

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 506 168**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2010 E 10780549 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2436688**

54 Título: **Polipéptido que tiene actividad antibacteriana y actividad que induce la angiogénesis y fármacos que contienen dicho polipéptido que curan heridas**

30 Prioridad:

25.05.2009 JP 2009125072

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

13.10.2014

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;
TAMURA, NAO;
SATA, RYOKO;
MAEDA, AKITO;
TENMA, AKIKO;
KANAMORI, TOSHIHIDE;
SAITO, YOSHIMI;
KOMABA, SHINTARO y
MORISHITA, RYUICHI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 506 168 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 que tiene actividad antibacteriana y actividad que induce la angiogénesis y fármacos que contienen dicho polipéptido que curan heridas.

Campo técnico

- 5 La presente invención se relaciona con polipéptidos novedosos los cuales tienen una actividad que induce la angiogénesis y una actividad antibacteriana, así como un agente que induce la angiogénesis que contiene el polipéptido y un agente para el tratamiento de una herida(s) que contiene el polipéptido.

Técnica antecedente

- 10 La angiogénesis es útil en el tratamiento de diversas enfermedades o lesiones, incluyendo quemaduras, hinchazones, heridas, úlceras de la piel, úlceras en las piernas, úlceras diabéticas, enfermedad arterial oclusiva y la arteriosclerosis obliterante. Puesto que la exacerbación sería de la condición patológica puede ser inducida por infección bacteriana en estas enfermedades, se exige un agente que induce la angiogénesis o un agente para tratar una herida(s), el cual tiene tanto una actividad antibacteriana y una actividad que induce la angiogénesis.

- 15 Tal como un polipéptido que tiene una actividad que induce la angiogénesis y una actividad antibacteriana, LL-37 es conocida (Literaturas no Patente 1 y 2).

Además, Nakagami et al., inventó un polipéptido que tiene una actividad de crecimiento endotelial vascular, y, a su vez, una actividad que induce la angiogénesis, y descubrió además que el péptido tiene una actividad que induce la angiogénesis mayor que LL-37, y luego presentó una solicitud de patente dirigida al mismo (Literatura de Patente 1).

- 20 Adicionalmente, Nakagami et al., descubrió un polipéptido AG30-5C, el cual consiste en residuos de 30 aminoácidos y tiene una actividad que induce la angiogénesis más alta que el péptido de la Literatura de Patente 1 y luego presentó una solicitud de patente dirigida al mismo (Literatura de Patente 2).

Las Literaturas de patente 1 y 2 también divulgan que los polipéptidos tienen una actividad antibacteriana.

Además, como un péptido que exhibe una actividad que induce la angiogénesis con una dosificación baja, es conocido el péptido 20 de Terminal NH2 de Proadrenomedulina (PAMP) (Literatura no patente 3).

- 25 Resumen de la invención

Problemas a resolver por la invención

- 30 Un objeto de la presente invención es proveer un polipéptido novedoso el cual tiene una actividad más alta que induce la angiogénesis y una actividad más alta antibacteriana y un agente novedoso que induce la angiogénesis el cual contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo o un agente novedoso para el tratamiento de una herida(s) el cual contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo.

Medios para resolver los problemas

Los inventores presentes descubrieron polipéptidos que tienen una actividad de crecimiento endotelial vascular más alta, y a su vez, una actividad de inducción de la angiogénesis más alta, que los polipéptidos anteriores. Además, estos polipéptidos tenían una actividad antibacteriana más alta que los polipéptidos convencionales.

- 35 Los inventores presentes estudiaron intensivamente para descubrir, mediante la búsqueda de análogos de los polipéptidos tal como se describe en las Literaturas de Patente 1 y 2, polipéptidos que tienen una actividad que induce la angiogénesis más alta y una actividad antibacteriana más alta que los polipéptidos, completando así la presente invención.

Esto es, la presente invención se relaciona con:

- 40 (1) Un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 8 y 10 tal como se define en las reivindicaciones.
- (2) El polipéptido de acuerdo con (1), cuya secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 8.
- (3) El polipéptido de acuerdo con (1), cuya secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 10.
- (4) El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), cuyo terminal carboxilo está amidado.

- (5) Un agente que induce la angiogénesis que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de (1) a (4) como un ingrediente efectivo.
- (6) Un agente antibacteriano que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de (1) a (4) como un ingrediente efectivo.
- 5 (7) Un polipéptido para inducir la angiogénesis, el cual es el polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4).
- (8) Un agente para uso en la prevención, mejora o tratamiento de una enfermedad(s) o trastorno(s) seleccionado del grupo que consiste de hinchazones, heridas, erosiones, úlceras de la piel y heridas incurables, comprendiendo dicho agente el polipéptido según uno cualquiera de (1) a (4) como un ingrediente efectivo.
- 10 (9) El agente para uso en la prevención, mejora o tratamiento de acuerdo con (8), en donde las enfermedades o trastornos seleccionados del grupo que consiste de hinchazones, heridas, erosiones, úlceras de la piel y heridas incurables están asociadas con infecciones bacterianas o micóticas.
- (10) El agente para uso en la prevención, mejora o tratamiento de acuerdo con (8), en donde la enfermedad(s) o trastorno(s) es (son) seleccionado del grupo que consiste de hinchazones, heridas, erosiones, úlceras de la piel y heridas incurables.
- 15 (11) Un polipéptido para uso en la prevención, mejora o tratamiento de una enfermedad(s) o trastorno(s) seleccionado del grupo que consiste de hinchazones, heridas, erosiones, úlceras de la piel y heridas incurables, el cual es el polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4).
- (12) Un polipéptido para uso como un agente antibacteriano, el cual es el polipéptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (4).
- 20 Efectos de la invención
- Mediante la presente invención, se proveyó un polipéptido que tiene una excelente actividad que induce la angiogénesis y una excelente actividad antibacteriana, tal como se define en las reivindicaciones. También se proveyó un agente novedoso que induce la angiogénesis que contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo, tal como se define en las reivindicaciones.
- 25 Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 muestra los resultados de prueba de formación de lumen realizada en los polipéptidos SR-07 (SEQ ID NO: 10) y SR-08 (SEQ ID NO: 8), los cuales son los ejemplos de la presente invención.
- La figura 2 muestra los resultados de la prueba de producción de colágeno realizada en los polipéptidos SR-07 y SR-08, los cuales son los ejemplos de la presente invención.
- 30 La figura 3 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto de los polipéptidos SR-07 y SR-08, los cuales son los ejemplos de la presente invención, en el crecimiento de las células endoteliales de la vena umbilical humana.
- La figura 4 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto de los polipéptidos SR-07 y SR-08, los cuales son los ejemplos de la presente invención, en el crecimiento de los fibroblastos dérmicos humanos normales.
- 35 La figura 5 muestra los resultados obtenidos al probar la capacidad de formar tejido de granulación del polipéptido SR-07, el cual es el ejemplo de la presente invención, en el modelo de disco de papel.
- La figura 6 muestra los resultados obtenidos al probar la capacidad de formar tejido de granulación del polipéptido SR-08, el cual es el ejemplo de la presente invención, en el modelo de disco de papel.
- La figura 7 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto de curar una herida de corte del polipéptido SR-07 el cual es el ejemplo de la presente invención.
- 40 La figura 8 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto de curar una herida de corte del polipéptido SR-08 el cual es el ejemplo de la presente invención.
- La figura 9 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto de curar una herida infectada del polipéptido SR-07 el cual es el ejemplo de la presente invención.
- 45 La figura 10 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto de curar una herida infectada del polipéptido SR-08 el cual es el ejemplo de la presente invención.

La figura 11 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto de curar una herida incurable de los polipéptidos SR-07 y SR-08, los cuales son los ejemplos de la presente invención, en el modelo de colgajo de la diabetes.

La figura 12 muestra los resultados obtenidos al probar el número de días hasta la curación completa de una herida en el caso del polipéptido SR-07, el cual es el ejemplo de la presente invención.

5 La figura 13 muestra los resultados obtenidos al probar el número de días hasta la curación completa de una herida en el caso del polipéptido SR-08, el cual es el ejemplo de la presente invención.

La figura 14 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto de curar una hinchazón del polipéptido SR-07, el cual es el ejemplo de la presente invención.

10 La figura 15 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto de curar una hinchazón del polipéptido SR-08, el cual es el ejemplo de la presente invención.

La figura 16 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto curativo del polipéptido SR-07 en una úlcera de decúbito, el cual es el ejemplo de la presente invención.

La figura 17 muestra los resultados obtenidos al probar el efecto curativo del polipéptido SR-08 en una úlcera de decúbito, el cual es el ejemplo de la presente invención.

15 Modo de llevar a cabo la invención

Como se describió anteriormente, el polipéptido de la presente invención es un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en una cualquiera de los SEQ ID NOs: 8 y 10. En la presente descripción, los términos "polipéptido" y "péptido" se usan como sinónimos.

La secuencia de aminoácidos de AG30-5C, el cual es el polipéptido descrito

20 Literatura de Patente 2, se muestra en SEQ ID NO: 7. Como se describió concretamente en la Literatura de Patente 2 y los Ejemplos a continuación, AG30-5C tiene una actividad antibacteriana y una actividad que induce la angiogénesis. Se produjeron diversos análogos de AG30-5C, y se examinaron la actividad que induce la angiogénesis y la actividad antibacteriana de ellos. Como resultado, se comprobó que los polipéptidos de la presente invención descritos anteriormente tienen una actividad que induce la angiogénesis y una actividad antibacteriana.
25 Como se describe concretamente en los Ejemplos a continuación, los polipéptidos, los cuales son los ejemplos de la presente invención, tenían una actividad más alta que induce la angiogénesis y una actividad antibacteriana más alta que AG30-5C.

Todos los polipéptidos, cada uno de los cuales es el ingrediente efectivo del agente que induce la angiogénesis de la presente invención, son sustancias novedosas.

30 En general, con respecto a un producto farmacéutico compuesto de un polipéptido(s), son ampliamente conocidas y utilizadas técnicas para aumentar la estabilidad del polipéptido(s) *in vivo*, en donde una cadena(s) de azúcar y/o una cadena(s) de polietilén glicol (PEG) es (son) añadido al polipéptido(s), o en donde un D-aminoácido(s) es (son) utilizado como al menos una parte de los aminoácidos que constituyen el polipéptido(s). La adición de una cadena(s) de azúcar y/o una cadena(s) de PEG a un polipéptido, o el uso de un D-aminoácido(s) como al menos una parte de
35 los aminoácidos que constituyen un polipéptido hace más poco probable que el polipéptido sea descompuesto por una 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 amidación del terminal C de un péptido incrementa la estabilidad del péptido. Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser polipéptidos que se modifican con estas modificaciones conocidas para la estabilización *in vivo*, en tanto tienen una actividad antibacteriana. Y, el término "polipéptido" tal como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas incluyen polipéptidos que son modificados con una
40 modificación(s) para la estabilización *in vivo*, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

La adición de una cadena de azúcar a un polipéptido es bien conocida, 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 sialyloligosaccharide-displaying insulins showing a prolonged blood-sugar-lowering activity.", J Am Chem Soc. 2004
45 Nov 3;126(43):14013-22, and 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 puede estar unida al terminal N, terminal C o al aminoácido entre los mismos, pero se prefiere que una cadena de azúcar se una a terminal N o terminal C, con el fin de no inhibir la actividad del polipéptido. Y, el número de las cadenas de azúcar a añadir es preferiblemente una o dos, más preferiblemente una. La cadena de azúcar es preferiblemente de mono- a tetra-sacárido, más preferiblemente disacárido o trisacárido. La cadena(s) de azúcar puede estar enlazada directamente a un grupo(s) amino libre o un grupo(s) carboxilo en el polipéptido, o a través de una estructura (s) espaciadora tal como una cadena de metileno cuyo número de átomos de carbono es de aproximadamente 1 a 10.
50

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, Farmanfarmaian A, Minko T., "Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide.", Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Sep 6; 102(36):12962-7. Una cadena de PEG puede estar enlazada a terminal N, terminal C o el aminoácido entre los mismos, y una o dos cadenas de PEG usualmente están enlazadas a un grupo(s) amino libre y / o grupo(s) carboxilo en el polipéptido. El peso molecular de la cadena de PEG no está particularmente limitado, pero típicamente aproximadamente 3000 a 7000, preferiblemente de aproximadamente 5000.

