

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 219**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2007 E 11175263 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2409988**

54 Título: **Fragmentos de péptido para inducir la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular**

30 Prioridad:

13.06.2006 US 813284 P

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

09.09.2015

73 Titular/es:

**HELIX BIOMEDIX INC. (100.0%)
22121 17th Avenue SE 112
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**HARRIS, SCOTT;
FALLA, TIMOTHY y
ZHANG, LIJUAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 545 219 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

Fragmentos de péptido para inducir la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad con la solicitud provisional de patente de Estados Unidos con número de serie 60/813.284, presentada el 13 de junio de 2006.

Campo de la divulgación

- 10 La presente divulgación se refiere a tetrapéptidos con el motivo de aminoácidos GxxG o PxxP, en la que G (glicina) y P (prolina) se mantienen y x es un aminoácido variable. La presente divulgación también se refiere a tetrapéptidos activos con cambio de marco que son secuencias de tetrapéptidos que cambian un marco del tetrapéptido GxxG o PxxP en una proteína ECM. En particular, la presente divulgación se refiere a GxxG, PxxP, o péptidos de cambio de marco activos que estimulan la producción de proteínas de la matriz extracelular y potencian la cicatrización de heridas de la monocapa de células epiteliales de la piel humana arañada o herida. Las composiciones de péptido se pueden usar en formulaciones para reparar la piel dañada o mantener la piel sana.

Antecedentes

- 20 El envejecimiento de la piel suele ir acompañada de la formación de arrugas y una alteración de la cicatrización de heridas. Una herida se define como una rotura en la integridad de la piel. La cicatrización de heridas normal implica una serie compleja y dinámica pero extraordinariamente bien orquestada de eventos que conducen a la reparación de los tejidos dañados. El mayor componente de la piel normal es la matriz extracelular (ECM), una matriz de tipo gel producida por las células a las que rodea. La ECM está compuesta por dos moléculas principales que incluyen proteínas estructurales y proteoglicanos. Se sabe que los cambios en la composición y estado de reticulación de la ECM están asociados con el envejecimiento y una gama de trastornos cutáneos adquiridos y heredados. Está bien documentado que la ECM no solamente proporciona soporte estructural, sino también afecta el comportamiento celular tal como la diferenciación y la proliferación. Asimismo, cada vez más investigación sugiere que los componentes de la matriz pueden ser una fuente de señales celulares para facilitar la proliferación y la migración de las células epiteliales y, de esta forma, potenciar la cicatrización de heridas.

- La clase más importante de moléculas ECM fibrosas es la familia del colágeno, que incluye al menos 16 tipos diferentes de colágeno. El colágeno de la matriz dérmica se compone principalmente de colágenos de tipo I (80-85 %) y de tipo III (8-11 %), ambos de los cuales son colágenos fibrilares, o en forma de varilla. La resistencia a la tracción de la piel se debe principalmente a estas moléculas de colágeno fibrilares, que se autoensamblan en microfibrillas en una disposición cabeza-a-cola y enfrentado lateral apilado. La moléculas de colágeno quedan reticuladas con las moléculas de colágeno adyacentes, creando una resistencia y estabilidad adicional en las fibras de colágeno. El daño a la red de colágeno (por ejemplo, mediante enzimas o por destrucción física), o su destrucción completa hace que la cicatrización se produzca mediante reparación.

- Se han notificado varios péptidos bioactivos que estimulan la producción de proteínas de la ECM tanto en la bibliografía científica como en las patentes concedidas. Desde el punto de vista histórico, los péptidos se han aislado de fuentes naturales y recientemente han sido objeto de estudios de relación entre la estructura y la función. Los péptidos naturales también han servido como puntos de partida para el diseño de análogos de péptido sintéticos.

- Las secuencias específicas de las proteínas ECM pueden estimular elementos útiles en la piel, tal como el colágeno de tipo I, colágeno de tipo III, y fibronectina (Katayama et al, J. BIOL. CHEM. 288:9941-9944 (1983)). Katayama et al. identificaron el pentapéptido, KTTKS (SEC ID N°: 17), dentro del propéptido del extremo carboxi (restos 197-241) de colágeno de tipo I. El propéptido se escinde durante la producción de la proteína de colágeno madura. El propéptido escindido puede participar en la regulación de la producción de colágeno mediante un mecanismo de retroalimentación de la biosíntesis, en el que el segmento KTTKS tiene un papel activo. Maquart et al. (J SOC BIOL. 193:423-28 (1999)) notificaron que los péptidos GHK y CNYYSNS también estimulan la síntesis de ECM. Estas secuencias se pueden liberar durante la renovación la ECM, señalando de esta forma la necesidad de reparar la ECM. Las secuencias del péptido corto liberadas por cualquiera de los mecanismos se denominan frecuentemente «matriquinas» (Maquart et al., J. SOC. BIOL. 193:423-28 (1999)).

