el agente ha sido administrado a un cuerpo vivo.

En la presente descripción, el término "agente para tratar una(s) herida(s) de la piel" se refiere a un agente que provee la promoción de cicatrización o mejora de la(s) herida(s), o la prevención o retraso del deterioro de la(s) herida(s), en el caso donde el agente se ha administrado por vía tópica al sitio de la herida y/o a la proximidad de la misma. La promoción de la cicatrización o mejora de una(s) herida(s) se refiere a la promoción de la reducción temprana de una zona de un sitio de la herida, o promoción de la granulación y/o regeneración del tejido de la piel en un sitio de la herida.

Como utilizar los agentes inductores de la angiogénesis y los agentes para tratar una(s) herida(s) de la piel, y los agentes descritos a continuación para la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel, y los métodos descritos a continuación de la utilización de estos como un agente para la prevención, mejora o tratamiento de la infección bacteriana en una(s) herida(s) de la piel, es la misma que los conocidos agentes inductores de la angiogénesis basados en polipéptidos. Se pueden administrar como soluciones, emulsiones, suspensiones, polvos, polvos, gránulos, geles, ungüentos, o parches transdérmicos, en especial preferiblemente como soluciones, polvos, o parches transdérmicos. Preferiblemente, una solución reguladora, se prefiere especialmente una solución disuelta en un medio acuoso tal como una solución reguladora salina fisiológicamente, se puede administrar como la solución. La concentración del polipéptido en la solución no se limita particularmente, pero por lo general aproximadamente 0.01 mg/mL a 100 mg/mL, se prefiere aproximadamente 0.1 mg/mL a 50 mg/mL, se prefiere especialmente aproximadamente 1 mg/mL a 10 mg/mL. En general, la ruta de administración es una administración tópica tal como aspersión, aplicación e inyección en un sitio(s) que necesite(n) angiogénesis, o cicatrización o mejora de una(s) herida(s). La dosificación se puede seleccionar apropiadamente dependiendo del síntoma, el tamaño de la parte afectada, o similares. En general, la dosificación es, en términos del polipéptido, aproximadamente 0.01 mg a 100 mg, se prefiere aproximadamente 0.005 mg a 50 mg, se prefiere especialmente aproximadamente 0.005 mg a 0.5 mg, pero no se limita a estos rangos, por supuesto. Por ejemplo, la dosis única puede ser aproximadamente 0.05 mg.

De forma alternativa, la dosificación también se puede ajustar dependiendo de la zona de un sitio que necesite angiogénesis, o cicatrización o mejora de una(s) herida(s). Por ejemplo, la dosificación puede ser 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Como un portador farmacéuticamente aceptable que se utiliza en la formulación del agente inductor de la angiogénesis de la presente invención, además del medio acuoso como se menciona anteriormente, se puede utilizar los portadores que se usan comúnmente en el campo de formulación farmacéutica. Por ejemplo, en el caso de una preparación externa tal como un ungüento, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen hidrocarburos (vaselina neutra hidrófila, vaselina neutra blanca, lanolina purificada, parafina líquida, etc.), óxido de zinc, ácidos grasos principales y los ésteres de los mismos (ácido adípico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, éster de ácido adípico, éster de ácido mirístico, éster de ácido palmítico, dietil sebacato, hexil laurato, cetil isooctanoato, etc.), ceras (esperma de ballena, cera de abejas, cerasina, etc.), y alcoholes superiores (cetanol, alcohol estearílico, alcohol cetosteárico, etc.). En el caso de una solución, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo agua, solución salina fisiológica, y solución salina regulada con fosfato. En el caso de una preparación oral, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo lactosa y almidón. Además de estos, según sea necesario, también se pueden adicionar varios aditivos

farmacéuticos tales como emulsificantes, agentes tensoactivos, agentes isotónicos, ajustadores de pH. Estos portadores farmacéuticamente aceptables y aditivos farmacéuticos son bien conocidos en el campo de formulación farmacéutica y se utilizan ampliamente.

5 Ejemplos específicos de enfermedades y trastornos en casos donde el agente se administra a un cuerpo vivo incluyen, pero no se limitan a, quemaduras, escaras, heridas, úlceras de la piel, úlceras de las piernas, úlceras diabéticas, enfermedad arterial oclusiva y arteriosclerosis obliterante. Los agentes inductores de la angiogénesis de la presente invención se pueden utilizar como agentes para la prevención, mejora o tratamiento para estas enfermedades o trastornos. Los polipéptidos de la presente invención tienen no solo una alta actividad de inducción de la angiogénesis pero también una actividad antibacteriana. Por lo tanto, ya que tienen una actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus* (incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina), *Staphylococcus epidermidis*, y similares, y bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, enterobacteria, y similares, especialmente son apropiados como un agente para la prevención, mejora o tratamiento de enfermedades o trastornos que se desea para que también tengan una actividad antibacteriana. Ejemplos de tales enfermedades o trastornos incluyen, entre las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente, quemaduras, escaras, heridas, úlceras de la piel, úlceras de las piernas, úlceras diabéticas.

En la presente descripción, el término "herida de la piel" (algunas veces denominados simplemente como "herida") se refiere a daño físico de tejido de la superficie corporal que es causado por factores externos y/o internos, e incluye heridas de la piel causadas por heridas de corte, laceraciones, herida de arma blanca, heridas por mordedura, heridas de bala, heridas contusas, abrasiones, heridas quirúrgicas, erosiones, quemaduras, escaras, heridas intratables, úlceras de la piel, úlceras de las piernas, úlceras diabéticas, enfermedad arterial oclusiva y arteriosclerosis obliterante.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento como un agente para tratar una(s) herida(s), un agente antibacteriano, o un agente para prevenir la infección. Todos los péptidos de SR-1 (SEQ ID NO:1), SR-2 (SEQ ID NO:2), SR-3 (SEQ ID NO:3), SR-4 (SEQ ID NO:4), SR-5 (SEQ ID NO:5) y SR-6 (SEQ ID NO:6), más preferiblemente SR-1 y SR-3, se prefiere especialmente SR-1, se pueden utilizar para el tratamiento. Cada uno de los polipéptidos de la presente invención tiene dos efectos, i.e., un efecto para curar y prevenir la infección y un efecto para curar una(s) herida(s), como un ingrediente efectivo.

Los polipéptidos de la presente invención pueden mostrar un efecto para curar una(s) herida(s), comparable con un efecto de un agente que contiene bFGF como un ingrediente efectivo (Spray FIBLAST (marca registrada), denominado en este documento como "formulación de bFGF") que ya ha sido utilizado como un agente para tratar una(s) herida(s). Mientras que bFGF no tiene una actividad antibacteriana, los polipéptidos de la presente invención tienen una actividad antibacteriana. Por lo tanto, los polipéptidos de la presente invención pueden ser un agente terapéutico que es más efectivo para una(s) herida(s) de la piel asociada con la infección. Como se describe en los Ejemplos a continuación, el polipéptido de la presente invención tiene un efecto de cicatrización temprano en una(s) herida(s) asociada con la infección, en comparación con la formulación de bFGF. Aunque el efecto del polipéptido SR-1 sobre una herida asociada con la infección por *Staphylococcus aureus* se ejemplifica en los Ejemplos de la presente descripción, los expertos en la técnica pueden entender fácilmente que los polipéptidos que se pueden utilizar y la bacteria contra la cual el polipéptido pueden mostrar el efecto no se limitan al ejemplo, y que cualquiera de los polipéptidos de la presente invención también muestran un efecto similar contra *Staphylococcus aureus* y otras bacterias, especialmente las bacterias contra las cuales los polipéptidos de la presente invención muestran propiedades antimicrobianas, tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y enterobacterias.

Adicionalmente, los expertos en la técnica también pueden entender fácilmente que los polipéptidos de la presente invención previenen la infección bacteriana y muestran un efecto de cicatrización temprano como en el ejemplo, incluso cuando los polipéptidos de la presente invención han sido administrados a una(s) herida(s) en las cuales la infección no se observa y a continuación la(s) herida(s) se ha(n) puesto en contacto con la bacteria.

Por lo tanto, los polipéptidos de la presente invención, preferiblemente los polipéptidos SR-1 y SR-3, especialmente el polipéptido SR-1, se pueden utilizar para el tratamiento o mejora de todas las heridas que no se asocian con la infección, y además para el tratamiento o mejora de todas las heridas asociadas con la infección, entre todas las heridas de la piel incluyendo heridas de la piel causadas por heridas de corte, heridas quirúrgicas, erosiones, quemaduras, escaras, heridas intratables, úlceras de la piel, úlceras de las piernas, úlceras diabéticas, enfermedad arterial oclusiva y arteriosclerosis obliterante. Estos polipéptidos también tienen un efecto para prevenir la infección en una(s) herida(s) que tiene(n) una posibilidad de infección. El término "tratamiento o mejora de una(s) herida(s)" incluye cicatrización de la(s) herida(s), reducción del grado de la(s) herida(s), y supresión del deterioro de una(s) herida(s). Dado que los polipéptidos de la presente invención pueden prevenir que la infección bacteriana ocurra en un sitio de la herida, estos pueden suprimir el deterioro de la(s) herida(s).

El término "erosión" se conoce por los expertos en la técnica y el significado es como se describe en los libros de medicina normales. En otras palabras, el término se refiere a daños en la piel que son causados por, por ejemplo, hidra que incluyen impétigo contagiosa y pénfigo, una(s) quemadura(s), y raspadura en dermatitis atópica y que está dentro de la epidermis, y la condición en la que su superficie después de que la ampolla que ocurre se hidrata.

5 También, el término "úlceras" se conoce por los expertos en la técnica y el significado es como se describe en los libros de medicina convencionales. En resumen, el término se refiere a daños en la piel que alcanza la dermis o tejido más profundo, y la herida que es más profunda en comparación con las erosiones. El sangrado y/o exudado por lo general es/son observados en úlceras. Estas úlceras pueden ocurrir después de las enfermedades asociadas con trastornos hematógenos que incluyen enfermedad del colágeno, la diabetes o la vasculitis, tumores malignos, o

10 similares. Además, también se incluyen úlceras por quemadura y úlceras por presión tales como escaras (llagas). Incluso después de su cicatrización, las marcas llamadas cicatrices con frecuencia permanecen.

En consecuencia, estos polipéptidos tienen un efecto para el tratamiento, mejora o prevención contra heridas difíciles de curar que generalmente se llaman heridas intratables. Las heridas intratables incluyen úlceras diabéticas y úlceras crurales, úlceras por quemaduras, escaras (llagas), úlceras por presión, necrosis, y similares. Estas úlceras y necrosis tienden a ser asociadas con la infección bacteriana, y la infección conduce a su deterioro. Por lo tanto, en el tratamiento o mejora de estas heridas, es deseable que la regeneración del tejido de la piel en sus sitios de las heridas puede mejorar después de la granulación y la prevención y tratamiento de infección bacteriana también se lleva a cabo. Si los polipéptidos de la presente invención se utilizan como un agente para la prevención, mejora o

15 tratamiento de infección bacteriana (incluyendo infección secundaria) de una(s) herida(s), será obtenido un efecto para prevenir, mejorar o tratar la infección, y/o, debido al efecto de la angiogénesis o efecto de cicatrización de la herida que los polipéptidos tienen, también será obtenido un efecto para prevenir, mejorar o tratar la(s) herida(s) en una etapa temprana.