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 Brenneman 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, Charness ME., "Ethanol antagonist peptides: structural specificity without stereospecificity.", J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jun; 309(3):1183-9. Una parte de los aminoácidos que constituyen el polipéptido puede ser un ácido 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 ejemplos de las sales farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, una sal con un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico; y una sal con un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico. Entre éstos, es más preferible la sal de ácido clorhídrico, sal de ácido acético, o sal de ácido trifluoroacético.

Los polipéptidos que son los ingredientes efectivos de los agentes que inducen la angiogénesis de la presente invención pueden ser producidos fácilmente por métodos convencionales tales como un método de síntesis química utilizando un sintetizador de péptidos disponible comercialmente. Además, las modificaciones descritas anteriormente para la estabilización también pueden ser llevadas fácilmente a cabo por 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 que induce la angiogénesis, pueden ser utilizados como un agente que induce la angiogénesis. Los métodos de uso de ellos como agentes que inducen la angiogénesis son los mismos los conocidos agentes que inducen la angiogénesis basados en polipéptidos. Se pueden administrar como soluciones, emulsiones, suspensiones, polvos, pulverizables, gránulos, geles, pomadas o parches transdérmicos, especialmente preferiblemente como soluciones, polvos, o parches transdérmicos. Preferiblemente, se puede administrar como la solución, una solución reguladora, especialmente preferiblemente una solución disuelta en un medio acuoso tal como una solución reguladora de solución salina fisiológica. La concentración del polipéptido en la solución no está particularmente limitado, pero usualmente es aproximadamente 0.001 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0.001 mg/ml a 10 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml a 5 mg/ml, especialmente preferiblemente de aproximadamente 1 mg/ml a 10 mg/ml. En general, la ruta de administración es una administración tópica tal como la aplicación y la inyección a un sitio(s) que requiere(s) angiogénesis. La dosificación se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de los síntomas, el tamaño de la parte afectada, o similares. En general, la dosificación es, en términos del polipéptido, aproximadamente de 0.001 mg a 100 mg, preferiblemente de aproximadamente 0.005 mg a 50 mg, especialmente preferiblemente de aproximadamente 0.01 mg a 10 mg, pero sin limitarse a estos rangos, por supuesto. Tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable el cual es utilizado en la formulación del agente que induce la angiogénesis de la presente invención, además del medio acuoso como se mencionó anteriormente, pueden ser utilizados vehículos que se usan comúnmente en el campo de la formulación farmacéutica. Por ejemplo, en el caso de una preparación externa tal como un ungüento, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen hidrocarburos (petrolato hidrófila, petrolato blanco, lanolina purificada, parafina líquida, etc.), óxido de zinc, ácidos grasos superiores 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, sebacato de dietilo, laurato de hexilo, iso-octanoato de cetilo, etc.), ceras (espermaceti, cera de abejas, ceresina, etc.), y alcoholes superiores (cetanol, alcohol estearilo, alcohol cetosteárico, etc.). En el caso de una solución, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, solución salina fisiológica y solución salina fisiológica regulada con fosfato. En el caso de una preparación oral, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo lactosa y almidón. Además de éstos, según sea necesario, diversos aditivos farmacéuticos tales como emulsionantes, agentes surfactantes, agentes isotónicos, también se pueden añadir ajustadores de pH. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables y aditivos farmacéuticos son bien conocidos en el campo de la formulación farmacéutica y se utilizan ampliamente.

Ejemplos específicos de enfermedades y trastornos en los casos donde el polipéptido de la presente invención y el agente para la prevención, la mejora y el tratamiento que contiene el polipéptido como un ingrediente activo se administran a un cuerpo vivo incluyen, pero sin limitarse a, hinchazones, heridas (incluyendo heridas de cortadas y

heridas quirúrgicas, y, en la presente descripción, esta disposición se aplica también en lo sucesivo), erosiones y úlceras en la piel (incluyendo decubituses (escaras), úlceras de hinchazones, úlceras traumáticas, úlceras en las piernas (incluyendo el síndrome varicoso), úlceras postherpética, úlceras, úlceras de radiación, úlceras de fármacos, úlceras diabéticas y úlceras postoperatorias, y, en lo sucesivo en la presente descripción, también se aplica esta disposición); e hinchazones, heridas y úlceras de la piel asociadas con la infección; y heridas incurables (incluyendo aquellas asociadas con la infección y/o úlceras). El término "úlceras de la piel" se refiere a la condición en donde el daño (defecto o necrosis) alcanza la dermis (véase, por ejemplo, the Japanese Journal of Clinical Dialysis, vol.24, No.7, 2008, 819-921), en otras palabras, se refiere a la condición en donde la capa epidérmica está completamente defectuosa o necrótica y la capa dérmica está también, total o parcialmente, defectuosa o necrótica (véase, por ejemplo, Eur. J. Dermat. Vol.10, No.3, 2000, 173-80). En general, las heridas asociadas con úlceras de la piel también se refieren a las heridas como incurables o úlceras de la piel incurables. Puesto que las heridas asociadas con las úlceras son heridas más serias y los polipéptidos de la presente invención también muestran un efecto terapéutico en úlceras en la piel, aquellos expertos en la técnica serían capaces de entender que estos presentarán un efecto terapéutico también contra heridas que son menos serias que las úlceras (incluyendo hinchazones).

En la presente descripción, el término "tratamiento" incluye no sólo que desaparece completamente las heridas y úlceras descritas anteriormente, sino también que reduce parcialmente el área de las heridas y úlceras. Además, en la presente descripción, los términos "tratamiento" y "mejoramiento" incluyen la promoción de la desaparición completa y la reducción parcial del área de las heridas y úlceras.

El polipéptido de la presente invención y el agente para la prevención, mejora y tratamiento que contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo se puede utilizar como un agente para la prevención, mejora o tratamiento para estas enfermedades o trastornos. Dado que el polipéptido de la presente invención y el agente para la prevención, mejora y tratamiento que contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo no sólo tienen una alta actividad que induce la angiogénesis, sino también una actividad antibacteriana, que son especialmente adecuados como un agente para la prevención, mejora o tratamiento de enfermedades o trastornos que son también deseados para tener una actividad antibacteriana. Ejemplos de tales enfermedades o trastornos incluyen, entre las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente, hinchazones, decubituses, heridas y úlceras de la piel. Además, el polipéptido de la presente invención y el agente para la prevención, mejora y tratamiento que contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo también son útiles no sólo para hinchazones, heridas, erosiones y úlceras en la piel que están asociadas con la infección, sino también para prevención de la infección de las enfermedades o trastornos anteriores que no están asociados con la infección.

Los polipéptidos de la presente invención presentan una actividad antibacteriana contra bacterias (que incluyen bacterias aeróbicas y bacterias anaeróbicas) y hongos, y tienen un amplio espectro antibacteriano. Por lo tanto, los polipéptidos de la presente invención son útiles no sólo para hinchazones, heridas, erosiones y úlceras en la piel que están infectados con estos amplios rangos de bacterias (incluyendo la infección secundaria); e hinchazones, heridas y úlceras de la piel asociadas con la infección; y heridas incurables (incluyendo aquellas asociadas con la infección y/o úlceras) y otros traumas, sino también para la prevención de la infección de estos amplios rangos de bacterias. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención son útiles para el tratamiento, la mejora y prevención de la infección de la piel de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, enterobacterias o similares. Por ejemplo, el polipéptido de la presente invención y el agente para la prevención, mejora y tratamiento que contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo puede ser utilizado no sólo para promover la curación de una herida quirúrgica después de la sutura en una operación quirúrgica (está incluida la promoción de granulación), sino también para prevenir la infección de la misma (incluyendo la infección secundaria). Por supuesto, también pueden utilizarse para la curación de la infección de las heridas quirúrgicas infectadas y/o las heridas *per se*.

Además, puesto que los polipéptidos de la presente invención tienen una actividad de la angiogénesis, también pueden ser utilizados como un agente para tratar la enfermedad arterial oclusiva la arteriosclerosis obliterante.

El polipéptido de la presente invención y el agente para la prevención, mejora y tratamiento que contiene el polipéptido como un ingrediente efectivo se puede utilizar individualmente, y, si además se desean propiedades antimicrobianas, se pueden utilizar en combinación con otros agentes antibacterianos o antibióticos. Ejemplos de tales agentes antibacterianos o antibióticos incluyen cefem, carbapenem, aminoglucósido, nueva quinolona, β -lactama, penicilina y antibióticos glicopéptidos y similares, y más particularmente incluyen ceftazidima, meropenem, tobramicina, ciprofloxacina, metilicina, ampicilina, vancomicina y similares, pero no limitada a los mismos.

EJEMPLOS

La presente invención se describirá ahora más concretamente por medio de Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

1 Síntesis de los polipéptidos

Resinas de péptido protegido se sintetizaron por el método de Fmoc usando un sintetizador en fase sólida completamente automático de acuerdo con el método descrito en 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. Para las resinas de péptido protegido obtenidas, se agregaron ácido trifluoroacético (TFA) y un devorador (una mezcla de tioanisol, etanoditiol, fenol, triisopropilsilano, agua, etc.) para obtener péptidos crudos mediante la escisión de las resinas y de desprotección. Estos péptidos crudos se purificaron mediante elución en gradiente usando una columna de HPLC en fase reversa (ODS) en sistema de TFA-H₂O/CH₃CN al 0.1%. Las fracciones que contienen las sustancias deseadas se recogieron y se secaron por congelación para obtener los péptidos deseados. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos sintetizados fueron confirmadas mediante el uso de un secuenciador de aminoácidos G1000A (Hewlett Packard), PPSQ-23A (SHIMADZU CORPORATION) o ProciscLC (ABI).

Las secuencias de los péptidos se muestran a continuación. Con respecto a SR-2, SR-3, SR-4 y SR-6, sus terminales C están amidados, y estos péptidos amidados se utilizaron en los Ejemplos descritos a continuación. En las secuencias que se listan, con respecto a estos péptidos cuyos terminales C están amidados, sólo se muestran sus secuencias de aminoácidos.