Aunque existen numerosos péptidos naturales o sintéticos, existe la necesidad de mejorar péptidos biológicamente activos y métodos para su uso.

Sumario

- Se describen tetrapéptidos que se caracterizan por el motivo de la secuencia de aminoácidos GxxG o PxxP, en la que los restos G (glicina) y P (prolina) se mantienen y x es un aminoácido variable. Los tetrapéptidos se han derivado de secuencias que aparecen varias veces a lo largo de la secuencia primaria de la proteína de la ECM, el colágeno de tipo IV. Las secuencias descritas inducen la producción de todas las formas del colágeno más que las secuencias peptídicas anteriormente conocidas, incluyendo KTTKS, vendido con el nombre comercial MATRIXYL™

por SEDERMA SAS (Francia). Además, una composición que comprende una combinación de varias secuencias con repeticiones múltiples suscita una respuesta productora de colágeno todavía mayor. Se pueden esperar beneficios adicionales de las combinaciones de péptidos que presentan varias proteínas de la ECM.

5 La producción de una combinación específica de tetrapéptidos para la reconstrucción de la ECM puede ser prohibitivo debido a su coste comercial. Se describe un medio relativamente sencillo y barato de producir una combinación diversa de tetrapéptidos biológicamente activos. Mediante la producción de una biblioteca combinatoria de tetrapéptidos con el motivo GxxG o PxxP, se puede generar varios tetrapéptidos biológicamente activos en el mismo ciclo de fabricación (*por ejemplo*, GEPG, GPEG, GPPG y GEEG). La combinación de tetrapéptidos puede
10 inducir más formación de proteínas de la ECM que péptidos simples. Las composiciones que comprenden los tetrapéptidos descritos, solos o en combinación, son útiles en los mercados de cuidado de la piel que incluyen, pero sin limitación, los que se refieren a la formación de arrugas, tonificación, firmeza, o ptosis. La estimulación del colágeno mediante los tetrapéptidos descritos pueden mejorar significativamente la salud y el aspecto de la piel dañada y envejecida.

15 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 es la SEC ID N°: 45 que es la secuencia de aminoácidos del colágeno IV que ilustra las apariciones de los tetrapéptidos GxxG. Todas las secuencias en negrita están subrayadas y las secuencias solapantes tienen un
20 subrayado doble.

La FIG. 2 es la SEC ID N°: 46 que es la secuencia de aminoácidos del colágeno IV que ilustra las apariciones de los PGPR y GAGP activos en el cambio de marco. Todas las secuencias activas en el cambio de marco están en negrita y subrayadas y las secuencias GxxG que se producen un cambio de marco más lejos tienen un
25 subrayado doble.

La FIG. 3 es también la SEC ID N°: 45, la secuencia de aminoácidos del colágeno IV, que ilustra las apariciones del tetrapéptido PGPP.

Descripción detallada

30 La invención se dirige de forma general hacia tetrapéptidos que estimulan la producción de proteínas de la ECM y modulan la cicatrización de heridas, y los usos de dichos tetrapéptidos.

Péptidos

35 Una realización de la presente divulgación se dirige hacia un tetrapéptido aislado que comprende el motivo GxxG o PxxP. En la presente realización, G (glicina) y P (prolina) se mantienen y x es un aminoácido variable. El péptido es la SEC ID N°: 14. Otros péptidos descritos en el presente documento incluyen la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, o SEC ID N°: 16.

40 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un tetrapéptido que comprende la SEC ID N°: 14 para su uso como medicamento.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso como medicamento que comprende la SEC ID N°: 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona una composición de la invención para su uso en un tratamiento para el cuidado de la piel.

50 En un aspecto adicional, se proporciona un método *in vitro* para estimular la producción de colágeno por una célula, comprendiendo el método exponer a la célula a un tetrapéptido que comprende la SEC ID N°: 14 induciendo de esta forma la producción de colágeno de una célula.

55 Kessler E et al notifican una aminopeptidasa novedosa derivada de *Clostridium histolyticum* en *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 50, n° 2, 1973, páginas 405-412.