Aunque la infección bacteriana de la(s) herida(s) es la infección por varias bacterias, ejemplos de las bacterias incluyen, en particular, *Staphylococcus aureus* (incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina),

25 *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y similares. Es deseable terapéuticamente que los agentes que tienen propiedades antimicrobianas contra estas bacterias se administren después de la infección. Sin embargo, por otro lado, también es muy útil en el tratamiento de una(s) herida(s) que los agentes que tienen propiedades antimicrobianas contra estas bacterias se administren antes de la infección con el propósito de prevenir la infección.

30 Además, los polipéptidos de la presente invención son más deseables desde un punto de vista cosmético, ya que las cicatrices son menos propensas a permanecer en comparación con la formulación de bFGF la cual se utiliza ampliamente como un agente para tratar una(s) herida(s).

Mientras que un agente inductor de la angiogénesis, un agente antibacteriano, un agente para tratar una(s) herida(s) de la piel o un agente profiláctico contra la infección de la herida de la piel de la presente invención se pueden utilizar individualmente, dos o más de los polipéptidos de la presente invención también se pueden utilizar en combinación. Además, si se desean más propiedades antimicrobianas, se pueden utilizar en combinación con otros agentes antibacterianos o antibióticos. Ejemplos de tales agentes antibacterianos o antibióticos incluyen antibióticos cefem, carbapenem, aminoglicósido, nueva quinolona, β -lactama, penicilina y glicopéptido y similares, y más particularmente incluyen ceftazidima, meropenem, tobramicina, ciprofloxacina, meticilina, ampicilina, vancomicina, y

35 similares, pero no se limitan a estos.

40

Ejemplos

La presente invención ahora será descrita más concretamente a modo de Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los Ejemplos a continuación.

1. Síntesis de los Polipéptidos

45 Las resinas de péptido protegido se sintetizaron mediante el método Fmoc utilizando un sintetizador de fase sólida automático completo de acuerdo con el método descrito en los documentos tales como Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce (1984), Fmoc solid synthesis: a practical approach, Oxford University Press (2000) y The Fifth Series of Experimental Chemistry, Vol.16, Synthesis of Organic Compounds IV. A las resinas del péptido protegido obtenido, se le adicionaron ácido trifluoroacético (TFA) y un secuestrante (una mezcla de tioanisol, etanoditiol, fenol, triisopropilsilano, agua, etc.) para obtener péptidos crudos mediante la escisión de la resina y la desprotección. Estos péptidos crudos se purificaron por elución del gradiente utilizando un sistema de columna de HPLC de fase reversa

50 (ODS) en 0.1% de TFA-H₂O/CH₃CN. Las fracciones que contienen las sustancias deseadas se recolectaron y liofilizaron para obtener los péptidos deseados. Las secuencias de aminoácido de los péptidos sintetizados se confirmaron utilizando un secuenciador de aminoácido G1000A (Hewlett Packard), PPSQ-23A (SHIMADZU CORPORATION) o ProciscLC (ABI). Las secuencias de los péptidos se muestran a continuación. SR-2, SR-3, SR-4 y SR-6 fueron amidados en su terminal-C.

55

SR-1 (SEQ ID NO:1)

MLKLIFLHRLKRMKRLKRK

SR-2 (SEQ ID NO:2)

ELRFLHRLKRRLKRLKRKLR-amida

5 SR-3 (SEQ ID NO:3)

ELRFLHRLKRMKRLKRKLR-amida

SR-4 (SEQ ID NO:4)

KLIFLHRLKRMKRLKRKLR-amida

SR-5 (SEQ ID NO:5)

10 KRMKRLKRKRLRLWHRKRYK

SR-6 (SEQ ID NO:6)

MRKRLKRKRLRLWHRKRYK-amida

AG30-5C (SEQ ID NO:7)

MLKLIFLHRLKRMKRLKRKLRFWHRKRYK

15 2. Análisis de los Polipéptidos Utilizando MALDI-TOF/MS

Las secuencias de los polipéptidos sintetizados se confirmaron por los resultados del análisis utilizando MALDI-TOF/MS. A 1 μ L de una solución que contiene 0.1% de polipéptido en TFA/50% de acetonitrilo, cuya concentración final fue 100 μ g/mL, 1 μ L de una solución matriz (Ácido α -Ciano 4-Hidroxi Cinámico) se le adicionó para obtener una muestra de medición por MALDI. La muestra de medición por MALDI (0.4 μ L) se aplicó sobre una placa diana de MALDI y se secó, seguido por la medición utilizando MALDI-TOF/MS.

20

Condiciones de MALDI-TOF/MS:

Intensidad de láser: 2100

Número de Disparos de Láser: 1000

Resultados

25 En la Tabla 1, se muestran el valor teórico y valor medido de MALDI-TOF/MS para cada polipéptido. El m/z detectado de cada polipéptido se corresponde a cada valor teórico, y se confirmaron las secuencias de los polipéptidos sintetizados.

Tabla 1

Polipéptido	MH+ (Da)	
	Valor Teórico	Valor Medido
SR-1	2664.711405	2664.7424
SR-2	2870.897365	2870.9932
SR-3	2732.752685	2732.7961
SR-4	2688.788005	2688.7334
SR-5	2836.790145	2837.0413

(continuación)

Polipéptido	MH+ (Da)	
	Valor Teórico	Valor Medido
SR-6	2551.610055	2551.5486
AG30-5C	4135.558675	4135.9741

5 3. Actividad de Inducción de la Angiogénesis de los Polipéptidos

Utilizando AG30-5C como un control positivo, se midió la actividad de inducción de la angiogénesis de SR-1 y SR-2. Más concretamente, utilizando un kit de angiogénesis (Kit de Angiogénesis, KZ-1000, KURABO INDUSTRIES LTD.), se evaluó la capacidad de los polipéptidos para formar el lumen. Como un control negativo, se utilizó el grupo libre de polipéptido (Control).

10 Cada polipéptido se adicionó a un medio especial para la angiogénesis (KURABO INDUSTRIES LTD., KZ-1500) de tal manera que la concentración de este fue 10 µg/mL. Las células se cultivaron a 37°C bajo 5% de CO₂ en una placa de 24-pozos utilizando los medios especiales a los cuales se les adicionó el polipéptido. El medio se reemplazó con un medio que contiene el mismo polipéptido en el día 4, día 7 y día 9 del cultivo. En el día 11 desde el inicio del crecimiento, el medio se retiró y la tinción se realizó utilizando un kit para la tinción del lumen (para la tinción del anticuerpo CD31) de acuerdo con el siguiente procedimiento.

15 El anticuerpo primario (anticuerpo CD31 anti-humano de ratón) fue diluido 4000-veces con una solución de bloqueo (solución salina regulada de fosfato de Dulbecco (PBS(-)) que contiene 1% de BSA). A cada pozo, se le adicionaron 0.5 mL de esta solución de anticuerpo primario, y la placa se incubó, durante 60 minutos a 37°C. Después de la finalización de la incubación, cada pozo se lavó totalmente 3 veces con 1 mL de la solución de bloqueo.

20 A continuación, 0.5 mL de una solución de anticuerpo secundario (conjugado de fosfatasa alcalina IgG anti-ratón de cabra) diluida 500-veces con la solución de bloqueo, se adicionaron a cada pozo. La placa se incubó, durante 60 minutos a 37°C, y posteriormente cada pozo se lavó 3 veces con 1 mL de agua destilada. Durante este periodo, 2 comprimidos de BCIP/NBT se disolvieron en agua destilada, y la solución obtenida se filtró a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0.2 µm para preparar una solución del sustrato. A cada pozo, se le adicionaron 0.5 mL de la solución del sustrato BCIP/NBT preparada, y la placa se incubó a 37°C hasta que el lumen se torna a púrpura profundo (por lo general de 5-10 minutos). Después de la finalización de la incubación, cada pozo se lavó 3 veces con 1 mL de agua destilada. Después del lavado, la solución de lavado se eliminó, mediante la aspiración, y la placa se dejó reposar y secar naturalmente. Después del secado, se tomaron las fotografías de cada pozo con un microscopio.

30 Cada una de las imágenes obtenidas se cuantificó utilizando un software de cuantificación de angiogénesis. El análisis por ordenador se llevó a cabo en varios parámetros. Y, se midieron, las longitudes del lumen formado observado en cada campo visual, sobre la base de su escala, y se evaluó el efecto de la adición de los polipéptidos en comparación con el Control.

Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Polipéptido	La Longitud de Lumen (Porcentaje cuando se toma el Control como 100)
SR-1	124.3
SR-2	124.6
AG30-5C	119.1

35

Como se muestra en la Tabla 2, tanto SR-1 como SR-2, que son los polipéptidos de la presente invención, individualmente tienen una actividad de inducción de la angiogénesis. Su actividad fue mayor de AG30-5C.

4. Actividad Antibacteriana de los Polipéptidos (Parte 1)

La actividad antibacteriana de los polipéptidos se midió utilizando un método de ensayo de ATP.

Es decir, utilizando el Kit de Ensayo de Viabilidad Microbiano BacTiter-Glo disponible de PROMEGA, se evaluó la actividad antibacteriana de los péptidos a partir de la viabilidad de la bacteria. En otras palabras, la cantidad de ATP en bacterias viables en casos donde la concentración de los péptidos fue 10 µg/mL se midió utilizando una placa de microtitulación o tubos de prueba.

Con respecto a las cepas, se utilizaron *Staphylococcus aureus* ATCC29213 (*S. aureus* ATCC29213) como bacterias Gram-positivas, o, alternativamente, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* ATCC27853) como bacterias Gram-negativas. Las bacterias se cultivaron en medio, durante 3 a 4 horas, y posteriormente se midieron las absorbancias a A₆₀₀. Las suspensiones bacterianas se diluyeron con caldo Mueller-Hinton (MHB) de acuerdo con McFarland # 0.5. Cada cepa se adicionó con el fin de alcanzar aproximadamente 0.5-1 x 10⁵ CFU/mL (concentración final) en términos de *Escherichia coli*. Cada péptido se preparó y adicionó a una microplaca o tubos de prueba con el fin de alcanzar una concentración final de 10 µg/mL, y la suspensión bacteriana se adicionó a esta. Como un control negativo se consideró una solución a la cual los péptidos no fueron adicionados, y como un control positivo se consideró una solución a la cual se le adicionó tobramicina (TOB). La placa se incubó a 37°C, durante 3 horas, y se midió la cantidad de ATP en el medio de cultivo. Los valores relativos se calcularon por comparación con el control negativo, y estos valores fueron considerados como la viabilidad.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Compuesto	Viabilidad (%)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
TOB	3.5	1.8
SR-1	21.9	31.0
SR-2	8.0	4.2
SR-3	11.2	9.3
SR-4	2.1	13.2
SR-6	16.2	20.2
AG30-5C	29.1	12.9

Como se muestra en la Tabla 3, SR-1, SR-2, SR-3, SR-4 y SR-6, que son los polipéptidos de la presente invención, individualmente tienen una mayor actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* que AG30-5C. También, SR-2 y SR-3 individualmente tuvieron una mayor actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* que AG30-5C.