SR-1 (SEQ ID NO:1) (no reivindicada)

MLKLIFLHRLKRMRLKRLKRLK

SR-2 (SEQ ID NO:2) (no reivindicada)

20 ELRFLHRLKRRLKRLKRLKRLK-amida

SR-3 (SEQ ID NO:3) (no reivindicada)

ELRFLHRLKRMRLKRLKRLK-amida

SR-4 (SEQ ID NO:4) (no reivindicada)

KLIFLHRLKRMRLKRLKRLK-amida

25 SR-5 (SEQ ID NO:5) (no reivindicada)

KRMRLKRLKRLKRLKRLKRLK

SR-6 (SEQ ID NO:6) (no reivindicada)

MRKRLKRLKRLKRLKRLK-amida

AG30-5C (SEQ ID NO:7) (no reivindicada)

30 MLKLIFLHRLKRMRLKRLKRLKRLKRLK

SR-08 (SEQ ID NO:8)

LKLIFLHRLKRMRLKRLK*RK-amida

(K*: D-Lys)

PAMP (SEQ ID NO:9) (no reivindicada)

35 ARLDVASEFRKKWNLKALSRLK-amida

2. Análisis de los polipéptidos usando MALDI-TOF/MS

Las secuencias de los polipéptidos sintetizados fueron confirmadas por los resultados del análisis utilizando MALDI-TOF/MS. Para 1 µL de una solución que contiene el polipéptido en TFA al 0.1%/ acetonitrilo al 50%, cuya concentración final fue de 100 µg/µL, se agregó 1 µL de una solución de matriz (ácido cinámico α-ciano-4 hidroxil) para obtener una muestra de medición para MALDI. La muestra de medición para MALDI (0.4 ml) se aplicó sobre una placa objetivo MALDI y se secó, seguido por la medición utilizando MALDI-TOF/MS.

Condiciones de MALDI-TOF/MS:

Intensidad láser: 2100

Número de disparos: 1000

Resultados

- 5 El valor teórico y el valor medido de MALDI-TOF/MS para cada polipéptido se muestran en la Tabla 1. El m/z detectado de cada polipéptido fue emparejado para 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
SR-6	2551.610055	2551.5486
AG30-5C	4135.558675	4135.9741

Tabla 2

MH+ (Da)		
Polipéptido	Valor teórico	Valor medido
SR-08	2532.686895	2532.7292
PAMP	2460.373995	2460.5696

10 3. Actividad que induce la angiogénesis de los polipéptidos

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

- 15 Cada polipéptido se agregó a un medio especial para la angiogénesis (KURABO INDUSTRIES LTD., KZ-1500) tal que la concentración del mismo fue de 10 µg/µL. Las células fueron cultivadas a 37°C por debajo de CO₂ al 5% en una placa de 24 pozos usando los medios especiales a los cuales se agregó el polipéptido. El medio fue reemplazado con un medio que contiene el mismo polipéptido en el Día 4, Día 7 y Día 9 de cultivo. En el Día 11 desde el comienzo del cultivo, se retiró el medio y la tinción se realizó utilizando un kit para la tinción de lúmina (para
- 20 la tinción de anticuerpos CD31) de acuerdo con el siguiente procedimiento.

El anticuerpo primario (anticuerpo CD31 antihumano de ratón) fue diluido 4000 veces con una solución bloqueadora (solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (PBS(-)) que contiene BSA al 1%). A cada pozo, se agregó 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 µL de la solución bloqueadora.

- 25 Luego, se agregaron 0.5 µL de una solución de anticuerpo secundario (IgG antiratón de cabra/fosfatasa alcalina conjugada) diluida 500 veces con la solución bloqueadora a cada pozo. La placa se incubó durante 60 minutos a

37°C, y posteriormente cada pozo se lavó 3 veces con 1 µL de agua destilada. Durante ese período, 2 tabletas 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 mm para preparar una solución de sustrato. A cada pozo, se agregaron 0.5 µL de la solución de sustrato BCIP/NBT preparada, y la placa se incubó a 37°C hasta que la lúmina se tornó a púrpura profundo (típicamente durante 5-10 minutos). Después de la finalización de la incubación, cada pozo se lavó 3 veces con 1 µL de agua destilada. Después del lavado, la solución de lavado se eliminó por aspiración, y la placa se dejó reposar y secar naturalmente. Después del secado, se tomaron fotografías de cada pozo bajo un microscopio.

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

Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3

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

Como se muestra en la Tabla 3, tanto SR-1 y SR-2 tenían individualmente una actividad que induce la angiogénesis. Su actividad fue mayor que AG30-5C.

Tabla 4

Polipéptido	La longitud de Lúmina (Porcentaje cuando se toma el Control como 100)
SR-08	174.3
PAMP	124.6
AG30-5C	165.7

Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 4, SR-08, el cual es el polipéptido de la presente invención, tenía una actividad que induce la angiogénesis. Su actividad fue mayor que AG30-5C y PAMP.

4. Actividad antibacteriana de los polipéptidos

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

Usando kit de Ensayo de Viabilidad Celular Microbiana BacTiter-Glo disponible de PROMEGA, la actividad antibacteriana de los péptidos fue evaluada a partir de la viabilidad de las bacterias. En otras palabras, la cantidad de ATP en las bacterias viables en los casos donde la concentración de los péptidos fue 10 µg/µL se midió usando una placa de microtitulación o tubos de ensayo.

Con respecto a las cepas, se utilizó *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 los medios durante 3 a 4 horas, y después se midieron absorbancias a A600. Se diluyeron las suspensiones bacterianas con caldo de Mueller-Hinton (MHB) de acuerdo con la escala de McFarland # 0.5. Cada cepa se añadió a fin de alcanzar aproximadamente $0.5-1 \times 10^5$ CFU/µL (concentración final) en términos de *Escherichia coli*. Cada péptido se preparó y se agregó a una microplaca o tubos de ensayo a fin de alcanzar una concentración final de 10 µg/µL, y la suspensión bacteriana fue agregada al mismo. Una solución a la que los péptidos no se han añadido fue considerada como un control negativo, y una solución a la que la tobramicina (TOB) se añadió, fue considerado como un control positivo. La placa fue incubada a 37°C durante 3 horas, y se midió la cantidad de ATP en el medio de cultivo. Los valores relativos fueron calculados por comparación con el control negativo, y estos valores fueron considerados como la viabilidad.

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

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

5 Como se muestra en la Tabla 3, SR-1, SR-2, SR-3, SR-4 y SR-6 tenían individualmente una actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* mayor que AG30-5C. También, SR-2 y SR-3 tenían, individualmente, una actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* mayor que AG30-5C.

Ejemplo 2

1 Síntesis de los polipéptidos

10 El polipéptido de la presente invención, SR-07, y un polipéptido de control, AP00196, fueron sintetizados de la misma manera como en el Ejemplo 1, y las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos sintetizados fueron confirmados cada uno de la misma manera como en el Ejemplo 1. Las secuencias de estos polipéptidos fueron como sigue.

SR-07 (SEQ ID NO: 10)

MLKLIFLHRLKRMRLK*¹⁰RK

15 AP00196 (Control) (SEQ ID NO: 11) (no reivindicada)

KNLRRIRKIIHIIKKYG

2. Actividad antibacteriana de los polipéptidos (Ensayo de ATP)

20 La actividad antibacteriana de cada uno de los polipéptidos SR-08 y SR-07 fue medido utilizando un método de ensayo de ATP. Esto es, utilizando el kit de Ensayo de Viabilidad Celular Microbiana BacTiter-Glo disponible de PROMEGA, la actividad antibacteriana de los péptidos fue evaluada a partir de la viabilidad de las bacterias. En otras palabras, la cantidad de ATP en las bacterias viables en los casos donde la concentración de los péptidos fue 10 µg/µL se midió usando una placa de microtitulación o tubos de ensayo. Como controles, se utilizaron tobramicina (TOB), oxacilina (OX) y meropenem (MEPM) a las concentraciones que respectivamente se muestran en la Tabla 6 a continuación.

25

Tabla 6

Concentración de controles positivos ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteria (1)	Enterobacteria (2)
TOB	1.0	1.0	1.0	4.0	4.0	4.0
OX	1.0	1.0	0.125	4.0	4.0	4.0
MEPM	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

5 Con respecto a las cepas, 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), y enterobacteria (2): JCM 1235 (*Enterobacter aerogenes* JCM 1235).

10 Las bacterias fueron cultivadas en los medios durante 3 a 4 horas, y después las absorbancias fueron medidas a A600. Las suspensiones bacterianas se diluyeron con caldo de Mueller-Hinton (MHB) de acuerdo con la escala de McFarland # 0.5. Cada cepa fue añadida a fin de alcanzar aproximadamente $0.5-1 \times 10^5$ CFU/ μL (concentración final) en términos de *Escherichia coli*.

15 Cada péptido se preparó y se agregó a una microplaca o tubos de ensayo a fin de alcanzar una concentración final de $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, y la suspensión bacteriana fue agregada al mismo. La placa fue incubada a 37°C durante 3 horas, y se midió la cantidad de ATP en el medio de cultivo. Los valores relativos fueron calculados por comparación con el control negativo, y estos valores fueron considerados como la viabilidad.

Los resultados (valores medios) se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteria (1)	Enterobacteria (2)
TOB	4.1	1.5	3.4	4.6	2.9	0.7
OX	91.6	96.7	73.3	134.9	107.6	108.4
MEPM	12.4	19.3	89.8	9.2	3.8	1.7
AP 00196	0.8	27.3	1.9	5.1	2.4	0.8
SR-07	7.1	8.1	1.0	11.9	3.3	16.5
SR-08	3.9	2.1	1.1	7.9	3.5	13.8

Como se muestra en la Tabla 7, los polipéptidos de la presente invención tenían un amplio espectro antibacteriano.

20 3. Actividad antibacteriana de los polipéptidos (Medición MIC)

Además, con respecto no sólo a las cepas descritas anteriormente, sino también a varias otras cepas, la "concentración inhibidora mínima (MIC)" se midió como sigue. La MIC es la concentración más baja de un agente que puede inhibir el crecimiento de una bacteria. La MIC es utilizado como un parámetro para la eficacia de un agente antibacteriano, para la fuerza de la sensibilidad bacteriana, o similares. Las bacterias pueden crecer (proliferar) cuando la concentración no es mayor que la MIC, y no pueden 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 la Japanese Society of Chemotherapy or CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI), pero, en este ejemplo, su medición se llevó a cabo mediante un método de microdilución en caldo 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 de 2007. Esto es, la prueba de sensibilidad de los agentes se llevó a cabo utilizando una placa de microtitulación o tubos de ensayo.

5 Las bacterias se cultivaron en medio líquido durante 4 a 6 horas, y posteriormente las absorbancias se midieron a A600. Las suspensiones bacterianas fueron diluidas con caldo de Mueller-Hinton (MHB) de acuerdo con la escala de McFarland # 0.5. Cada cepa fue añadida a fin de alcanzar aproximadamente 10^5 UFC/ml (concentración final). Cada péptido fue preparado a una concentración opcional, y las soluciones fueron diluidas en serie de la concentración. El polipéptido en cada etapa de concentración se agregó a una microplaca o tubos de ensayo, y la suspensión bacteriana se agregó a la misma. Se utilizaron como controles positivos cloranfenicol, anfotericina B, ciprofloxacino, meropenem (MEPM), ciprofloxacina (CPFX), tobramicina (TOB) y oxacilina (OX).
10 La placa se incubó a 37°C durante 20 horas, y la concentración más baja donde se inhibió el crecimiento bacteriano se consideró como la concentración inhibitoria mínima.

Los resultados (MIC) de diversas bacterias se muestran en las Tablas 8-1 a 8-3 a continuación.