60 El documento EP1074620 se refiere a proteínas seleccionadas entre los miembros de la superfamilia TGF-beta, que son monoméricas debido a la sustitución o la delección de una cisteína que es la responsable de la formación de dímeros. El documento EP1074620 también está referido a los ácidos nucleicos, que codifican dichas proteínas monoméricas, vectores o células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos así como las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas o los ácidos nucleicos que codifican las proteínas. Las composiciones farmacéuticas se pueden aplicar ventajosamente a todas las indicaciones en las que se usan las respectivas proteínas diméricas.

65 Otra realización de la presente divulgación se dirige hacia un tetrapéptido aislado que comprende el motivo GxPG, en el que x es P en cualquier posición de la variable, o ambos. En esta realización, G (glicina) y P (prolina) se

mantienen y x es un aminoácido variable. El péptido puede ser por lo general cualquier péptido comprendido en la descripción anterior, y más preferiblemente es la SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 5, o SEC ID N°: 7.

5 Otra realización de la presente divulgación se dirige hacia un tetrapéptido aislado que comprende el motivo GExG. En esta realización, G (glicina) y E (ácido glutámico) se mantienen y x es un aminoácido variable. El péptido puede ser por lo general cualquier péptido comprendido en la descripción anterior, y más preferiblemente es la SEC ID N°: 5 o la SEC ID N°: 8.

10 Otra realización de la presente divulgación se dirige hacia un tetrapéptido aislado que comprende el motivo PGxP. En esta realización, P (prolina) y G (glicina) se mantienen y x es un aminoácido variable. El péptido puede ser por lo general cualquier péptido comprendido en la descripción anterior, y más preferiblemente es la SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 14, o SEC ID N°: 16.

15 Otra realización de la presente divulgación se dirige hacia un tetrapéptido aislado que comprende el motivo PExP. En esta realización, P (prolina) y E (ácido glutámico) se mantienen y x es un aminoácido variable. El péptido puede ser por lo general cualquier péptido comprendido en la descripción anterior, y más preferiblemente es la SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 9.

20 Otra realización de la presente divulgación se dirige hacia un tetrapéptido activo en el cambio de marco. En esta realización, el tetrapéptido se produce en un cambio de marco del tetrapéptido GxxG o PxxP en una proteína de la ECM. El péptido puede ser por lo general cualquier péptido comprendido en la descripción anterior, y más preferiblemente es la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.

25 Cada uno de los péptidos anteriormente descritos puede comprender aminoácidos D o L. Los péptidos pueden comprender aminoácidos todos D o aminoácidos todos L. Los péptidos pueden tener un extremo C ácido (-CO₂H) o, preferentemente, un extremo C amida (-CONH₂, -CONHR o -CONR₂). Los péptidos pueden estar adicionalmente aumentados o modificados, tanto química como enzimáticamente. Por ejemplo, los péptidos pueden estar amidados (-NH₂) en el extremo C, que puede volver al tetrapéptido menos susceptible a la degradación mediante proteasas y aumentar la solubilidad e comparación con las formas de ácido libre. Los péptidos también pueden estar lipidados lo que puede proporcionar una mejora en la penetración de la piel.

30 Los péptidos anteriormente descritos pueden contener los siguientes aminoácidos: R (arginina), L (leucina), P (prolina), F (fenilalanina), Q (glutamina), E (ácido glutámico), I (isoleucina), K (lisina), S (serina), V (valina), A (alanina), N (asparagina), D (ácido aspártico), T (treonina), Y (tirosina) y G (glicina). Los péptidos anteriormente descritos no incluyen lo siguiente M (metionina), C (cisteína), H (histidina) o W (triptófano). De acuerdo con ello, en una realización, x no se selecciona entre cualquiera de M (metionina), C (cisteína), H (histidina) o W (triptófano).

Métodos de uso

40 Una realización adicional de la presente divulgación se dirige hacia métodos para utilizar los péptidos anteriormente descritos. Los métodos de uso pueden implicar el uso de un solo péptido, o pueden implicar el uso de dos o más péptidos en combinación.