5. Actividad Antibacteriana de los Polipéptidos (Parte 2)

Además, con el fin de proveer la actividad antibacteriana de los polipéptidos descritos anteriormente, además del *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* como se menciona anteriormente, también se midió la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, dos tipos de enterobacterias (enterobacteria (1) y enterobacteria (2), respectivamente), *Klebsiella pneumoniae*, y *Staphylococcus epidermidis*.

Se midió el (%) de ATP de la actividad antibacteriana de la misma manera como se menciona anteriormente, y la "concentración inhibitoria mínima (MIC)" se midió como sigue. MIC es la concentración más baja de un agente que puede inhibir el crecimiento de una bacteria. MIC se utiliza como un parámetro de la eficacia de un agente antibacteriano, por la fuerza de sensibilidad bacteriana, o similares. La bacteria puede crecer (proliferar) cuando la concentración no es mayor que la MIC, y no puede crecer cuando la concentración es mayor que la MIC. Su medición se lleva a cabo de acuerdo con un método definido como un método estándar por Japanese Society of

5 Chemotherapy o CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI), pero, en este Ejemplo, su medición se llevó a cabo por un método de microdilución de acuerdo con "M100-S17/M7-A7" (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement, Vol. 27 No.1) publicado por CLSI en Enero, 2007. Es decir, la prueba de sensibilidad de los agentes se llevó a cabo utilizando una placa de microtitulación o tubos de prueba.

10 Las bacterias se cultivaron en el medio líquido, durante 4 a 6 horas, y posteriormente se midieron las absorbancias a A_{600} . Las suspensiones bacterianas se diluyeron con caldo Mueller-Hinton (MHB) de acuerdo con McFarland #0.5. Cada cepa se adicionó con el fin de alcanzar aproximadamente 10^5 CFU/ml (concentración final). Cada péptido se preparó a una concentración opcional, y las soluciones se diluyeron en serie a partir de la concentración. El polipéptido en cada etapa de concentración se adicionó a una microplaca o tubos de prueba, y la suspensión bacteriana se adicionó a esta. Una solución a la cual el péptido no se adicionó se consideró como un control negativo, y como controles positivos fueron consideradas las soluciones a las cuales se les adicionó individualmente meropenem (MEPM), ciprofloxacina (CPFX), tobramicina (TOB), u oxaciclina (OX). La placa se incubó a 37°C, durante 20 horas, la concentración más baja donde se inhibió el crecimiento bacteriano se consideró como la concentración inhibitoria mínima.

20 Con respecto a cada cepa, se utilizaron *Escherichia coli*: ATCC 25922 (*Escherichia coli* ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa*: ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), *Staphylococcus aureus*: ATCC29213 (*Staphylococcus aureus* ATCC29213), *Klebsiella pneumoniae*: JCM 1662 (*Klebsiella pneumoniae* JCM 1662), enterobacteria (1):JCM 1232 (*Enterobacter cloacae* JCM 1232), enterobacteria (2): JCM 1235 (*Enterobacter aerogenes* JCM 1235), y *Staphylococcus epidermidis*: JCM 2414 (*Staphylococcus epidermidis* JCM 2414).

25 Para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus epidermidis*, se llevaron a cabo las mediciones mediante ambos métodos de ensayo de MIC y ATP, pero, para dos tipos de Enterobacteria (Enterobacteria (1) y Enterobacteria (2), respectivamente) y *Klebsiella pneumoniae*, solamente se llevó a cabo el ensayo de ATP. Como las concentraciones de los agentes en el ensayo de ATP, se utilizaron las concentraciones que se describen en las Tablas.

A continuación, se muestran los resultados en la Tabla 4-1 y la Tabla 4-2 (Actividad de ATP) y en la Tabla 5 (MIC).

Tabla 4-1

Tabla de Actividad de ATP															
	<i>Escherichia coli</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
	Concentración de ensayo ATP (µg/ml)	(%) ATP	S.D.		Concentración de ensayo ATP (µg/ml)	(%) ATP	S.D.		Concentración de ensayo ATP (µg/ml)	(%) ATP	S.D.		Concentración de ensayo ATP (µg/ml)	(%) ATP	S.D.
TOB	1.0	3.8	0.2		1.0	1.7	0.2		1.0	3.1	0.6		1.0	4.2	0.2
CPFX	0.015	15.4	1.1		1.0	2.3	0.16		0.5	-	-		0.5	7.3	0.5
OX	0.5	114.4	24.3		0.5	83.1	9.0		0.5	72.8	41.2		0.5	101.4	3.1
MEPM	0.1	15.7	0.6		1.0	20.2	4.3		0.12	-	-		0.125	28.2	1.5
SR-1	10	18.4	0.7		10	26.0	21.0		10	5.2	4.6		10	5.2	0.4
SR-5	10	27.0	1.5		10	16.4	6.6		10	24.2	0.3		10	3.6	0.1
SR-4	10	13.0	0.7		10	9.8	5.8		10	1.0	0.4		10	5.5	0.2
SR-2	10	6.2	0.9		10	1.0	0.5		10	4.4	2.2		10	2.6	0.2
SR-3	10	16.5	0.6		10	3.3	2.4		10	3.5	0.1		10	4.1	0.1

Tabla 4-2

Tabla de Actividad de ATP									
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			Enterobacteria (1)			Enterobacteria (2)		
	Concentración de ensayo ATP	(%) ATP		Concentración de ensayo ATP	(%) ATP		Concentración de ensayo ATP	(%) ATP	
	($\mu\text{g/ml}$)	media	S.D.	($\mu\text{g/ml}$)	media	S.D.	($\mu\text{g/ml}$)	media	S.D.
TOB	4.0	3.8	0.1	4.0	3.0	0.2	4.0	0.5	0.1
CPFY	1.0	8.2	0.6	1.0	3.1	0.2	1.0	3.2	0.1
OX	0.5	142.2	11.1	4.0	97.7	6.0	4.0	86.9	11.7
MEPM	8.0	11.9	0.5	8.0	5.6	0.5	8.0	2.3	0.1
SR-1	10	22.1	1.4	10	4.9	0.5	10	39.4	0.9
SR-5	10	30.0	2.8	10	3.4	0.1	10	41.5	1.6
SR-4	10	15.0	0.8	10	4.9	0.6	10	20.9	0.6
SR-2	10	9.1	0.6	10	3.0	0.1	10	15.3	0.7
SR-3	10	20.3	1.3	10	4.3	0.3	10	23.5	1.0

Tabla 5

Tabla de MIC				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	MIC	MIC	MIC	MIC
	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
TOB	0.25-1.0	0.25-1.0	0.12-1.0	1
CPFY	0.004-0.015	0.25-1.0	0.12-0.5	0.12-0.5
OX	-	-	0.12-0.5	0.12-0.5
MEPM	0.008-0.06	0.25-1.0	0.03-0.12	0.125
SR-1	64	32	16	128<
SR-5	64	128 \leq	32	8-16
SR-4	32	32	16	8-32
SR-2	16	8-32	16-32	8
SR-3	16-32	16-32	16-32	8

5 A partir de estos resultados, se probó que los polipéptidos SR-1 a 5 individualmente tuvieron una actividad antibacteriana en relación con todas estas bacterias.

6. Efecto sobre el crecimiento de Fibroblastos Dérmicos

10 A continuación, se estudió el efecto de estos polipéptidos en el crecimiento de los fibroblastos dérmicos humanos (NHDF). Una actividad del crecimiento celular de los polipéptidos se examinó utilizando el Kit de Recuento Celular (WST-1) disponible de Dojindo Laboratories. Como un control negativo (Control), se utilizó un grupo libre de polipéptido. Las células (fibroblastos dérmicos de prepucio de recién nacido humano normales: NHDF(NB)) se sembraron en una placa de 96-pozos (0.5×10^4 células/pozo/100 μL , suero al 1%). Aproximadamente 3 horas después de la siembra de las células, los polipéptidos (1, 3, 10, 30, o 100 $\mu\text{g/ml}$) y FGF (100 ng/ml) como un control

positivo se adicionaron individualmente a las mismas en una cantidad de 100 μ L. Al grupo no estimulado, solamente se le adicionó un medio en una cantidad de 100 μ L. La placa se dejó en reposo en una incubadora de CO₂ por aproximadamente 48 horas. A partir de entonces, se adicionó el agente WST-1 a cada pozo en una cantidad de 20 μ L, y a continuación la placa se dejó en reposo en una incubadora de CO₂ por aproximadamente 2 horas. Se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 450 nm y 620 nm utilizando Wallac 1420 ARVOsx (Programa: WST-1). Un valor de O.D.₄₅₀ - O.D.₆₂₀ se calculó para cada medida. Los valores obtenidos restando la media de los valores de O.D.₄₅₀ - O.D.₆₂₀ de los pozos blancos que no contenían células de los valores de O.D.₄₅₀ - O.D.₆₂₀ de los pozos medidos fueron considerados como O.D.₄₅₀ Neto. La actividad del crecimiento celular se evaluó sobre la base de la relación de O.D.₄₅₀ Neto de grupos que contienen el polipéptido en relación con el O.D.₄₅₀ Neto del grupo no estimulado.

Los resultados se muestran en la Fig. 1. Como se muestra en Fig. 1, todos los péptidos mostraron un efecto promotor del crecimiento sobre las células del fibroblasto a una concentración de 1 μ g/ml a 30 μ g/ml, pero tienden a mostrar la toxicidad en las células a una concentración de 100 μ g/ml.

7. Formación del Lumen

Utilizando un kit de angiogénesis disponible de KURABO INDUSTRIES LTD. (Producto No.: KZ-1000), se evaluó la formación del lumen por los polipéptidos. Se utilizaron el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) como un control positivo, y el grupo no estimulado, libre de polipéptido como un control negativo.