Tabla 8-1

Nombre bacteriano	SR-07	SR-08	AP 00196	Cloranfenicol	Anfotericina B	Tobramicina	Meropenem	Oxacilina	Ciprofloxacina
<i>Escherichia coli</i>	64/128	32/64	8/16			0.25-1.0	0.008-0.06	-	N.T.
<i>Micrococcus luteus</i>	2	1	2	1	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
<i>Bacillus subtilis</i>	2	2	2	4	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
<i>Salmonella enteritidis</i>	8	4	16	4	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
<i>Salmonella typhimurium</i>	8	8/4	16	4	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	64	64	32	2	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16/32	32	16/32	N.T.	N.T.	0.25-1.0	0.25-1.0	-	N.T.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cepa clínica 1)	16/64	16	16/64	N.T.	N.T.	≥16	<4	-	<1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cepa clínica 6)	16/64	16/32	32/64	N.T.	N.T.	<4	8	-	<1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cepa clínica 8)	32/128	16/32	32/64	N.T.	N.T.	<4	<4	-	<1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cepa clínica 9)	32/128	16/64	32/128	N.T.	N.T.	<4	<4	-	<1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cepa clínica 12)	16/32	16/32	16/32	N.T.	N.T.	<4	<4	-	>4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8/16	8>	8/16	N.T.	N.T.	0.12-1.0	0.03-0.12	0.15-0.5	N.T.

(continuación)

Nombre bacteriano	SR-07	SR-08	AP 00196	Cloranfenicol	Anfotericina B	Tobramicina	Meropenem	Oxacilina	Ciprofloxacina
<i>Staphylococcus aureus</i>	16/32	16	16	N.T.	N.T.	0.12-1.0	0.03-0.12	0.15-0.5	N.T.
MSSA (cepa clínica 1)	32	16/32	16/32	N.T.	N.T.	≤4	<4	3/8	N.T.
MSSA (cepa clínica 2)	32	16	16	N.T.	N.T.	≤4	4/8	≤2	N.T.
MRSA (cepa clínica 1)	32	32	32	N.T.	N.T.	>16	<4	<4	N.T.
MRSA (cepa clínica 2)	32	32	32	N.T.	N.T.	>16	8/16	>8	N.T.

Unidad: Concentración (µg/µL)

* En esta tabla, en el caso donde las concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas mediante pruebas dobles coincidieron, se muestra un valor; y, en el caso donde las concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas mediante pruebas dobles no coincidieron, los valores obtenidos a partir de la primera prueba y la segunda prueba se muestran respectivamente

* N.T.: no probado.

Tabla 8-2

Nombre bacteriano	SR-07	SR-08	AP 00196	Cloranfenicol	Anfotericina B	Tobramicina	Meropenem	Oxacilina	Ciprofloxacina
Bacterias anaeróbicas	<i>Enterococcus faecalis</i>	64	32	64	4	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	16	4/8	16/32	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	<i>Bacteroides fragilis</i>	32	64/128	1	1	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	<i>Clostridium ramosum</i>	32	32/16	32/64	4	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Hongos	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	32/16	128	2/4	0.25	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	<i>Penicillium glabrum</i> (<i>Penicillium frequentans</i>)	16/8	8	16	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	<i>Fusarium solani</i>	8	4/8	4/8	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	<i>Alternaria alternata</i>	32	32	64	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	32	64	32	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	<i>Trichophyton rubrum</i>	64	128/64	64	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	<i>Candida krusei</i>	32	16	16	N.T.	2	N.T.	N.T.	N.T.
	Unidad: Concentración (µg/µL)								
* En esta tabla, en el caso donde las concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas mediante pruebas dobles coincidieron, se muestra un valor; y, en el caso donde las concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas mediante pruebas dobles no coincidieron, los valores obtenidos a partir de la primera prueba y la segunda prueba se muestran respectivamente									
* N.T.: no probado.									

Se demostró también a partir de estos resultados que los polipéptidos de SR-07 y SR-08 tenían amplio espectro antibacteriano

4. Prueba de formación de lumen

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

10 Utilizando un medio especial para la angiogénesis el cual fue unido al kit, cada polipéptido fue preparado de tal manera que la concentración del mismo fue respectivamente, 0.5, 2.5 y 10 µg/ml. A una placa de 24 pozos en los cuales se sembraron las células (las células fueron aquellas obtenidas por cocultivo de células endoteliales vasculares humanas y células de fibroblastos en una concentración óptima) que fue adjuntado con el kit, se añadió el medio especial para la angiogénesis que contiene cada polipéptido, y las células se cultivaron a 37°C bajo CO₂ al 5%. El medio fue reemplazado con un medio que contiene el mismo aditivo en el Día 4, Día 7 y Día 9 de cultivo. En el Día 11 desde el comienzo del cultivo, se realizó una tinción usando un kit para la tinción de lúmina (para la tinción de anticuerpos CD31) de acuerdo con el siguiente procedimiento.

15 Se retiraron los medios, y el lavado se realizó con solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (PBS(-)). Posteriormente, se agregó a la placa etanol al 70% enfriado con hielo, y las células se fijaron. Cada pozo se lavó con una solución bloqueadora (solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (PBS(-)) que contiene BSA al 1%). A cada pozo, se agregaron 0.5 µL del anticuerpo primario para la tinción de CD31 (anticuerpo CD31 antihumano de ratón) diluido 4000 veces con la solución bloqueadora, y luego 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 µL de la solución bloqueadora. Luego, se agregaron a cada pozo 0.5 ml de una solución de anticuerpo secundario (IgG anti-ratón de cabra/ fosfatasa alcalina conjugada) diluido 500 veces con la solución bloqueadora. La placa se incubó durante 60 minutos a 37°C, y posteriormente cada pozo se lavó 3 veces con 1 µL de agua destilada. Durante ese período, 25 tabletas 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 de sustrato. A cada pozo, se agregaron 0.5 µL de la solución de sustrato BCIP/NBT preparada, y la placa se incubó a 37°C hasta que la lúmina se tornó a púrpura profundo (típicamente durante 5-10 minutos). Después de la finalización de la incubación, cada pozo se lavó 3 veces con 1 µL de agua destilada. Después del lavado, la solución de lavado se eliminó por aspiración, y la placa se dejó 30 reposar y secar naturalmente. Después del secado, se tomaron fotografías de cada pozo bajo un microscopio.

35 Cada una de las imágenes obtenidas se cuantificó utilizando un software de cuantificación de la angiogénesis. Las áreas de lúmina formada observadas en cada campo visual se midieron sobre la base de la escala de un software de cuantificación de la angiogénesis disponible de KURABO INDUSTRIES LTD. (software de cuantificación de la angiogénesis Ver 1.0), y evaluadas sobre la base de la relación de las áreas de los grupos que contienen polipéptido en relación con el área del grupo de control negativo.

Los resultados se muestran en la figura 1. En esta figura, se muestran los valores relativos cuando se toma el control negativo como 100. A partir de estos resultados, se demostró que tanto la SR-07 y SR-08 mostraron individualmente una capacidad para formar lumen a las concentraciones probadas.

5. Prueba de producción de colágeno

40 Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) en una placa de 48 pozos. Como un medio, se utilizó el medio 106 que contenía FBS al 1%. Después de cultivar en una incubadora a 37°C bajo CO₂ al 5% durante aproximadamente 3 horas, se agregó el péptido o FGFb (Control Positivo), que había sido diluido con el medio para cada concentración, y el cultivo se continuó adicionalmente. El medio se reemplazó con un medio que contenía el mismo aditivo en el Día 3, y el cultivo se continuó durante otros 2 días.

45 La cantidad de colágeno producido se midió mediante el uso del Kit de Ensayo de Colágeno Semicuantitativo.

50 Después de 5 días de cultivo, el medio se eliminó por aspiración, y las células se lavaron con PBS(-)frío. Se agregó metanol/etanol frío al mismo y la placa se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente para fijar las células. Las células se lavaron dos veces con PBS(-) frío. Luego, se agregó una solución de tinción (Solución Colorante) a cada pozo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de tinción se eliminó y las células se lavaron 4-5 veces con agua desionizada. Se agregó una solución de extracción (Solución de Extracción del Colorante) a cada pozo para extraer el colorante, y se midieron las absorbancias del extracto a 540 nm y 605 nm.

Las cantidades de colágeno y proteínas de no colágeno se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Colágeno } (\mu\text{g/pozo}) = [\text{OD540} - (\text{OD605} \times 0.291)] / 37.8 \times 1000$$

$$\text{Proteínas de no colágeno } (\mu\text{g/pozo}) = \text{OD605} / 2.04 \times 1000$$

Los resultados se muestran en la figura. 2. Tal como se muestra en la figura 2, se demostró que tanto SR-07 y SR-08 tuvieron individualmente un efecto para inducir la producción de colágeno de los fibroblastos.

6. Efecto sobre el crecimiento celular endotelial de vena umbilical humana

- 5 A continuación, se estudió el efecto de estos polipéptidos sobre el crecimiento de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Se examinó una actividad de crecimiento de las células de los polipéptidos utilizando el Kit de Recuento Celular (WST-1) disponible en Dojindo Laboratories. Como control negativo (control), se utilizó el grupo libre de polipéptido. Las células (células endoteliales de vena umbilical humanas: HUVEC) se sembraron en una placa de 96 pozos (0.5×10^4 células/pozo/100 μL , suero al 1%). Alrededor de 3 horas después de la siembra de las células, los polipéptidos (1, 3, 10, 30 o 100 $\mu\text{g/ml}$) y FGF (100 $\mu\text{g/ml}$) como control positivo se agregaron individualmente a la misma en una cantidad de 100 μL . Al grupo no estimulado, se agregó sólo un medio en una cantidad de 100 μL . La placa se dejó en reposo en una incubadora de CO_2 durante aproximadamente 48 horas. Posteriormente, se agregó el reactivo WST-1 a cada pozo en una cantidad de 20 μL , y luego la placa se dejó en reposo en una incubadora de CO_2 durante aproximadamente 2 horas. Las absorbancias a longitudes de onda de 450 nm y 620 nm se midieron utilizando Wallac 1420 ARVOSx (Programa: WST-1). Se calculó un valor de O.D.450 - O.D.620 para cada medición. Los valores obtenidos restando el promedio de los valores de DO 450 - DO620 de pozos en blanco los cuales no contenían células a partir de valores de OD450 - DO620 de los pozos medidos fueron considerados como OD450 Neto. La actividad de crecimiento celular se evaluó sobre la base de la relación de DO450 Neto de grupos que contenían polipéptido en relación con DO450 Neto del grupo no estimulado.
- 10
- 15
- 20 Los resultados se muestran en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 3, se demostró que SR-07 y SR-08 tenían una capacidad de crecer las HUVEC a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ y a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ a 30 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, y tendían a exhibir toxicidad a una concentración más alta que aquellos.

7. Efecto sobre el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos normales

- 25 Luego, el efecto sobre el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) también se estudió mediante el mismo método descrito anteriormente.
- Los resultados se muestran en la figura 4. Tal como se muestra en la figura 4, se comprobó que SR-07 y SR-08 tenían individualmente una capacidad para crecer los NHDF a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ a 30 $\mu\text{g/ml}$, y tendieron a presentar toxicidad en una concentración mayor que eso.

8. Estudio de estabilidad en suero

- 30 Se evaluó la estabilidad de los polipéptidos en suero. En el suero humano (adquirido de KAC Co., Ltd.), o en suero de rata obtenido recolectando sangre de una rata, luego, dejando la sangre recolectada en reposo a temperatura ambiente, seguido por centrifugación, cada uno de los péptidos se disolvió a fin de alcanzar una concentración final de 500 $\mu\text{g/ml}$, y las soluciones obtenidas se dejaron reposar a 37°C. Después de dejar reposar durante 3 minutos o 10 minutos, estas soluciones se sometieron a análisis de cromatograma de HPLC para detectar picos de los productos de descomposición, y calcular la relación de la concentración de los péptidos que se mantuvieron en las soluciones respecto a la concentración de partida. Además, también se calcularon las vidas medias de los péptidos en suero.
- 35

Las condiciones de análisis del cromatograma de HPLC fueron las siguientes.