45 Una realización de la presente divulgación es un método para estimular la reparación de piel dañada y el mantenimiento de la piel sana usando tetrapéptidos que estimulan la producción de proteínas de la ECM. El método se dirige, de manera general, a poner en contacto células dérmicas (piel) con una composición que contiene el péptido. Las composiciones pueden ser un aerosol, emulsión, líquido, loción, crema, pasta, pomada, espuma, u otra formulación farmacéuticamente aceptable. En general, una formulación farmacéuticamente aceptable incluiría cualquier portador aceptable adecuado para su uso sobre la piel humana, por ejemplo, un vehículo cosméticamente aceptable y un vehículo dermatológicamente aceptable. Las composiciones pueden incluir otros agentes biológicamente activos tales como retinoides u otros péptidos. Las composiciones pueden incluir vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. La etapa de puesta en contacto se puede llevar a cabo *in vivo*, *in situ*, *in vitro*, o mediante cualquier método conocido de los expertos en la materia. De manera más preferida, la etapa de puesta se puede llevar a cabo por vía tópica a una concentración suficiente para desencadenar una respuesta estimuladora. La concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, y de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml. La etapa de puesta en contacto se puede llevar a cabo en un mamífero, un gato, un perro, una vaca, un caballo, un cerdo, o un ser humano. Una composición preferida para estimular la producción de proteínas de la ECM comprende la SEC ID N°: 8; más preferentemente, la composición comprende la SEC ID N°: 8 en una mezcla heterogénea con al menos otro tetrapéptido. En la realización más preferida, los tetrapéptidos individuales de la composición ocasionarían una producción de colágeno mantenida durante un periodo de al menos 48 horas.

65 Una realización adicional de la presente divulgación se dirige a un método para estimular la cicatrización de heridas de una piel dañada por el envejecimiento normal, enfermedad, lesión, traumatismo, o mediante cirugía u otros procedimientos médicos. El método puede comprender administrar la composición a un herida de un animal, en el

que la composición comprende cualquiera de los péptidos anteriormente descritos, de forma individual o en combinación. Las composiciones pueden ser un líquido, loción, crema, pasta, pomada, espuma, o cualquier formulación farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden incluir vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones pueden incluir otros agentes biológicamente activos tales como antibióticos o factores del crecimiento. Las composiciones también se pueden utilizar junto con otros agentes terapéuticos tales como injertos de tejido, productos de cultivo de tejido, oxígeno o apósitos. La concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, y de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml. La composición se puede administrar a la herida por vía tópica. Por lo general, el animal puede ser cualquier tipo de animal, y preferiblemente es un mamífero, y más preferentemente un ser humano, vaca, caballo, gato, perro, cerdo, cabra, u oveja. Una composición preferida para aplicaciones de cicatrización de heridas en la que se estimula la producción de proteínas de la ECM comprende la SEC ID N°: 8; más preferentemente, la composición comprende la SEC ID N°: 8 en una mezcla heterogénea con al menos otro tetrapéptido. En la realización más preferida, los tetrapéptidos individuales de la composición ocasionarían una producción de colágeno mantenida durante un periodo de al menos 48 horas.

Una realización adicional de la presente divulgación se dirige a un método para reducir la formación de cicatrices de una piel dañada por el envejecimiento normal, enfermedad, lesión, traumatismo, o mediante cirugía u otros procedimientos médicos. El método puede comprender administrar la composición a un herida de un animal, en el que la composición comprende cualquiera de los péptidos anteriormente descritos, de forma individual o en combinación. Las composiciones pueden ser un líquido, loción, crema, pasta, pomada, espuma, u otra formulación farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden incluir vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones pueden incluir otros agentes biológicamente activos tales como antibióticos o factores del crecimiento. Las composiciones también se pueden utilizar junto con otros agentes terapéuticos tales como injertos de tejido, productos de cultivo de tejido, oxígeno o apósitos. La concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, y de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml. La composición se puede administrar a la herida por vía tópica. Por lo general, el animal puede ser cualquier tipo de animal, y preferiblemente es un mamífero, y más preferentemente un ser humano, vaca, caballo, gato, perro, cerdo, cabra, u oveja. Una composición preferida para aplicaciones de cicatrización de heridas en la que se estimula la producción de proteínas de la ECM comprende la SEC ID N°: 8; más preferentemente, la composición comprende la SEC ID N°: 8 en una mezcla heterogénea con al menos otro tetrapéptido. En la realización más preferida, los tetrapéptidos individuales de la composición ocasionarían una producción de colágeno mantenida durante un periodo de al menos 48 horas.