Utilizando un medio especial para la angiogénesis que se adjunta al kit, cada polipéptido se preparó de tal manera que la concentración de este fue respectivamente 0.5, 2.5 y 10 μ g/mL. A una placa de 24-pozos en la cual las células se sembraron (las células fueron las obtenidas por medio del co-cultivo de células endoteliales vasculares humanas y células de fibroblastos a una concentración óptima) que se adjunta con el kit, se le adicionó el medio especial para la angiogénesis que contiene cada polipéptido, y las células se cultivaron a 37°C bajo 5% de CO₂. El medio se reemplazó con un medio que contiene el mismo aditivo en el día 4, día 7 y día 9 del cultivo. En el día 11 desde el inicio del crecimiento, la tinción se realizó utilizando un kit para la tinción del lumen (para la tinción del anticuerpo CD31) de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Los medios se retiraron, y se realizó el lavado con solución salina regulada de fosfato de Dulbecco (PBS(-)). A partir de entonces, se adicionó a la placa etanol al 70% congelado, y las células se fijaron. Cada pozo se lavó con una solución de bloqueo (solución salina regulada de fosfato de Dulbecco (PBS(-)) que contiene 1% de BSA). A cada pozo, se le adicionaron 0.5 mL del anticuerpo primario para la tinción de CD31 (anticuerpo CD31 anti-humano de ratón) diluido 4000-veces con la solución de bloqueo, y a continuación la placa se incubó, durante 60 minutos a 37°C. Después de la finalización de la incubación, cada pozo se lavó totalmente 3 veces con 1 mL de la solución de bloqueo. A continuación, se adicionaron a cada pozo, 0.5 mL de la solución de anticuerpo secundario (conjugado IgG de anti ratón de cabra/fosfatasa alcalina) diluida 500-veces con la solución de bloqueo. La placa se incubó, durante 60 minutos a 37°C, y posteriormente cada pozo se lavó 3 veces con 1 mL de agua destilada. Durante este periodo, se disolvieron 2 comprimidos de BCIP/NBT en agua destilada, y la solución obtenida se filtró a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0.2 mm para preparar una solución del sustrato. A cada pozo, se le adicionaron 0.5 mL de la solución del sustrato BCIP/NBT preparada, y la placa se incubó a 37°C hasta que el lumen se torna a púrpura profundo (por lo general de 5-10 minutos). Después de la finalización de la incubación, cada pozo se lavó 3 veces con 1 mL de agua destilada. Después del lavado, la solución de lavado se eliminó, mediante la aspiración, y la placa se dejó reposar y secar naturalmente. Después del secado, se tomaron con un microscopio las fotografías de cada pozo.

Cada una de las imágenes obtenidas se cuantificó utilizando un software de cuantificación de angiogénesis. Se midieron el área y la longitud del lumen formado observado en cada campo visual sobre la base de la escala de un software de cuantificación de angiogénesis disponible de KURABO INDUSTRIES LTD. (Software de cuantificación de angiogénesis Versión 1.0), y se evaluaron sobre la base de la relación del área o longitud de grupos que contienen polipéptido en relación con el área o longitud del grupo control negativo.

A continuación, se muestran los resultados en la Tabla 6-1 (el área de lumen) y la Tabla 6-2 (la longitud del lumen). En la Tabla 6-1 y Tabla 6-2, se muestran los valores relativos cuando se toma el control negativo como 100.

Tabla 6-1

El Área de Lumen			
Polipéptido	Concentración del Polipéptido (µg/mL)		
	0.5	2.5	10
SR-1	94.6	132.3	156.6
SR-2	110.7	138.4	138.0
SR-3	100.8	111.3	118.0
SR-4	90.5	104.6	96.2
SR-5	103.4	93.6	107.7
SR-6	97.3	104.5	98.6
VEGF-A		189.2	

Tabla 6-2

El Área de Lumen			
Polipéptido	Concentración del Polipéptido (µg/mL)		
	0.5	2.5	10
SR-1	97.4	130.5	149.5
SR-2	108.9	134.9	129.9
SR-3	101.9	115.3	122.6
SR-4	97.0	103.2	96.4
SR-5	106.2	95.0	106.8
SR-6	98.4	98.2	96.6
VEGF-A		169.8	

5 A partir de estos resultados, se demostró que los polipéptidos SR-1, SR-2 y SR-3 tienen claramente una alta capacidad para formar el lumen.

8. Estabilidad

A continuación, se evaluó la estabilidad de los cinco polipéptidos SR-1 a 5 en suero.

10 En suero humano (adquirido de KAC Co., Ltd.), o en suero de rata obtenidos mediante la recolección de sangre de una rata, a continuación la sangre recolectada se deja en reposo a temperatura ambiente, seguido por la centrifugación, cada uno de los péptidos se disolvió con el fin de alcanzar una concentración final de 500 µg/mL, y las soluciones obtenidas se dejaron en reposo a 37°C. Después de dejar en reposo, durante 10 min o 30 min o 60 min, estas soluciones se sometieron a análisis cromatográfico de HPLC para detectar los picos de los productos de descomposición, y calcular la relación de la concentración de los péptidos que permanecen en las soluciones en relación con la concentración inicial. Además, también se calcularon las vidas medias de los péptidos en suero.

15 Las condiciones de análisis de cromatografía HPLC son de la siguiente manera.

Columna: CAPCELL PAK C18 MGII (S-3 µm, 4.6 x 150PE, Shiseido Co., Ltd.)

Guarda Columna: GUARD CARTRIDGE CAPCELL C18 MG (S-3 µm, 4.0 x 10PE, Shiseido Co., Ltd.)

Temperatura de columna: 50°C

ES 2 467 691 T3

Fase Móvil A: 0.025% de solución de ácido trifluoroacético

Fase Móvil B: 0.025% de ácido trifluoroacético-acetonitrilo

Velocidad de Flujo: 1.0 mL/min

Detector: un absorciómetro ultravioleta (Longitud de Onda de Medición: 220 nm)

5 Volumen de inyección: 100 µL

Condiciones de gradiente:

Tiempo (min)	Fase Móvil A (%)	Fase Móvil B (%)
0	100	0
1	100	0
15	55	45
0	55	45
20.1	100	0
25	100	0

Los resultados se muestran, a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8

Estabilidad en suero de rata					
Relación péptido-remanente (%)					Vida media (min)
Péptido	0 min	10 min	30 min	60 min	
SR-1	100	-	0	0	3
SR-2	100	69	-	51.7	75
SR-3	100	53	-	44.4	67
SR-4	100	-	95	64.5	95
SR-5	100	-	0	0	4

Tabla 9

Estabilidad en suero humano				
Péptido	Relación péptido-remanente (%)			Vida media (min)
	0 min	10 min	60 min	
SR-1	100	0	0	4
SR-2	100	98	3.4	12
SR-3	100	79	6.8	15
SR-4	100	69	8	16
SR-5	100	25	9.5	21

En el suero de rata, SR-1 y SR-5 se descomposieron completamente en 1 hora, pero la descomposición de SR-2, SR-3 y SR-4 se limitó al rango de 35 a 55% a 37°C y 1 hora. En suero humano, más del 90% de cualquiera de los péptidos se descomposieron en 1 hora.

5 Además, también se evaluó la estabilidad de cada polipéptido (SR-1 a 5) en PBS. Las soluciones de los péptidos en PBS, cuya concentración final fue 1 mg/mL, se almacenaron a 4°C y temperatura ambiente. Inmediatamente después de preparar, y 2 y 4 semanas después de la preparación, las soluciones se sometieron a análisis de HPLC en las mismas condiciones como se describe anteriormente excepto que el volumen de inyección fue 5 µL. Y la estabilidad de almacenamiento en solución se evaluó sobre la base de si se observaron o no los picos de los productos de descomposición. Como resultado, los productos de descomposición no se observaron, y se encontró que todos los polipéptidos tienen una estabilidad de almacenamiento suficiente en PBS tanto a temperatura ambiente como a 4°C.

9. Comparación de la capacidad para formar el tejido de granulación en modelo de disco de papel

15 A continuación, se estudió la capacidad para formar el tejido de granulación de los cinco polipéptidos SR-1 a 5 *in vivo*. Cada uno de los péptidos que fueron la sustancia de prueba y cuya concentración fue respectivamente 25, 250 y 2500 µg/mL, la formulación de bFGF (controles positivos) cuya concentración fue respectivamente 2.5, 25 y 250 µg/mL, o solución salina (controles negativos) se adicionaron a un disco de papel (PAPEL DE FILTRO φ 8 mm , ADVANTEC) en una cantidad de 40 µl, de tal manera que, en el estado final, la dosificación de cada péptido fue 1, 10 o 100 µg/disco y la dosificación de la formulación de bFGF fue 0.1, 1 o 10 µg/disco. Los discos de papel preparados fueron incrustados por vía subcutánea en la parte trasera de las ratas Crl:CD (SD) (machos de 9 semanas de edad, obtenidos de Charles River Laboratories Japan, Inc.). Ocho días después, los discos de papel fueron sacados, y los tejidos de granulación alrededor de los discos de papel se recolectaron para determinar su peso húmedo.

25 Los resultados se muestran en las Figs. 2A a 2F. Con respecto a SR-1 y SR-3, cuando su dosificación fue de 10 µg/disco (250 µg/mL x 40 µl/disco), se observó el mayor incremento en el peso del tejido de granulación. A partir de este resultado, se cree que especialmente SR-1 y SR-3 también promueven la angiogénesis en la administración tópica *in vivo*, y contribuyen para formar el tejido de granulación.

9. Efecto para curar las heridas de corte

30 A continuación, utilizando el modelo de herida de corte de rata, se evaluó el efecto de los cinco polipéptidos SR-1 a 5, para curar las heridas de corte *in vivo*. Como se describe en Tetsuaki Yamaura et al. (Oyo Yakuri (Pharmacometrics) 22, 565-579 (1981)), el modelo de herida de corte de rata se produjo y se midió la tensión del cierre de la herida.

35 Es decir, una herida de corte de 30 a 36 mm se hizo sobre la parte trasera de ratas Crl:CD (SD) (machos de 7 semanas de edad, obtenidos de Charles River Laboratories Japan, Inc.) utilizando una maquinilla de afeitar de seguridad, y se sutura en 3 puntos igualmente espaciados. El día en el que se aplicó este tratamiento quirúrgico se consideró como día 1 (día 0). Sobre el sitio de la sutura, se adicionaron gota a gota 50 µL de cada uno de los péptidos que fueron la sustancia de prueba y preparados respectivamente con la concentración de 10, 100 y 1000 µg/mL (las cantidades adicionadas fueron 500 ng y 5 y 50 µg, respectivamente). Las adiciones de 50 µL de solución salina fisiológica fueron consideradas como controles negativos (Solución salina). Cada péptido se adicionó gota a gota una vez al día hasta el día en el que se llevó a cabo la medida de la tensión del cierre de la herida. Las suturas se retiraron el día 3, y la tensión del cierre de la herida se midió en el día 6.