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

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

Temperatura de la columna: 50°C

Fase Móvil A: solución de ácido trifluoroacético al 0.025%

Fase Móvil B: acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.025%

Rata de flujo: 1.0 µL/min

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

Volumen de inyección: 100 µL

Condiciones de gradiente:

5

Table 9

Tiempo (min)	Fase Móvil A (%)	Fase Móvil B (%)
0	100	0
1	100	0
15	55	45
20	55	45
20.1	100	0
25	100	0

Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Estabilidad en suero de rata				
	0	3	10	Vida media (min)
SR-07	100	51	16.5	4
SR-08	100	87	86.9	60
Estabilidad en suero humano				
	0	3	10	Vida media (min)
SR-07	100	98	64.3	15
SR-08	100	95	65.8	16

10 Como se muestra en la Tabla 10, en suero de rata, SR-08 mostró mucha mayor estabilidad que SR-07; pero, en suero humano, SR-07 y SR-08 mostraron aproximadamente el mismo grado de estabilidad.

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

15 Luego, se estudió la capacidad para formar el tejido de granulación de estos polipéptidos *in vivo*. Cada uno de los péptidos que fueron la sustancia de prueba y cuya concentración fue respectivamente 25, 250 y 2500 µg/µL, la formulación de bFGF cuya concentración fue respectivamente 2.5, 25 y 250 µg/µL (controles positivos), 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. Los

20 discos de papel preparados fueron embebidos por vía subcutánea en la parte posterior 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.

Los resultados se muestran en la figura 5 (SR-07) y la figura 6 (SR-08). Tal como se muestra en las figuras 5 y 6, se demostró que tanto SR-07 y SR-08 promovieron individualmente la formación de tejido de granulación *in vivo*.

10. Efecto para curar las heridas de corte

5 A continuación, utilizando el modelo de la herida de corte de rata, se evaluó el efecto de los polipéptidos, SR-07 y SR-08, para curar heridas de corte *in vivo*. Como se describe en Tetsuaki Yamaura et al. (Oyo Yakuri (Pharmacometrics) 22, 565-579 (1981)), el modelo de la herida de corte de rata se produjo y se midió la tensión del cierre de la herida.

10 Esto es, se hizo una herida de corte de 30 a 36 mm 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 suturó 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 μ L de cada uno de los péptidos que fueron la sustancia de prueba y preparados respectivamente con la concentración de 10, 100 y 1000 μ g/ μ L (las cantidades adicionadas fueron 500 ng y 5 y 50 μ g, respectivamente). Las adiciones de 50 μ L 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 medición 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.

15 Los resultados se muestran en la figura 7 (SR-07) y la figura 8 (SR-08). Tal como se muestra en las figuras 7 y 8, se observó que la tensión de cierre de la herida tiende a aumentar, lo que sugiere que la regeneración del tejido conectivo por el crecimiento de fibroblastos y la producción de colágeno y la curación de una herida de corte pueden ser promovidos.

11. Efecto curativo en las heridas infectadas

25 Mientras que un efecto para promover la curación de una herida de corte fue probado en la sección anterior, además de eso, se evaluó un efecto curativo en una herida infectada con el *Staphylococcus aureus*. Refiriéndose a 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 ciclofosfamida en la vena de la cola (100 μ g/kg). En el siguiente día, se recontó 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 completos de forma cuadrada de 1.73 x 1.73 cm (aproximadamente 3 cm²) se crearon en la parte posterior de las ratas, y 25 μ L de *Staphylococcus aureus* (aproximadamente 10⁵ CFU/25 μ L) y se adicionó gota a gota péptido SR-07 o SR-08 como una sustancia de prueba (2 μ g/ μ L sobre los sitios de defecto (la cantidad administrada fue 50 μ g). Por otra parte, se adicionaron gota a gota 25 μ L de la formulación de bFGF (3 μ g/25 μ L) en el grupo de la formulación bFGF (un control positivo), y se adicionaron gota a gota 25 μ L de solución salina fisiológica 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). Posteriormente, se adicionaron gota a gota *Staphylococcus aureus* y la sustancia de prueba una vez al día, durante 4 días consecutivos (Días 0, 1, 2 y 3). Desde el día cuando se crearon los defectos de espesor completo al Día 10, se midió el área donde las heridas aún no habían sanado para calcular la relación de esta con relación al área donde se crearon las heridas, y los resultados se muestran en los gráficos (figura 9 (SR-07) y figura 10 (SR-08)).

35 Como se muestra en las Figuras 9 y 10, se comprobó que tanto la SR-07 y SR-08 mostraron individualmente un efecto curativo más alto en las heridas infectadas que la formulación de bFGF (FIBLAST aerosol), y estas heridas infectadas fueron curadas a una velocidad similar a la del grupo en el cual la solución salina fisiológica se había administrado a las heridas que no habían sido asociados con la infección.

45 11. Efecto para curar úlceras de piel diabética en el modelo de colgajo de diabetes

50 Para el propósito de producir un modelo de diabetes, se utilizaron ratas macho de 7 semanas de edad sin pelo (HWY/SLC), y, en el día antes se crearon los colgajos de defectos de espesor completo, se midió el nivel de azúcar en sangre y se administró estreptozotocina una vez en vena de la cola (65 μ g/kg). El modelo de colgajo defecto de espesor completo fue producido mediante la medición del nivel de azúcar en la sangre de las ratas en el día después de la administración de estreptozotocina y se decidió solamente por los individuos cuya sangre azúcar nivel no era inferior a 300 μ g/dl como el modelo de la diabetes. Los colgajos de defecto de espesor completo fueron creados para crear primero en la parte posterior de cada rata un colgajo de pedículo 2 x 2 cm (cuadrado) cuya parte basal estaba en su lado de la cola, y luego crear un sitio de defecto de espesor completo (incluyendo defecto de capa dérmica) de 1.4 x 1.4 cm (cuadrado: aproximadamente 2 cm²) en la parte central del colgajo del pedículo creado. Luego, los sitios del colgajo se suturaron inmediatamente para obtener el modelo de colgajo de defectos de espesor total. El modelo es un modelo de una herida incurable diabética o úlceras en la piel, puesto que el modelo

también carece de capa dérmica. Después de la administración de la sustancia de prueba deseada en el sitio de la herida creado, el sitio de la herida se cubrió con una cubierta (PERME-ROLL, Nitto Medical Corporation) (Día 0). Posteriormente, en cada día de medición, la sustancia de prueba se administró una vez al día; el cambio del área de la herida se calculó mediante los valores medidos de un calibrador digital y las imágenes digitales; y el área donde las heridas todavía no se habían curado se midió para calcular la relación de la misma con relación al área donde se crearon las heridas (Día 0). Los resultados se muestran en la figura. 11.

Como se muestra en la figura. 11, se demostró que, desde inmediatamente después de la creación de la herida, tanto polipéptidos individualidad disminuyeron el área de la herida restante, en comparación con el grupo de control en el que la solución salina fisiológica se había administrado (Solución Salina), y que los polipéptidos de la presente invención promueven la curación de una herida incurable asociada con la diabetes.

Los números de días hasta la curación completa en los casos de SR-07 y SR-08 se muestra en la figura 12 (SR-07) y la figura 13 (SR-08), respectivamente. Los números de días hasta la curación completa en los grupos en los que se utilizaron individualmente SR-07 y SR-08 en una cantidad de 0.2 µg/µL fueron significativamente más pequeños que el grupo de control del solvente. La misma tendencia como se observó en la evaluación de la tasa de curación de la herida también se observó en el número de días hasta la curación completa. A partir de estos resultados, se demostró que SR-07 y SR-08, que son los polipéptidos de la presente invención, muestran individualmente un efecto terapéutico sobre las úlceras de la piel y también sobre las úlceras de la piel diabéticas.

12. Efecto para curar úlceras de hinchazones

Se produjo un modelo de hinchazón utilizando ratas sin pelo macho de 7 semanas de edad (HWY/slc), y se examinó el efecto curativo de los polipéptidos de la presente invención. El modelo de úlcera de hinchazón se produjo poniendo en contacto una plancha caliente al rojo (a 100°C, φ12 mm) a la parte posterior de cada rata durante 5 segundos bajo anestesia con éter para inducir una quemadura. El modelo tenía una quemadura severa en la cual el tejido dérmico y el tejido muscular, llevaron también a la necrosis, y se confirmó que fue causada una úlcera de hinchazón de la piel. En el día después de inducir la hinchazón, la piel necrótica se eliminó quirúrgicamente para obtener un modelo de quemadura. Después de producir el modelo de hinchazón, se administró la sustancia de prueba sobre el sitio de la herida, y se utilizó una cubierta para cubrir esto (Día 0). Sólo una cubierta fue utilizada en el Control. Posteriormente, la sustancia de ensayo se administró una vez al día en cada día de medición. Y, en el Día 6 y el Día 8, se midió el cambio de la zona de la herida mediante el cálculo de valores medidos de un calibrador digital e imágenes digitales, y el área donde las hinchazones todavía no se habían curado se midió para calcular la relación de la misma con respecto a la zona en la que se crearon las hinchazones (Día 0). La concentración de las sustancias de prueba fueron individualmente 0.2 µg/ml (20 µg/herida).

Los resultados se muestran en la figura 14 (SR-07) y la figura 15 (SR-08). En los dos gráficos, las barras negras muestran Controles y las barras blancas muestran los péptidos. Como se muestra en las figuras 14 y 15, se comprobó que SR-07 y SR-08, que son los polipéptidos de la presente invención, mostraron individualmente un efecto terapéutico también en el modelo de úlceras de quemadura.

13. Efecto curativo sobre decubituses

Con el fin de confirmar el efecto curativo en un decúbito, una de las úlceras de la piel, un modelo de decúbito se produjo utilizando ratas macho sin pelo de 7 semanas de edad (HWY/SLC), y se examinó el efecto curativo de los polipéptidos de la presente invención. Un par de magnetos (φ10 x 5 mm; disponibles de AZBIO KENIS; magnetos de tierras raras; Tipo: KD-2; Código: 3-118-119; y, Densidad de Flujo Magnético: 350mt) se pusieron en contacto con la piel de la espalda de cada rata durante 8 horas para inducir un decúbito. En el día después de la inducción del decúbito, la piel necrótica se eliminó quirúrgicamente para obtener un modelo de decúbito. Después de producir el modelo de decúbito, se administró la sustancia de prueba en el sitio de la herida, y una cubierta se utilizó para cubrir esto (Día 0). Sólo una cubierta fue utilizada en el Control. Posteriormente, en cada día de medición, la sustancia de prueba se administró una vez al día, y el cambio del área de la herida se midió mediante el cálculo de valores medidos de un calibrador digital e imágenes digitales. La concentración de las sustancias de prueba fueron individualmente 0.2 µg/uL (4 µg/herida). El área donde las hinchazones todavía no se habían curado se midió para calcular la relación de la misma con respecto al área en la que se crearon las hinchazones (Día 0).

Los resultados se muestran en la figura 16 (SR-07) y la figura 17 (SR-08). En los dos gráficos, las barras negras muestran Controles y las barras blancas muestran los péptidos. Tal como se muestra en las figura 16 y 17, se comprobó que SR-07 y SR-08, que son los polipéptidos de la presente invención, muestran individualmente un efecto terapéutico también en decubituses.