Una realización adicional de la presente divulgación se dirige a un método para producir los tetrapéptidos descritos en combinación. Los péptidos se pueden producir usando cualquier método conocido de los expertos en la materia tales como los descritos en Merrifield, R.B., Solid Phase Peptide Synthesis I., J. AM. CHEM. SOC. 85:2149-2154 (1963); Carpino, L.A. et al., [(9-Fluorenylmethyl)Oxy] Carbonyl (Fmoc) Amino Acid Chlorides: Synthesis, caracterización, And Application To The Rapid Synthesis Of Short Peptides, J. ORG. CHEM. 37:51:3732-3734; Merrifield, R.B. et al., Instrument For Automated Synthesis Of Peptides, ANAL. CHEM. 38:1905-1914 (1966); o Kent, S.B.H. et al., High Yield Chemical Synthesis Of Biologically Active Peptides On An Automated Peptide Synthesizer Of Novel Design, en: PEPTIDES 1984 (Ragnarsson U., ed.) Almqvist y Wiksell Int., Estocolmo (Suecia), pp. 185-188. Preferentemente, los péptidos se producirán mediante una máquina que puede realizar la adición secuencial de aminoácidos a una cadena de péptido en crecimiento. Sin embargo, los péptidos también se pueden fabricar usando metodología convencional en fase de solución.

Se ha observado que la adición de una mezcla de aminoácidos libres en lugar de mezclas de péptidos homogéneas durante la síntesis de la cadena peptídica da como resultado la incorporación variada de aminoácidos libres de forma que dicha combinación de péptidos es el resultado de las reacciones de síntesis. Se puede ajustar la frecuencia de incorporación relativa de un aminoácido particular incluido en una mezcla de dos o más aminoácidos añadidos durante la síntesis. El ajuste se posibilita mediante la modificación de la relación de un aminoácido libre puesto a disposición durante el proceso de síntesis con respecto al resto de aminoácidos de la mezcla (esto se denomina mezcla isocinética).

Los siguientes ejemplos se han incluido para demostrar las realizaciones preferidas de la presente divulgación. Las personas expertas en la materia deberán apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan técnicas y composiciones descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y, por tanto, se puede considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, la persona normalmente experta en la técnica deberá, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y seguir obteniendo un resultado igual o similar sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de secuencias repetidas del tetrapéptido en el colágeno

- 5 Una proporción relativamente elevada de las secuencias repetidas del tetrapéptido en el colágeno IV tiene el motivo GxxG (en el que x es cualquier aminoácido). Numerosos de estos se muestran *in situ* como parte de la secuencia completa del colágeno IV ilustrada en la Figura 1 como la SEC ID N^o: 45. En primer lugar se examinó el colágeno IV debido a su papel para interactuar con otros componentes especializados de la ECM (véase Gregory Schultz et al., 10 2005). Existen once secuencias con el motivo GxxG en colágeno IV que aparecen más de diez veces (GxxG donde xx se representa por: vp, ek, fp, lp, pp, sp, ep, ip, pk, qp y tp). De estas secuencias de péptidos, ocho de las once secuencias contienen prolina en la posición 3, dos de once secuencias contienen P en la posición 2, una de las once secuencias contienen prolina en las posiciones 2 y 3, y una de once secuencias no contienen prolina. Las secuencias descritas se denominan como REPLIKINES™. "REPLIKINE" se define como una secuencia corta dentro de las proteínas ECM que se producen varias veces (es decir, se replica). Esta secuencia puede estar presente en una proteína de la ECM (por ejemplo, colágeno IV). Preferentemente, la secuencia está presente en múltiples proteínas de la EMC (por ejemplo, todos los colágenos, elastina, laminina, etc.). La presencia de la secuencia de múltiples proteínas de la ECM aumentan la posibilidad de que el fragmento puede ser capaz de estimular la síntesis o la reparación de la ECM.
- 15
- 20 Las once secuencias GxxG que aparecen en el colágeno IV listado anteriormente se destacaron en la secuencia del colágeno IV humano ilustrada en la Figura 1. En esta figura, todas las secuencias en negrita están subrayadas y las secuencias solapantes tienen un subrayado doble. Todas menos una de dichas secuencias también aparece en los colágenos I, II, III, y V. Este hecho contribuye a la capacidad de los péptidos descritos para estimular la producción de todos los tipos de colágenos, especialmente cuando los péptidos se utilizan en combinación. La Tabla 1 muestra la frecuencia de varias repeticiones de tetrapéptido en las proteínas de la ECM. Las secuencias en negrita de la 25 Tabla 1 son las que aparecen en el colágeno IV diez o más veces.