45 Los resultados se muestran en las Figs. 3A a 3F. SR-1, SR-3, SR-4 y SR-5 mostraron un efecto de aumento de la tensión del cierre de la herida. En comparación con la cicatrización de heridas de corte de individuos a los cuales se les administró la formulación de bFGF, en individuos a los cuales se les administró cualquiera de los polipéptidos de la presente invención, especialmente SR-1, SR-2, SR-3 y SR-4, las marcas de heridas de corte obviamente habían desaparecido por completo en comparación con individuos a los cuales se les administró la formulación de bFGF, y la cicatrización apenas se observó mediante observación visual (los datos no se muestran).

10. El efecto de cicatrización de SR-1 en modelo de herida infectada de rata

50 Mientras que un efecto para promover la cicatrización de una herida de corte se demostró en la sección anterior, además de que, se evaluó un efecto de cicatrización sobre una herida infectada con *Staphylococcus aureus*. Referring to Stenberg BD et al. (J Surg Res. 1991 Jan;50(1):47-50.) y Hayward P et al. (Am J Surg. 1992 Mar;163(3):288-93.), un modelo de herida infectada de rata se produjo como se describe a continuación. Se utilizaron ratas HWY/slc sin pelo (machos de 7 semanas de edad, obtenidas de Japan SLC, Inc.). El día antes de que se crearan los defectos de espesor completo, se midió el número de leucocitos y se administró la ciclofosfamida en la vena de la cola (100 mg/kg). En el siguiente día, se volvió a recontar el número de leucocitos. Solo se utilizaron

los individuos en los que el número de leucocitos no fue más de 5000. Unos defectos de espesor de forma cuadrada completos de 1.73 x 1.73 cm (aproximadamente 3 cm²) se crearon en la parte posterior de las ratas, y 25 µL de *Staphylococcus aureus* (aproximadamente 10⁵ CFU/25 µL) y péptido SR-1 como una sustancia de prueba (2 mg/mL) se adicionó sobre los sitios de defecto (la cantidad administrada fue 50 µg). Por otra parte, se adicionaron gota a gota 25 µL de la formulación de bFGF (3 µg/25 µL) en el grupo de la formulación bFGF (un control positivo), y 25 µL de solución salina fisiológica se adicionaron gota a gota en los grupos de control negativo. Después de la administración de las sustancias de prueba, el sitio de las heridas se cubrió con una cubierta (PERME-ROLL, Nitto Medical Corporation) (día 0). A partir de entonces, *Staphylococcus aureus* y la sustancia de prueba se adicionaron gota a gota una vez al día, durante 4 días consecutivos (días 0, 1, 2 y 3). Seis días después de que se crearon los defectos de espesor completo (día 6), se midió el área donde las heridas aún no habían sanado para calcular la relación de esta en relación con el área cuando las heridas se crearon, y la relación se consideró como la relación del área de la herida en el día 6.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10

Grupos	Relación del área de herida en el día 6
Ctl. (solución salina, no infectada)	84.5
Ctl. (solución salina, infectada)	96.4
La formulación de bFGF (infectada)	93.1
SR-1 (infectada)	80.2

Como se muestra en la Tabla 10, en los grupos donde fue inducida la infección en las heridas, la cicatrización de las heridas se retrasó en comparación con el grupo no infectado. También se encontró que, en el grupo donde SR-1 se administró a la herida infectada, la epidermis de la piel se disminuyó más rápidamente y la herida se cicatrizó más rápidamente en comparación con el caso donde la formulación de bFGF se administró a la herida infectada. Se observó una eficacia igual a o mayor que la formulación de bFGF. A partir de esto, se probó que, en relación con las heridas asociadas con la infección, SR-1 muestra un mayor efecto de cicatrización en comparación con la formulación de bFGF.

Aplicabilidad Industrial

Los polipéptidos de la presente invención son útiles como un agente inductor de la angiogénesis, un agente antibacteriano, un agente para la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel, y un agente para la prevención, mejora o tratamiento de infección bacteriana en una(s) herida(s) de la piel.

Texto Libre de Lista de Secuencia

[SEQ ID NO:1] SR-1

[SEQ ID NO:2] SR-2. Su residuo de arginina en el terminal C se modifica por amidación.

[SEQ ID NO:3] SR-3. Su residuo de arginina en el terminal C se modifica por amidación.

[SEQ ID NO:4] SR-4. Su residuo de arginina en el terminal C se modifica por amidación.

[SEQ ID NO:5] SR-5

[SEQ ID NO:6] SR-6. Su residuo de lisina en el terminal C se modifica por amidación.

Lista de Secuencia

LISTA DE SECUENCIA

<110> AnGes MG Inc.

<120> Polipéptidos Novedosos que tienen actividad angiogénica y actividad antimicrobiana y usos médicos de los mismos

<130> PF000404-PCT

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SR-1

10 <400> 1

Met Leu Lys Leu Ile Phe Leu His Arg Leu Lys Arg Met Arg Lys Arg
1 5 10 15

Leu Lys Arg Lys
20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221>h @AMIDATION

<222> 21

<223> SR-2.h @ El residuo de arginina terminal C se modifica por amidación.

20 <400> 2

Glu Leu Arg Phe Leu His Arg Leu Lys Arg Arg Leu Arg Lys Arg Leu
1 5 10 15

Lys Arg Lys Leu Arg
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221>h @AMIDATION

<222> 20

5 <223> SR-3. El residuo de arginina terminal C se modifica por amidación.

<400> 3h @

Glu Leu Arg Phe Leu His Arg Leu Lys Arg Met Arg Lys Arg Leu Lys
1 5 10 15

Arg Lys Leu Arg
20

<210> 4

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221>h @AMIDATION

<222> 20

15 <223> SR-4. El residuo de arginina terminal C se modifica por amidación.

<400> 4

Lys Leu Ile Phe Leu His Arg Leu Lys Arg Met Arg Lys Arg Leu Lys
1 5 10 15

Arg Lys Leu Arg
20

<210> 5

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SR-5

<400> 5

ES 2 467 691 T3

Lys Arg Met Arg Lys Arg Leu Lys Arg Lys Leu Arg Leu Trp His Arg
1 5 10 15

Lys Arg Tyr Lys
20

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221>h @AMIDATION

<222> 18

<223> SR-6.h @ El residuo de lisina terminal C se modifica por amidación.

10 <400> 6

Met Arg Lys Arg Leu Lys Arg Lys Leu Arg Leu Trp His Arg Lys Arg
1 5 10 15

Tyr Lys

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AG30-5C

<400> 7

Met Leu Lys Leu Ile Phe Leu His Arg Leu Lys Arg Met Arg Lys Arg
1 5 10 15

Leu Lys Arg Lys Leu Arg Phe Trp His Arg Lys Arg Tyr Lys
20 25 30

20

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en cualquiera de SEQ ID NOs: 1 a 6.
2. Un agente inductor de la angiogénesis que comprende el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, como un ingrediente efectivo.
- 5 3. El agente inductor de la angiogénesis de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido se muestra en la SEQ ID NO:1, 2 o 3.
4. Un agente antibacteriano, que comprende el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, como un ingrediente efectivo.
- 10 5. Uso del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de un agente inductor de la angiogénesis.
6. Un polipéptido para utilizar en la inducción de la angiogénesis, el cual es el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
7. Un agente para utilizar en la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel, dicho agente que comprende el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, como un ingrediente efectivo.
- 15 8. El agente para utilizar en la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la(s) herida(s) de la piel es(son) seleccionada(s) del grupo que consiste de heridas de la piel causadas por heridas de corte, heridas quirúrgicas, erosiones, quemaduras, escaras, heridas intratables, úlceras de la piel, úlceras en las piernas, úlceras diabéticas, enfermedad arterial oclusiva y arteriosclerosis ocluyente.
- 20 9. El agente para utilizar en la prevención, mejora o tratamiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la herida de la piel es una herida intratable.
10. El agente para utilizar en la prevención, mejora o tratamiento de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la herida de la piel es una herida asociada con la infección.
11. Un agente para la prevención, mejora o tratamiento de una infección bacteriana en una(s) herida(s) de la piel, que comprende el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, como un ingrediente efectivo.
- 25 12. Uso del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, para producir un agente para la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel o infección bacteriana en una(s) herida(s) de la piel.
13. Un polipéptido para utilizar en la prevención, mejora o tratamiento de una(s) herida(s) de la piel o infección bacteriana en una(s) herida(s) de la piel, que es el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.