Adicionalmente, con respecto a estos péptidos, los resultados obtenidos mediante la medición de la proporción del área de la herida restante en el Día 12 se muestran en las Tablas 11 y 12 siguientes.

Tabla 11

SR-07		
		Día 12
Valor promedio	Grupo Control de	4.516729
	SR-07	0.149564
SD	Grupo Control de	3.224151
	SR-07	0.334435
Valor p	SR-07	0.01826

Tabla 12

SR-08		
		Día 12
Valor promedio	Grupo Control de	4.516729
	SR-08	0.790159
SD	Grupo Control de	3.224151
	SR-08	0.847383
Valor p	SR-08	0.039897

5 Como se muestra en las Tablas 11 y 12, en el día 12, se encuentra que la curación fue promovido de manera significativa en los grupos en los cuales, habían sido administrados SR-07 y SR-08, los cuales son los polipéptidos de la presente invención.

14. Evaluación de tejido de la piel en la curación de heridas de corte

10 Un modelo de herida de corte fue producida utilizando ratas SD macho de 7 semanas de edad (CrI:CD), y se evaluó el cambio en el tejido de la piel causada por la administración de los polipéptidos de la presente invención. Una herida de corte de 30 a 36 mm se hizo en la parte posterior de las ratas utilizando una maquinilla de afeitar de seguridad, y se suturó en 3 puntos igualmente espaciados (Día 0). Sobre el sitio de la sutura, se agregaron gota a gota 50 µl de cada una de las sustancias de prueba las cuales fueron respectivamente ajustadas, a la concentración de 200 µg/ml (la cantidad añadida fue de 10 µg). Cada sustancia de prueba se administró gota a gota una vez al día hasta el día en que se retiraron las suturas. En el Día 3 después de la sutura, se retiraron las suturas; y, en el Día 6, se recogió el tejido de la piel en el sitio de la herida de corte para evaluar la piel mediante tinción HE.

15 Como resultado de la observación, se observó en el grupo de solución salina engrosamiento en in el estrato espinoso de la epidermis (indicada por la flecha en la figura derecha superior). Además, un número de neutrófilos y fibroblastos fueron observado alrededor del sitio de la herida de corte. En los casos de SR-07 y SR-08, el engrosamiento en el estrato espinoso de la epidermis fue menor que el grupo de solución salina, y se observó un fenómeno, que los fibroblastos fueron reemplazados al colágeno más pronto que en el grupo de solución salina. En los casos de SR-07 y SR-08, no sólo fue observado que se incrementó la granulación y el colágeno en comparación con solución salina, sino también se demostró que la curación de la herida se promovió, mientras que suprime el engrosamiento.

25

Listado de secuencias

<110> AnGes MG Inc.

<120> Polipéptidos y agentes de curación de heridas que tienen actividad angiogénica y actividad antimicrobiana

<130> PF000419-PCT

5 <160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SR-1

<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

15 <210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> SR-2

<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

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 506 168 T3

<223> SR-3

<400> 3

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

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SR-4

10 <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

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SR-5

<400> 5

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

20 <210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SR-6

<400> 6

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

Tyr Lys

5 <210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <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

<210> 8

<211> 19

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SR-08, 17Lys es D-aminoácido.

<400> 8

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

20 **Lys Arg Lys**

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> PAMP

<400> 9

Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys Trp
1 5 10 15
Ala Leu Ser Arg
20

<210> 10

<211> 20

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> SR-07

<400> 10

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

10 Leu Lys Arg Lys
20

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

15 <220>

<223> AP00196

<400> 11

Lys Asn Leu Arg Arg Ile Ile Arg Lys Ile Ile His Ile Ile Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Gly

Referencias de la técnica anterior

20 Literaturas de Patentes

Literatura de Patente 1 WO 2005/090564 A1

Literatura de Patente 2 WO 2008/096816 A1

Literaturas no Patente

25 Literatura no Patente 1 Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, GloeT, 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.

5 Literatura no Patente 3 Martinez A, Zudaire E, Portal-Nunez S, Guedez L, Libutti SK, Stetler-Stevenson WG, Cuttitta F. "Proadrenomedullin NH2-terminal 20 peptide is a potent angiogenic factor, and its inhibition results in reduction of tumor growth." Cancer Res. 2004 Sep 15;64(18):6489-94.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 8 y 10; en donde el ácido amino 17º en la SEQ ID NO: 8 es D-Lys y el aminoácido 18º en la SEC ID NO: 10 es D-Lys.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 8.
- 5 3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO:10.
4. El polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, cuyo terminal carboxilo está amidado.
5. Un agente que induce la angiogénesis que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como un ingrediente efectivo.
- 10 6. Un agente antibacteriano que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como un ingrediente efectivo.
7. Un polipéptido para uso en la inducción de la angiogénesis, el cual es el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 8. Un agente para uso en la prevención, mejora o tratamiento de una enfermedad(s) o trastorno(s) seleccionado del grupo que consiste hinchazones, heridas, erosiones, úlceras de la piel y heridas incurables, dicho agente comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de reivindicaciones 1 a 4 como un ingrediente efectivo.
9. El agente para uso en la prevención, mejora o tratamiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad(s) o trastorno(s) seleccionado del grupo que consiste de hinchazones, heridas, erosiones, úlceras de la piel y heridas incurables está (están) asociada(s) con infección(es) bacteriana(s) o fúngica(s).
- 20 10. El agente para uso en la prevención, mejora o tratamiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad(s) o trastorno(s) es (son) seleccionado(s) del grupo que consiste de quemaduras, heridas, erosiones, úlceras de la piel y heridas incurables.
11. Un polipéptido para uso en la prevención, mejora o tratamiento de una enfermedad(s) o trastorno(s) seleccionado del grupo que consiste de hinchazones, heridas, erosiones, úlceras de la piel y heridas incurables, el cual es el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 12. Un polipéptido para su uso como un agente antibacteriano, el cual es el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