Tabla 1: Frecuencia de los tetrapéptidos en las proteínas de la ECM

SEC ID N ^o	Secuencia	Colágeno I	Colágeno II	Colágeno III	Colágeno IV	Colágeno V	Elastina	Precursor de elastina
19	GAAG	10	5	7		2	4	5
20	GAKG	3	4	3	5	5		
21	GAPG	13	21	25	6	9		
22	GDKG	2	2	4	9	3		
23	GDRG	2	5	2	4	1		
8	GEKG	3	5	4	22	15		
5	GEPG	11	15	10	11	4		
24	GERG	10	11	14	6	7		
2	GFPG	4	8	6	22	5	1	1
25	GIPG	2	2	6	14	6	5	5
26	GKDG	1	4	5	2	2		
27	GKPG	2	3	3	4	1		
28	GLKG	2	1	1	5	4		
29	GLPG	15	10	9	42	15	1	1
30	GNPG	3	5	3	2	1		
31	GPAG	16	20	20	3	6		
32	GPKG	3	11	4	12	9		
7	GPPG	33	40	40	46	43		
33	GPQG	7	11	9	7	5		
34	GPRG	11	13	10	4	7		
35	GPSG	10	11	5	1	5		
36	GPTG	4	3	2	2	6		
37	GPVG	9	3	3	2	5		
38	GQPG	3	4	6	12	7		
39	GRDG	4	2	3	3			
40	GRPG	3	3	4	2	5		
3	GSPG	4	6	21	16	3		
41	GTPG	3	4	2	11	2		
42	GVKG	1	3	2	3	1		
43	GVPG		1	3	10	1	14	15
44	GYPG	1	1	1	4	2		

Como también es evidente de una revisión de la secuencia del colágeno IV, SEC ID N°: 45, existen también varias apariciones de secuencias que tienen el motivo PxxP. Por ejemplo, la secuencia PGPP aparece no menos de quince veces, como se ilustra en la Figura 3. Por tanto, esta secuencia descrita también se denomina como una REPLIKINE™. Preferentemente, esta secuencia está presente en múltiples proteínas de la ECM (por ejemplo, todos los colágenos, elastina, laminina, etc.) ya que la presencia de la secuencia de múltiples proteínas de la ECM aumentan la posibilidad de que el fragmento puede ser capaz de estimular la síntesis o la reparación de la ECM. Las quince secuencias PGPP que aparecen en el colágeno IV listado anteriormente se destacaron y subrayaron en la secuencia del colágeno IV humano ilustrada en la Figura 3.

10 Ejemplo 2: Identificación de las secuencias activas en el cambio de marco

Además de la proporción relativamente elevada de las secuencias repetidas del tetrapéptido en el colágeno IV que tienen el motivo GxxG, se han identificado otras secuencias de tetrapéptidos aparecen a la distancia de un cambio de marco desde las secuencias de tetrapéptidos GxxG o PxxP. Estas secuencias pueden repetirse o aparecer solamente una vez en una proteína de la ECM y pueden estar situadas a una posición de aminoácido lejos de una cualquiera de las secuencias de tetrapéptidos GxxG o PxxP tal como se describe en el presente documento. Estas secuencias de tetrapéptidos se denominan como secuencias activas en el cambio de marco. Dichas secuencias activas en el cambio de marco pueden incluir, de acuerdo con ello, una G o una P en cualquiera de la segunda o tercera posición dependiendo de la dirección de cambio de marco. Se ha reconocido además que las secuencias activas en el cambio de marco se pueden combinar con otras secuencias de tetrapéptidos descritas en esta solicitud, formando una combiquina. Un ejemplo de dicha combiquina es H06 y H15.

Un ejemplo de una secuencia activa en el cambio de marco es GAGP o H12 (SEC ID N°: 6). H12 (GAGP) aparece un resto (o marco) cambiado a partir del tetrapéptido GxxG GGAG en el Colágeno III (SEC ID N°: 46) como se ilustra en la Figura 2. En esta figura, todas las secuencias activas en el cambio de marco están en negrita y subrayadas y las secuencias GxxG que se producen un cambio de marco más lejos tienen un subrayado doble. Además, como se muestra en la Tabla 5, este tetrapéptido (GAGP) consigue buenos resultados para la producción de colágeno a 48 horas. Otro ejemplo es la secuencia PGPR, que es H10 (SEC ID N°: 4) que aparece once veces en los Colágenos I-IV. Como aparece múltiples veces en una proteína ECM individual, este tetrapéptido se consideraría además una REPLIKINE. La Figura 2 (SEC ID N°: 46) ilustra varias apariciones de este tetrapéptido con cada aparición un desplazamiento de marco desde el tetrapéptido GxxG GPRG. Esta secuencia particular de marco múltiples proteínas de la ECM aumentan la posibilidad de que el fragmento puede ser capaz de estimular la síntesis o la reparación de la ECM.