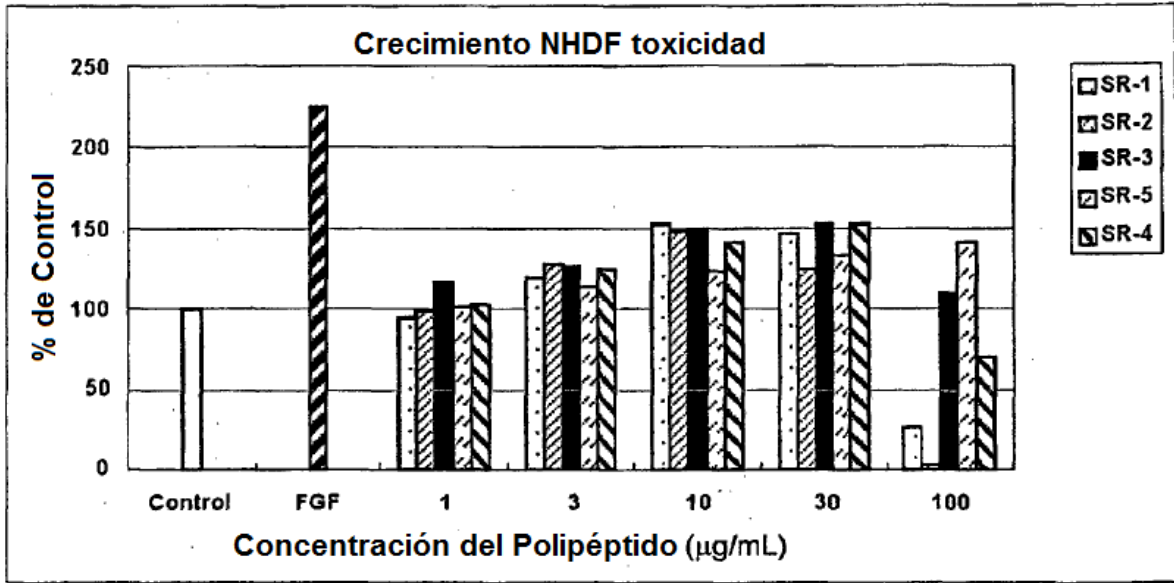


Fig.1

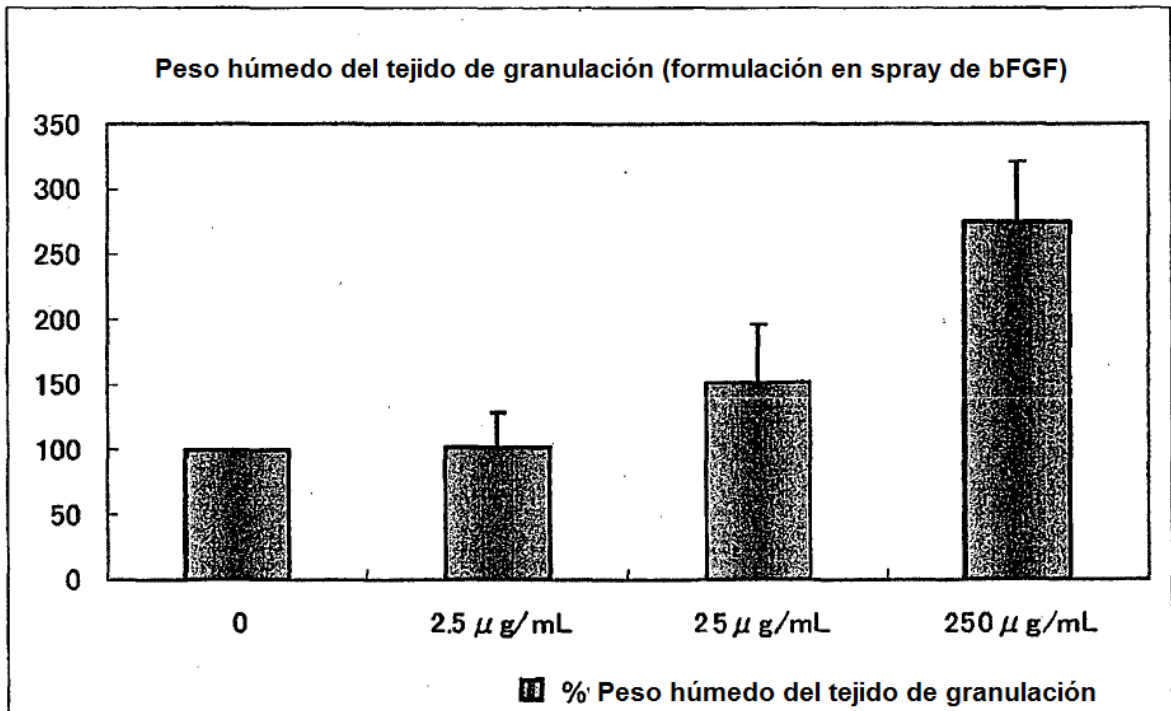


Fig.2A

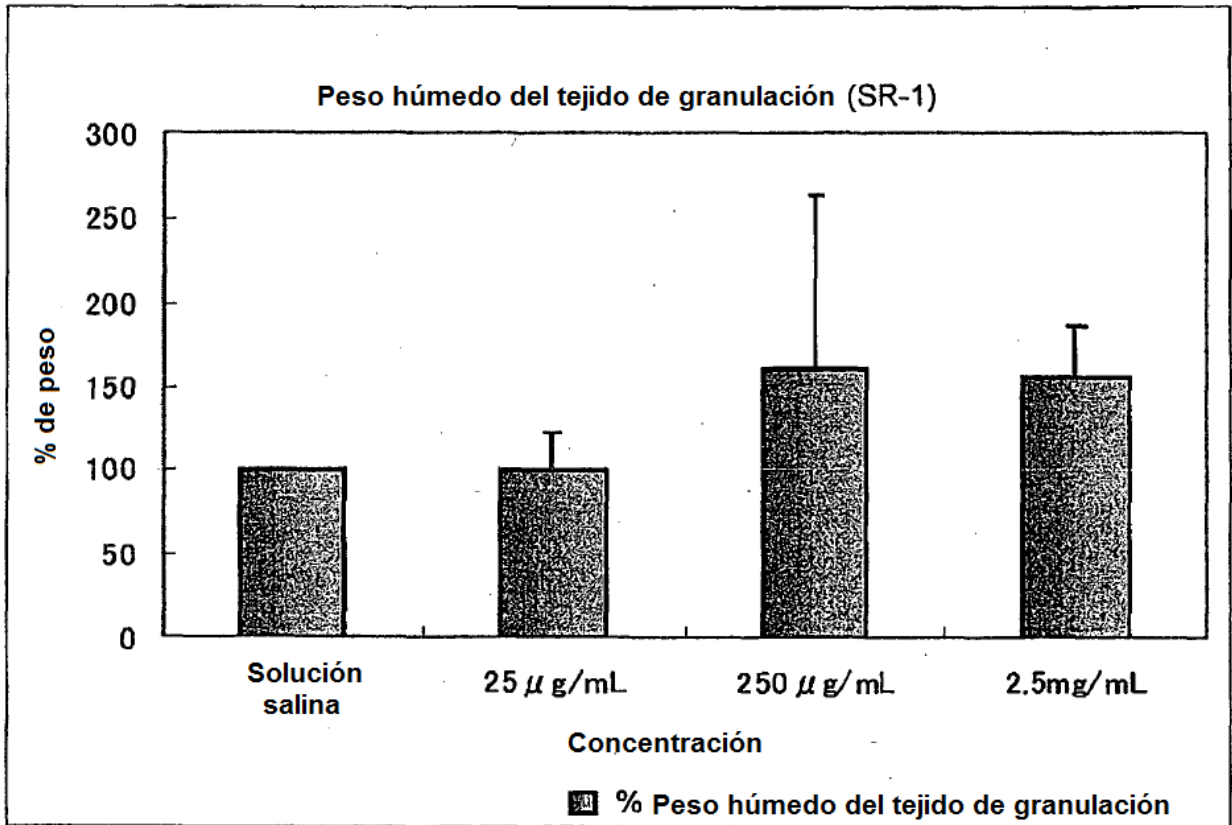


Fig.2B

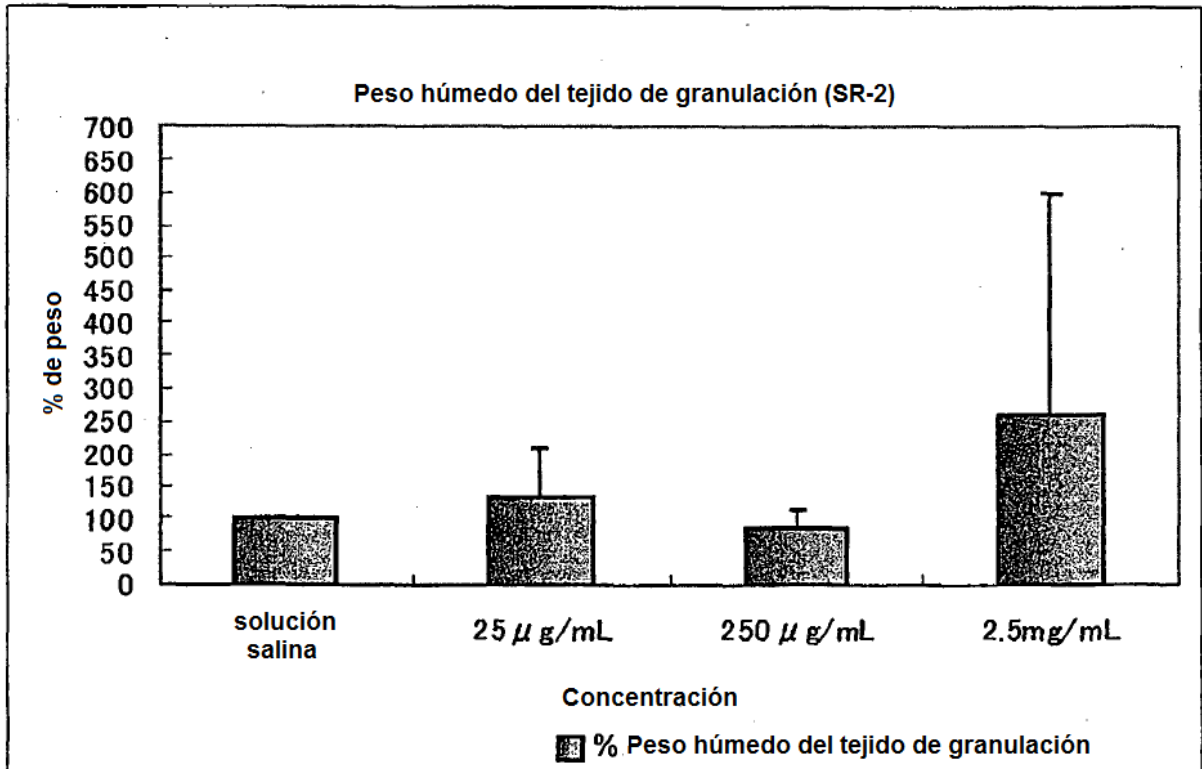


Fig.2C