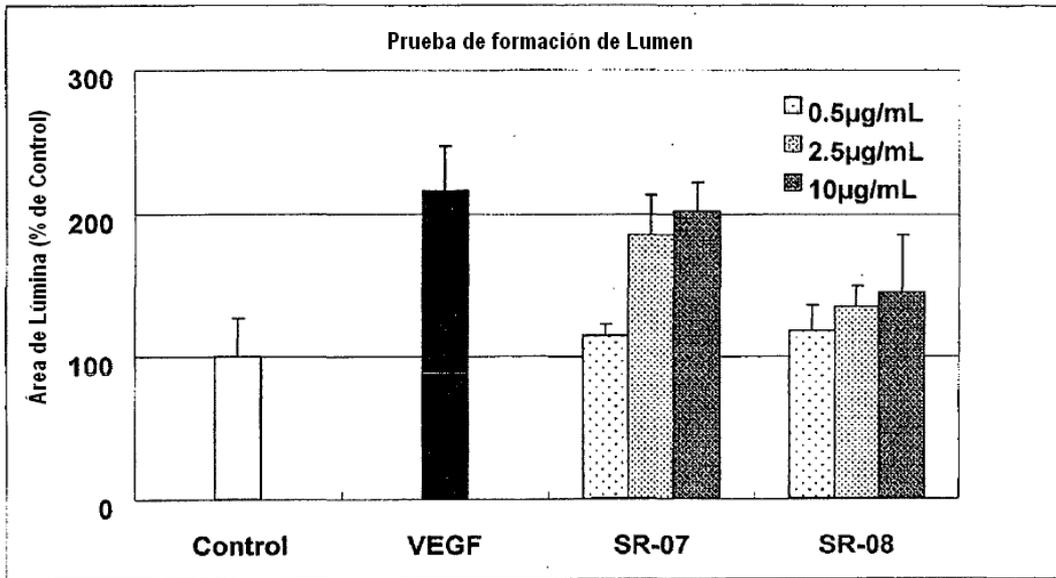


Fig.1

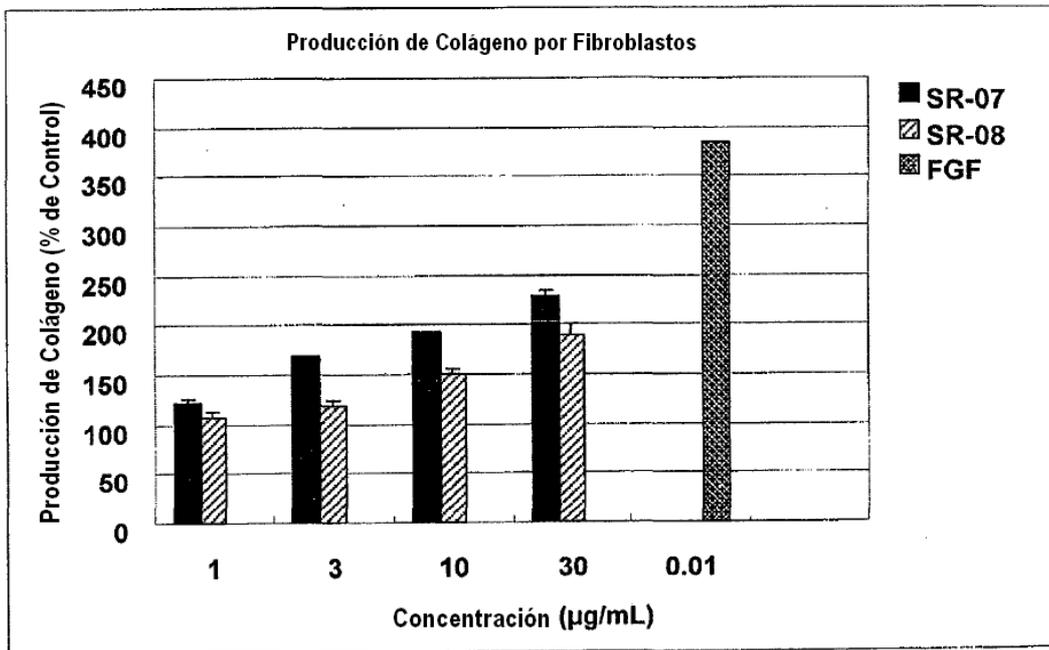


Fig.2

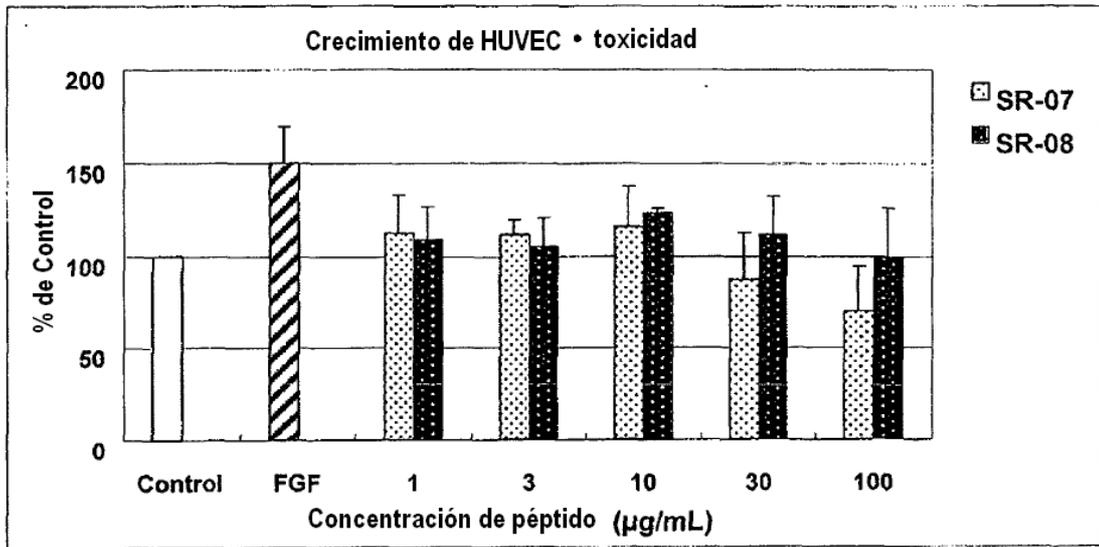


Fig.3

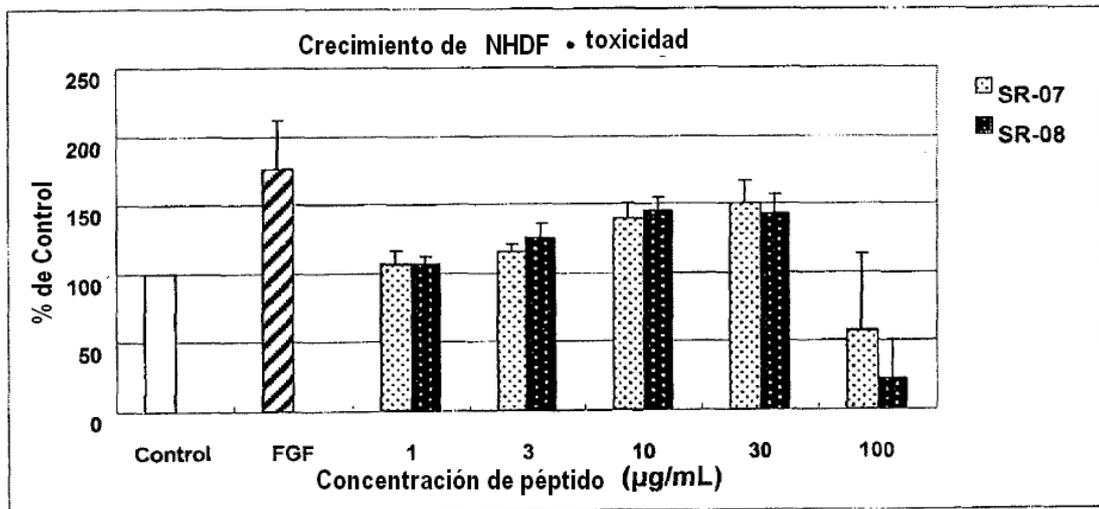


Fig.4

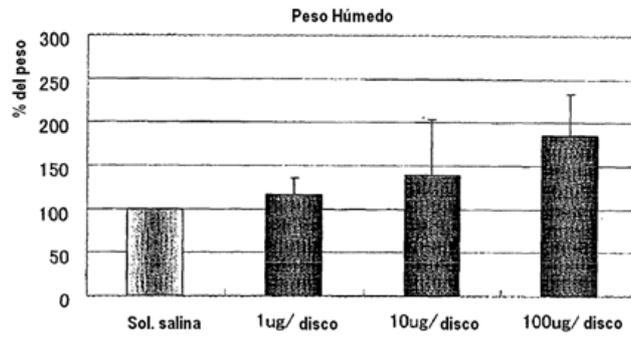


Fig.5

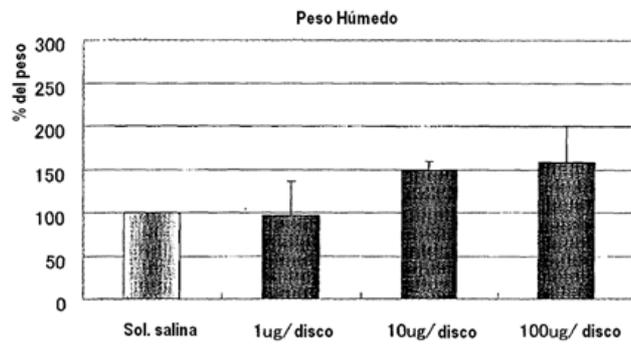


Fig.6

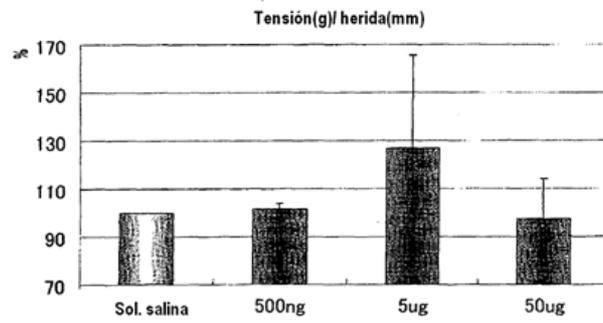


Fig.7

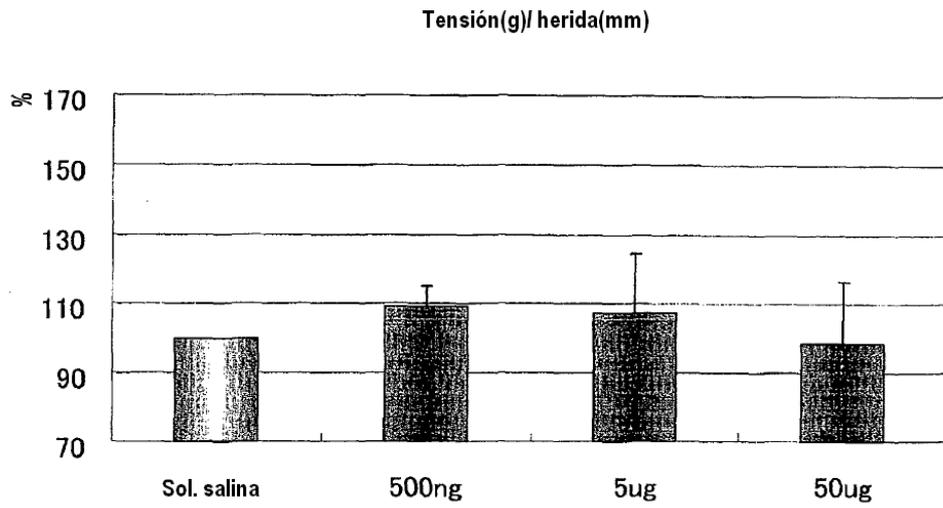


Fig.8

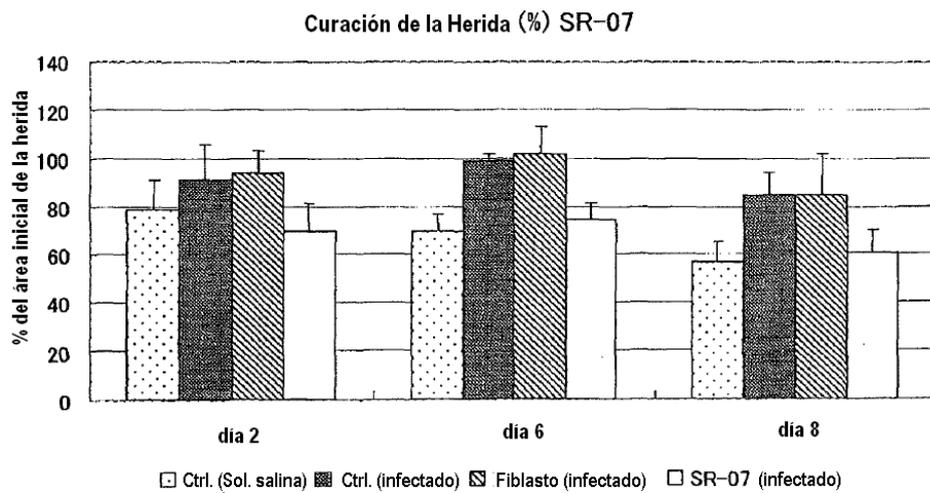


Fig.9

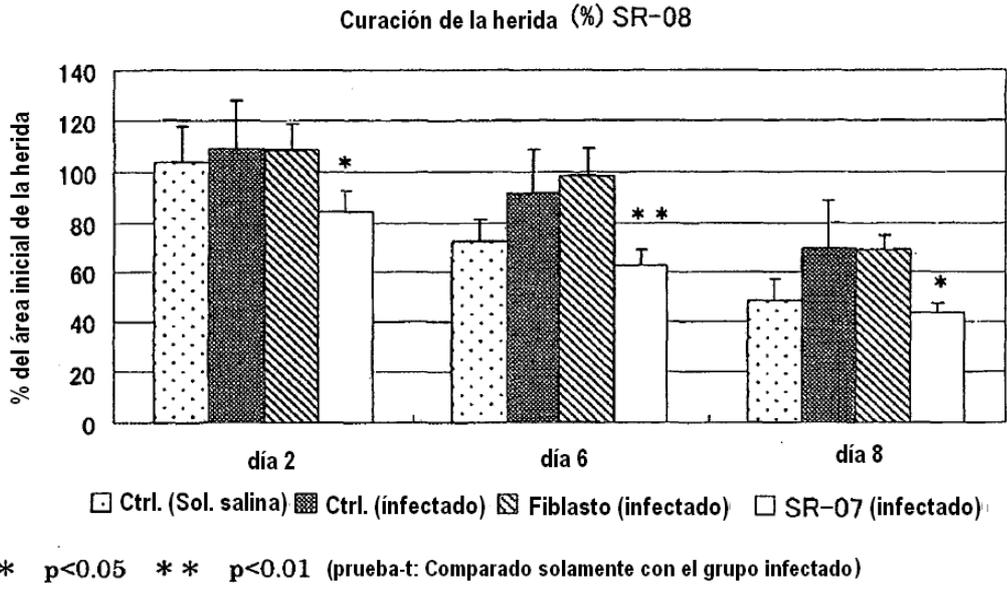


Fig.10

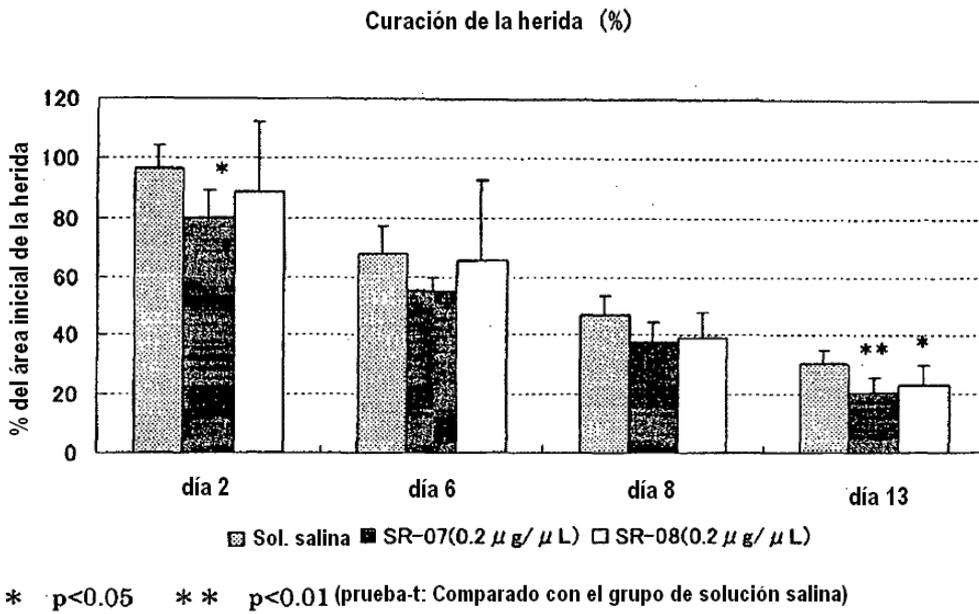