35 Ejemplo 3: Identificación de secuencias repetidas que estimulan la producción de colágeno

Varias secuencias identificadas en los Ejemplos 1 y 2 se sintetizaron usando química convencional de péptidos y se sometieron a ensayo para estimular los fibroblastos cutáneos. Los péptidos sintetizados se amidaron en el extremo C, que convirtió los tetrapéptidos en menos susceptible a la degradación mediante proteasas y aumentar la solubilidad e comparación con las formas de ácido libre. Los fibroblastos cutáneos humanos se incubaron en placas de 96 pocillos a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 y 48 horas en 150 µl de medio de cultivo completo (Cascade Biologics, Portland, OR; N° de Cat. M-106-500), suplementado con suplemento de bajo contenido de suero (Cascade Biologics, Portland, OR; N° de Cat. S-003-10) que contenía péptidos muestra a una concentración final de péptido de 50 µg/ml. Cada pocillo se sembró con 10.000 células. Tras la incubación, se recuperaron muestras de medio de 100 µl de cada pocillo y se analizaron para determinar la producción de colágeno.

Los ensayos se realizaron por Tebu-bio Laboratories (France) usando el kit de ensayo de colágeno SIRCOL™ Collagen Assay Kit (Biocolor Assays, UK) siguiendo el protocolo del fabricante. El ensayo de colágeno SIRCOL™ es un método cuantitativo de unión a colorante designado para el análisis de colágenos solubles liberados en el medio de cultivo por las células de mamíferos durante el cultivo *in vitro*. El colágeno de las muestras ensayadas se une al colorante aniónico SIRCOL™. Los complejos de colágeno-colorante precipitan de la solución se aglomeran mediante centrifugación. El aglomerado de colágeno-colorante recuperado se disolvió en una solución alcalina antes de realizar las mediciones de la absorbancia. Se tomaron mediciones por duplicado a las 24 y 48 horas desde las dos muestras separadas. Se promediaron las cuatro mediciones de cada muestra. La absorbancia de los blancos de reactivos, patrones de colágeno, y las muestras se midieron a 560 nm. La absorbancia del blanco de reactivo se restó de la absorbancia de cada muestra a las 24 y 48 horas.

Dos conjuntos de datos independientes se utilizaron para generar dos curvas de calibración de patrón de calibración. La primera curva de calibración se generó con fines de calcular la cantidad de colágeno en las muestras H6 (combinación de las SEC ID N°: 1-4), H7-H14 (SEC ID N°: 1-8, respectivamente) y H15 (combinación de la SEC ID N°: 5-8). La segunda curva de calibración se generó para calcular la cantidad de colágeno en las muestras H16 (combinación de la SEC ID N°: 9), H21-23 (SEC ID N°: 10-12, respectivamente), H25-26 (SEC ID N°: 13-14, respectivamente), o H29-30 (SEC ID N°: 15-16, respectivamente), H32 (SEC ID N°: 17), H33 (combinación de las SEC ID N°: 9-12), H34 (combinación de las SEC ID N°: 11-14), H35 (combinación de las SEC ID N°: 13-16), H36 (combinación de las SEC ID N°: 1, 6, 5, 8), H37 (SEC ID N°: 17) y H38 (SEC ID N°: 8) a partir de las mediciones de absorbancia se creó representando gráficamente la Abs_{560nm} de los patrones de colágeno conocidos comparado con

las respectivas concentraciones de los patrones de colágeno (en microgramos) cada momento de una serie de ensayos. Con respecto a cada conjunto de datos, se utilizó la misma curva de calibración para las muestras tomadas a las 24 y 48 horas (Tablas 2A y 2B). De acuerdo con ello, se prepararon diferentes curvas patrón inmediatamente antes de realizar cada serie de ensayos.