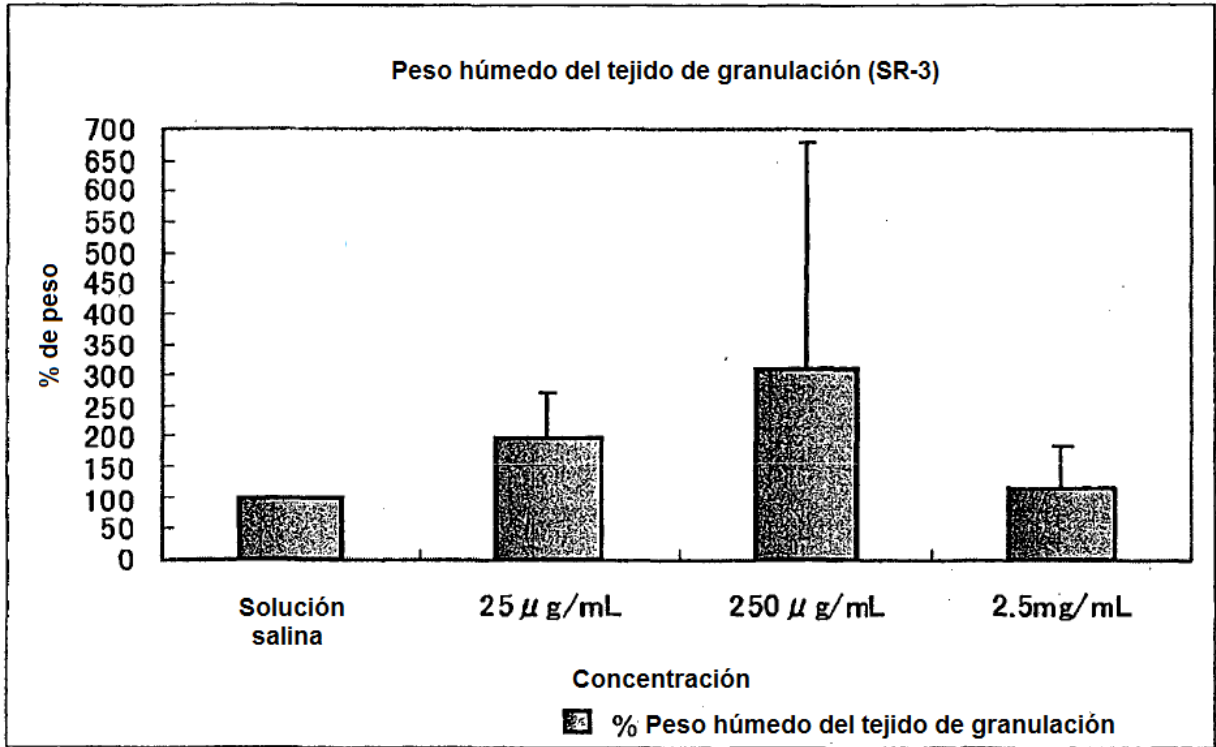


Fig.2D

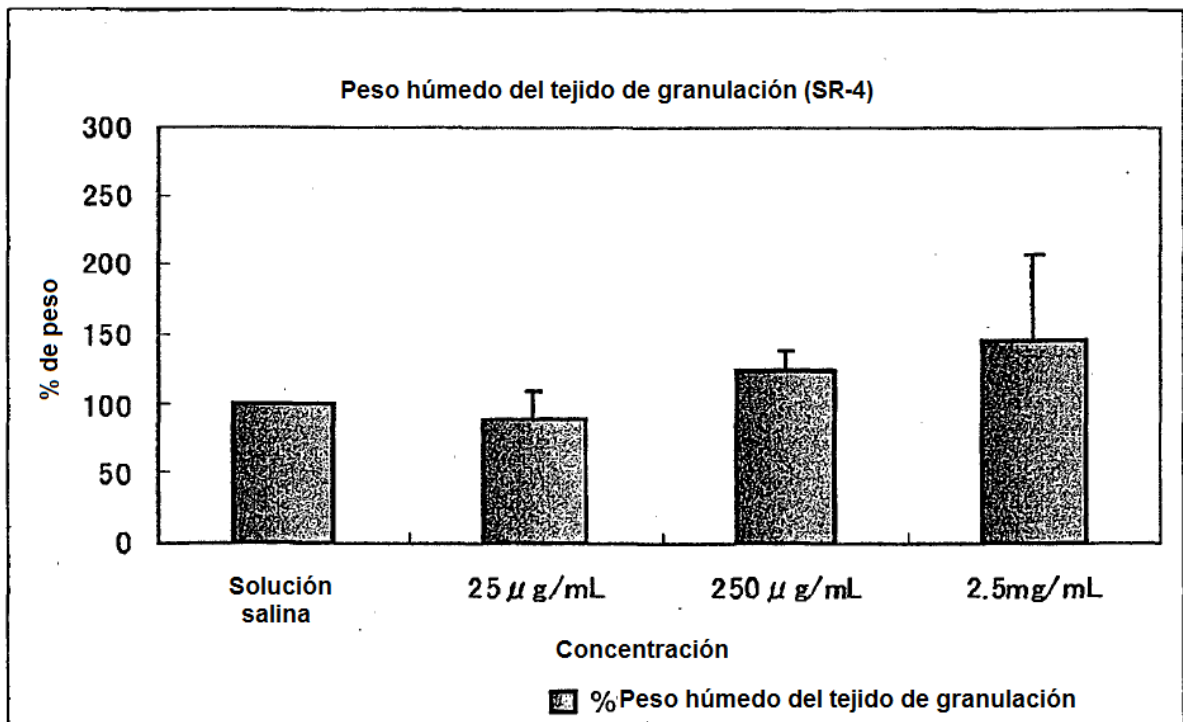


Fig.2E

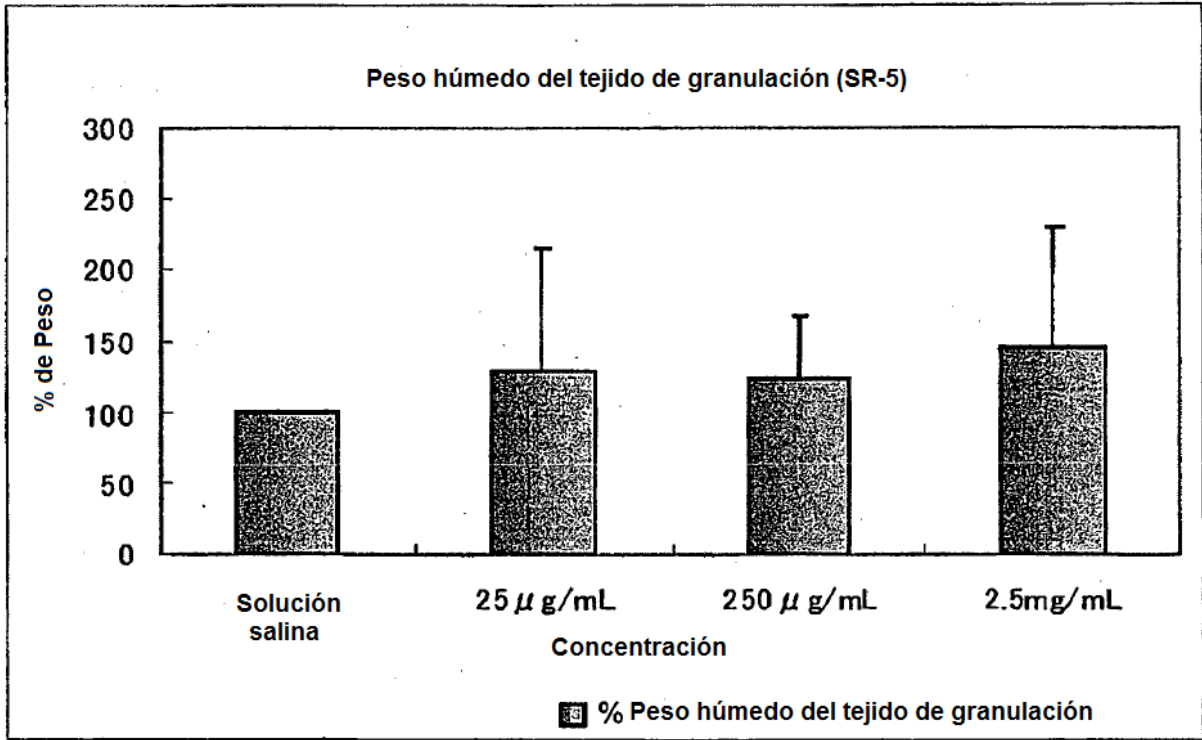


Fig.2F

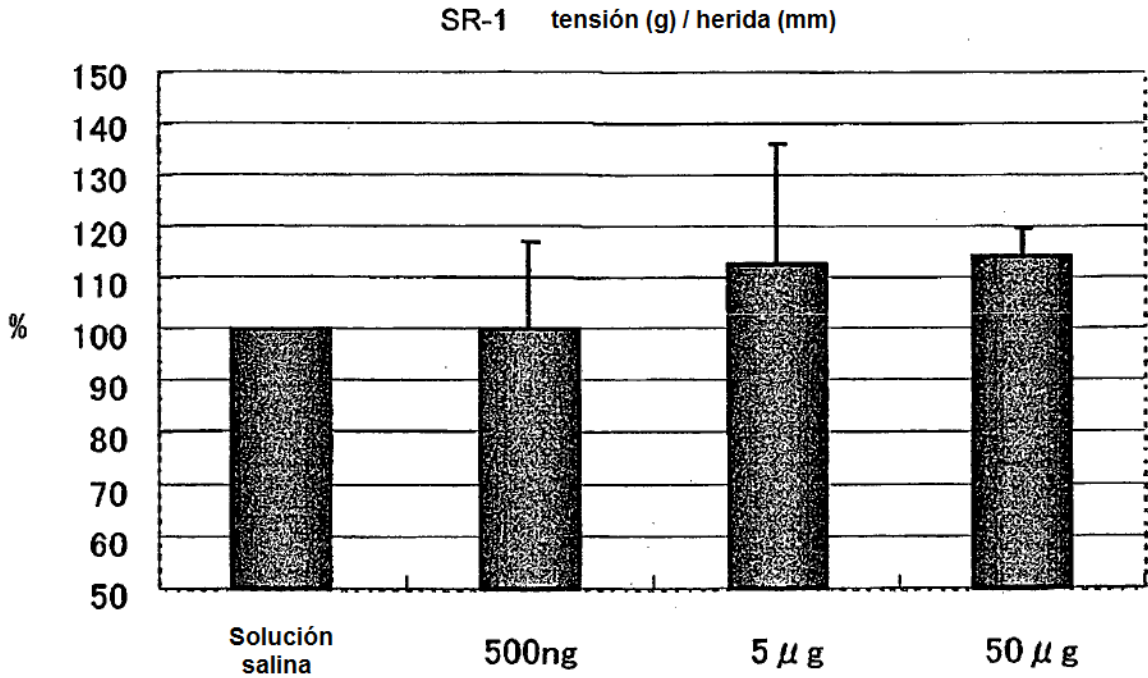


Fig.3A

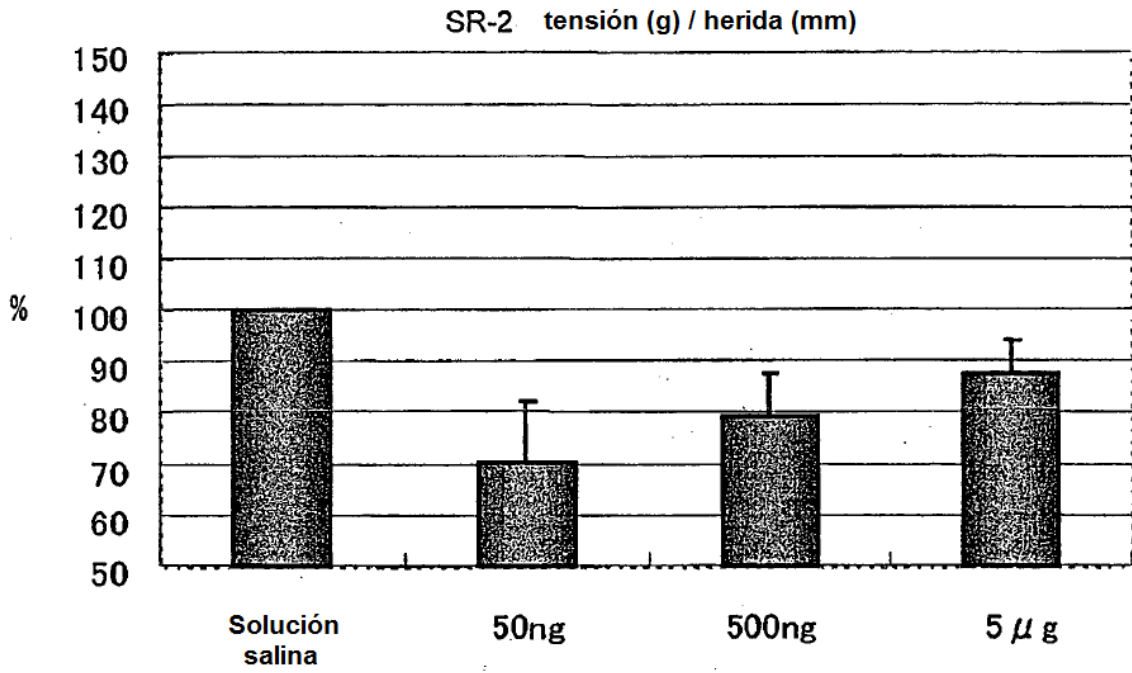