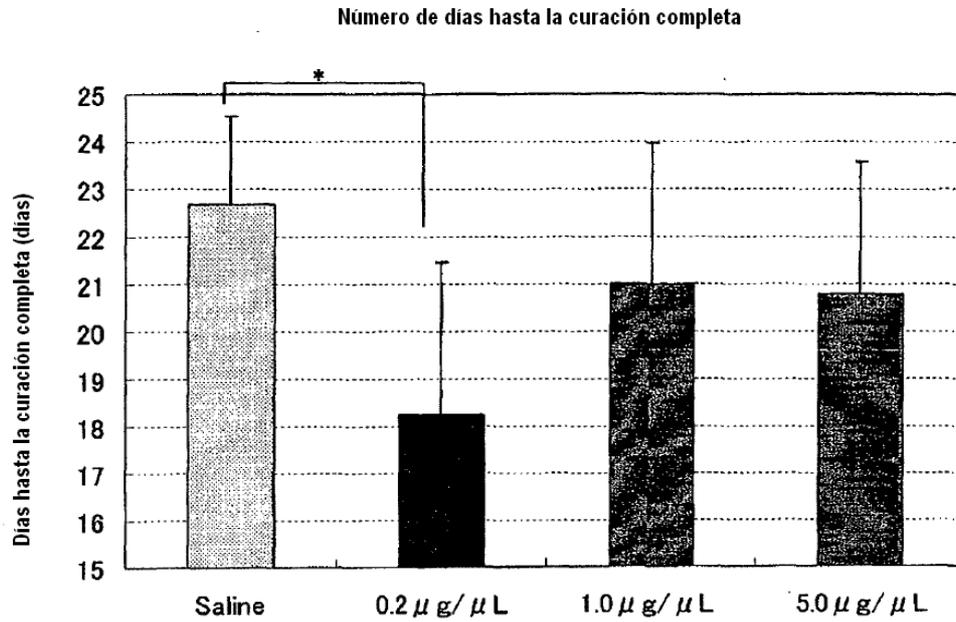
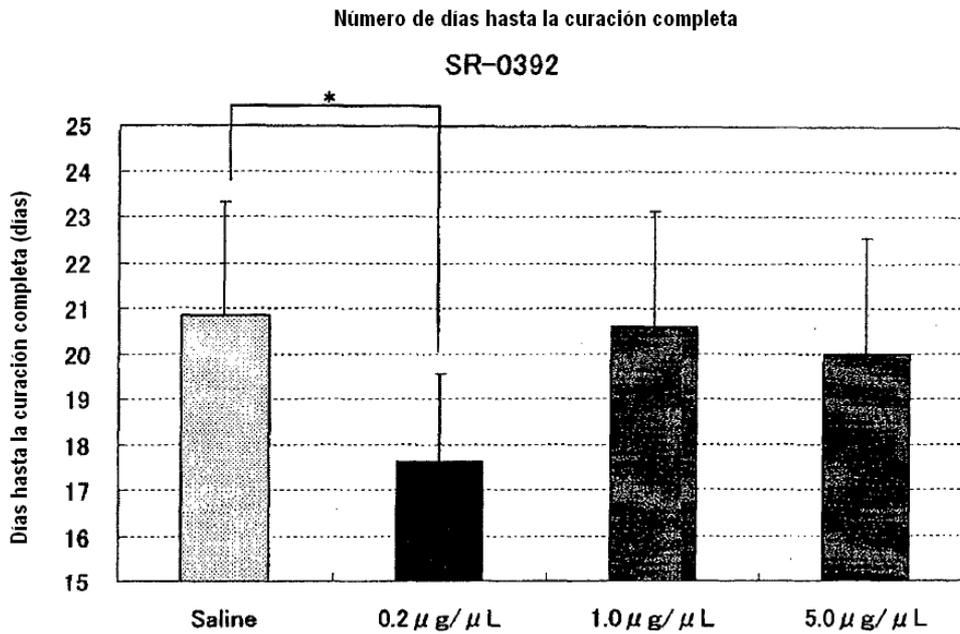


Fig.11



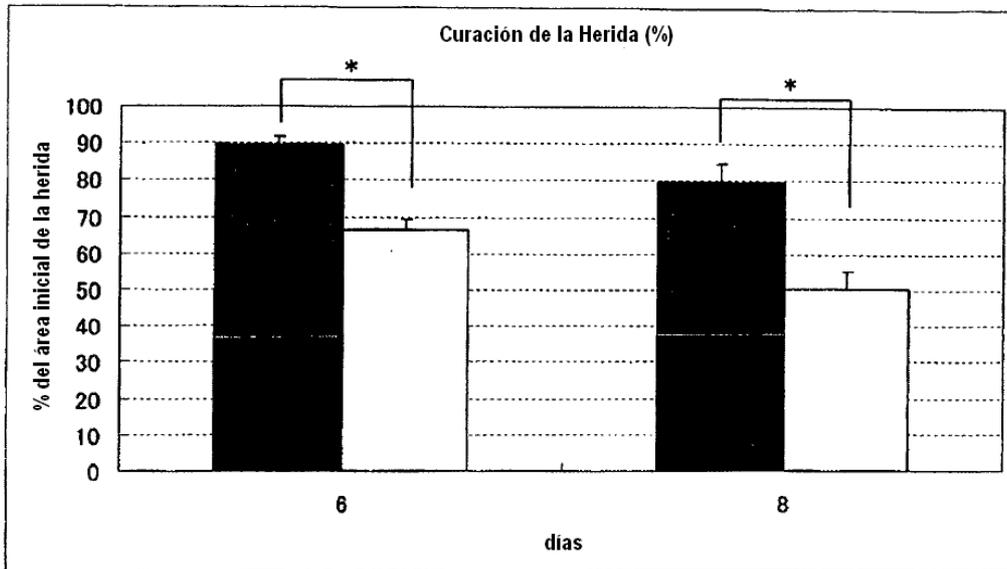
* $p < 0.05$ (prueba-t: comparada con el grupo de solución salina)

Fig.12



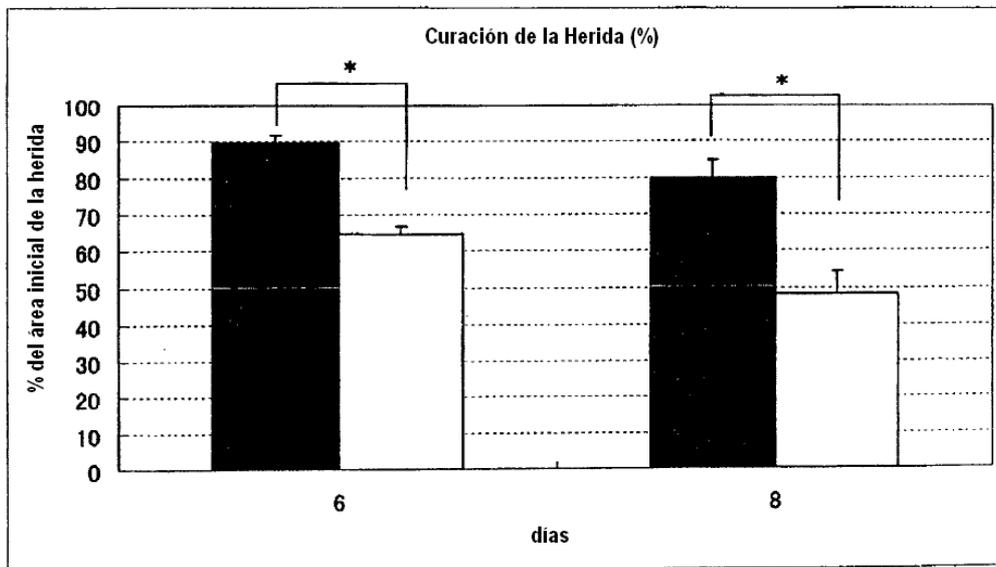
* $p < 0.05$ (prueba-t: comparada con el grupo de solución salina)

Fig.13



* $p < 0.01$ (prueba-t)

Fig.14



* $p < 0.01$ (prueba-t)

Fig.15

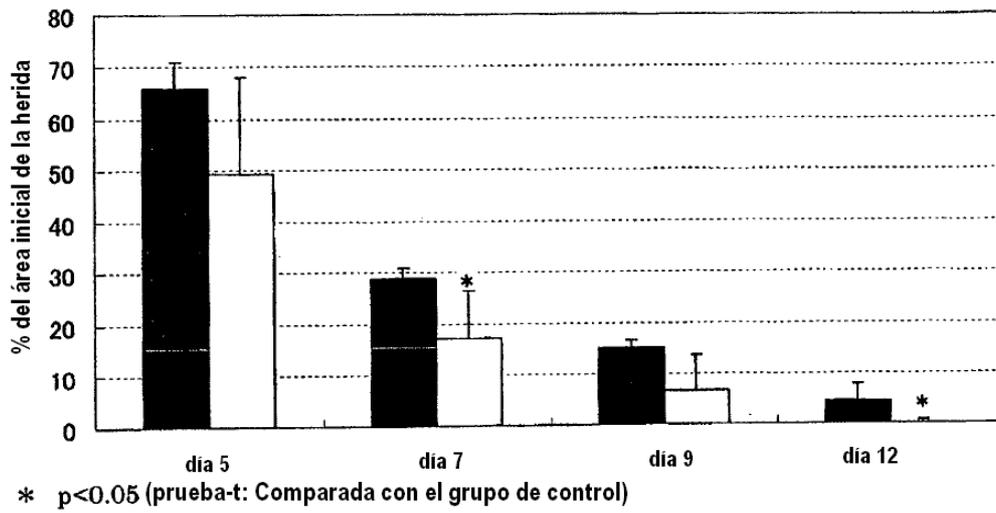


Fig.16

Curación de la Herida (%)

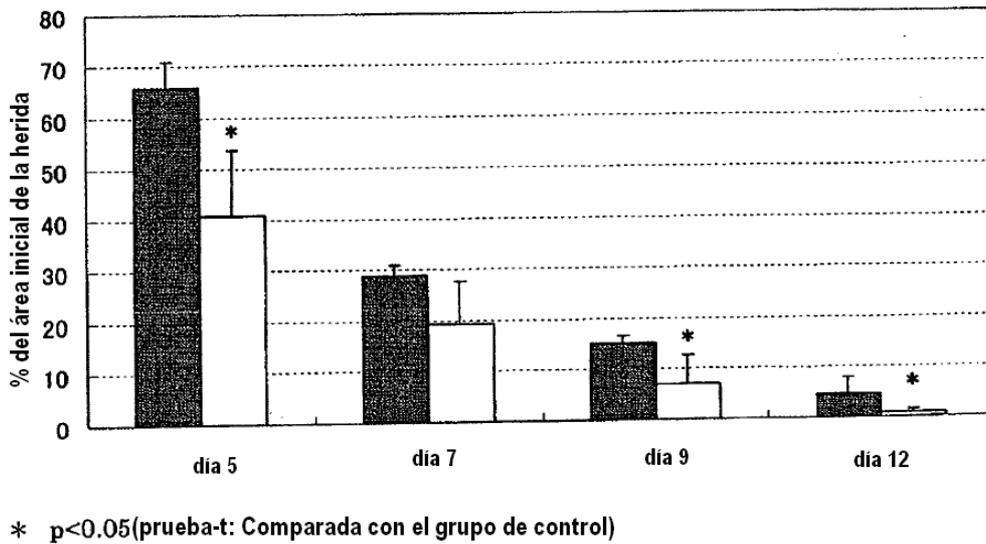


Fig.17