Fig.3B

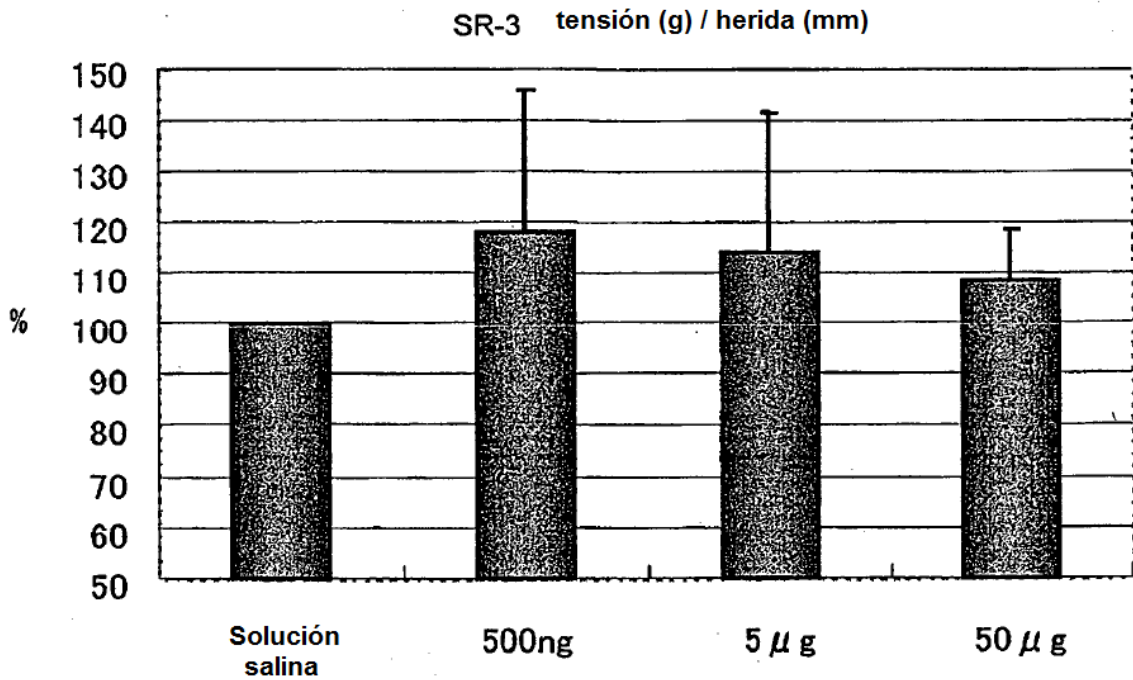


Fig.3C

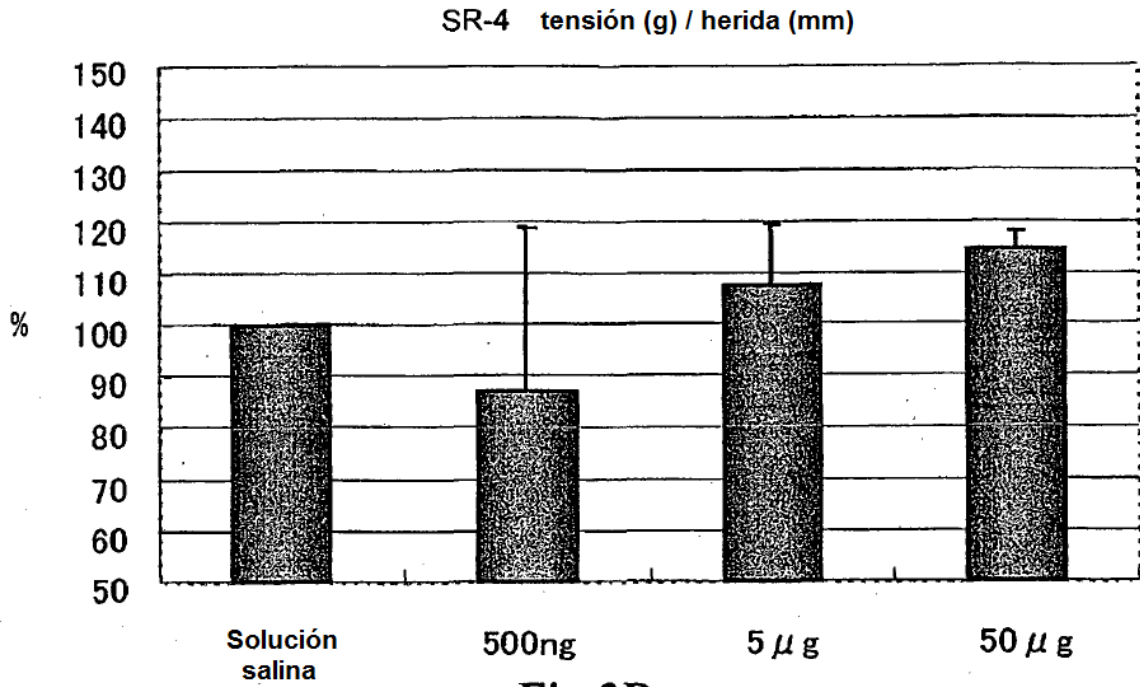


Fig.3D

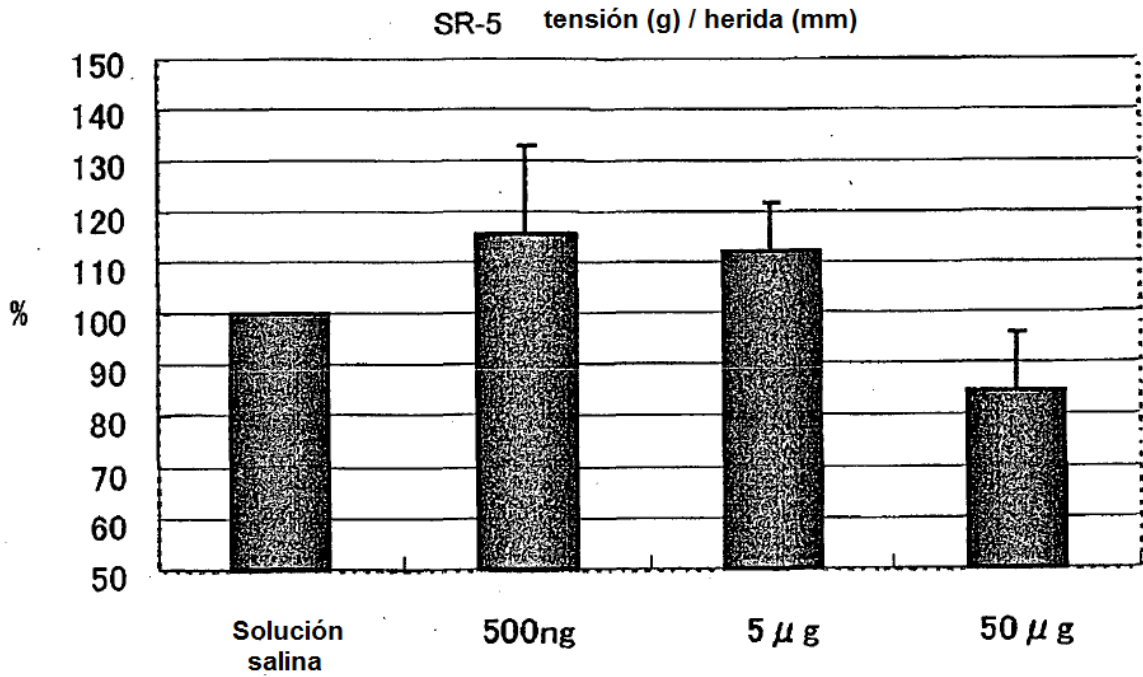


Fig.3E

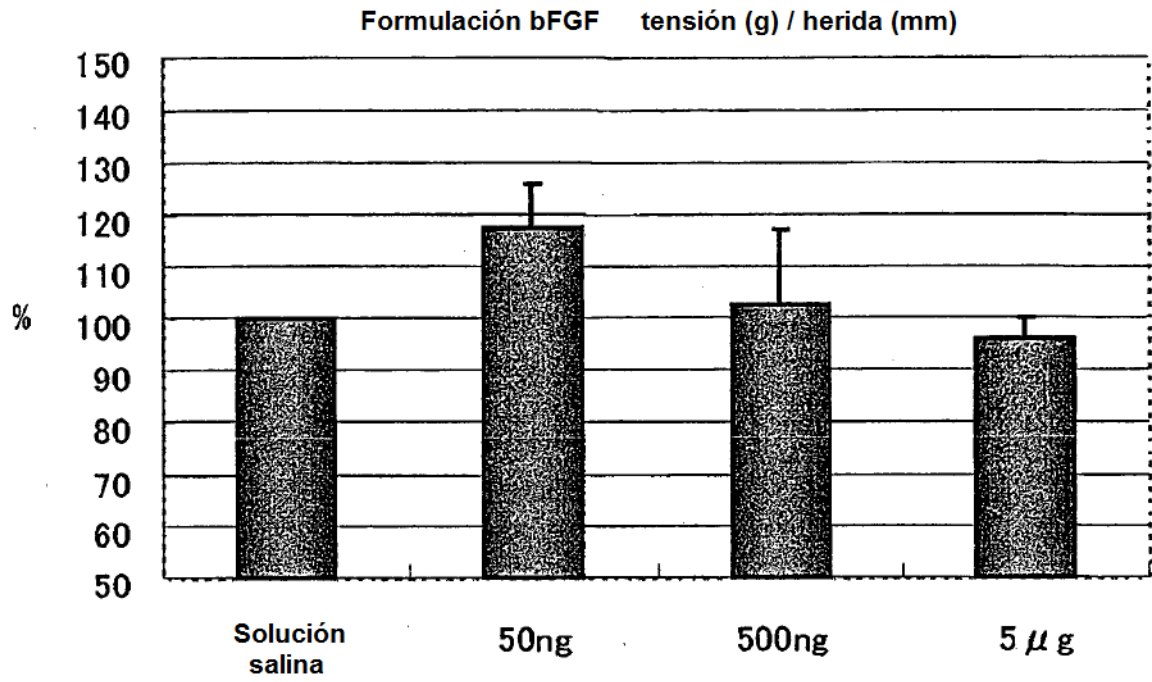


Fig.3F