5

Tabla 2A: Curva de calibración para ensayar la producción de colágeno mediante los péptidos H6-H15

Patrones de colágeno (µg)	Ensayo de A _{560 nm} a las 24 h	Ensayo de A _{560 nm} a las 48 h
0	0,00	0,00
5	0,08	0,10
10	0,11	0,15
25	0,32	0,35
50	0,66	0,65

Tabla 28: Curva de calibración para ensayar la producción de colágeno mediante los péptidos H16, H21-23, H25-26, y H29-38

Patrones de colágeno (µg)	Fecha 1 del ensayo de A _{560 nm}	Fecha 2 del ensayo de A _{560 nm}
0	0,00	0,00
5	0,12	0,09
10	0,14	0,15
25	0,48	0,42
50	0,88	0,80

10

Se llevó a cabo una regresión lineal representando gráficamente los valores de la Abs_{560nm} versus las concentraciones de los respectivos patrones de colágeno usando MICROSOFT EXCEL™. La regresión dio como resultado líneas descritas por la fórmula $y = 0,013x$ para ambos tiempos de incubación indicados en la Tabla 2A. Como los resultados fueron idénticos, solamente se utilizó el periodo de 24 horas para la segunda serie de curvas de calibración. La fórmula de la línea obtenida en la fecha 1 del ensayo y en la fecha 2 del ensayo de la segunda serie de muestra fue $y = 0,0178x$ e $y = 0,0162x$, respectivamente. El péptido LL-37 (SEC ID N°: 18) se utilizó como control positivo, ya que se había notificado ampliamente que tenía cierto impacto sobre la cicatrización de heridas en el hombre (Heilbom et al., The Cathelicidin Anti-Microbial Peptide LL-37 Is Involved In The Re-Epithelialization Of Human Skin Wounds And Is Lacking In Chronic Ulcer Epithelium, J. Invest. Dermatol. 120:379-89 (2003)). El límite de detección del ensayo definido por el fabricante es 2,5 µg.

15

20

La cantidad total de colágeno producido en las muestras que contenían péptidos se calculó a partir de los valores de absorbancia promedio tomados a las 24 horas (Tabla 3A) y 48 horas (Tabla 38) usando la ecuación lineal derivada de la curva patrón. La cantidad total de colágeno producido en muestras que contenían los péptidos H16 (SEC ID N°: 9), H21-23 (SEC ID N°: 10-12, respectivamente), H25-26 (SEC ID N°: 13-14, respectivamente), o H29-30 (SEC ID N°: 15-16, respectivamente), H32 (SEC ID N°: 17), H33 (combinación de las SEC ID N°: 9-12), H34 (combinación de las SEC ID N°: 11-14), H35 (combinación de las SEC ID N°: 13-16), H36 (combinación de las SEC ID N°: 1, 6, 5, 8), H37 (SEC ID N°: 17) y H38 (SEC ID N°: 8) se calculó a partir de los valores de la absorbancia tomados a las 24 horas (Tabla 4A) y 48 horas (Tabla 48) usando la ecuación lineal derivada de la curva patrón. Estos valores se compararon con el péptido LL37 (SEC ID N°: 18), un péptido conocido por estimular el colágeno. En cada tabla, la muestras marcadas con un asterisco (*) pueden no ser significativas, ya que el límite de detección del ensayo es 2,5 µg.

25

30

Tabla 3A: Mediciones de la absorbancia y cuantificación del colágeno en las muestras de ensayo H6-H15 a las 24 horas.

35

SEC ID N°	Péptidos	A560nm		Promedio	Promedio menos blanco	Colágeno (µg)
18	LL37	0,102	0,136	0,12	0,04	3,0
-	H6	0,084	0,140	0,11	0,03	2,5
1	H7	0,098	0,063	0,08	0,00	0,0*
2	H8	0,122	0,078	0,10	0,02	1,5*
3	H9	0,147	0,104	0,13	0,05	3,5
4	H10	0,103	0,146	0,12	0,04	3,4
5	H11	0,110	0,168	0,14	0,06	4,5
6	H12	0,063	0,101	0,08	0,00	0,2*
7	H13	0,114	0,093	0,10	0,02	1,8*
8	H14	0,115	0,122	0,12	0,04	3,0
-	H15	0,132	0,093	0,11	0,03	2,5
-	Blanco	0,074	0,076	0,08	0,00	0,0

Tabla 3B: Mediciones de la absorbancia y cuantificación del colágeno en las muestras de ensayo H6-H15 a las 48 horas.

SEC ID Nº	Péptidos	A560nm		Promedio	Promedio menos blanco	Colágeno (µg)
18	LL37	0,262	0,113	0,19	0,07	5,2
-	H6	0,086	0,189	0,14	0,02	1,3*
1	H7	0,192	0,189	0,19	0,07	5,4
2	H8	0,137	0,126	0,13	0,01	0,9*
3	H9	0,117	0,061	0,09	0,00	0,0*
4	H10	0,136	0,085	0,11	0,00	0,0*
5	H11	0,113	0,181	0,15	0,03	2,1*
6	H12	0,106	0,231	0,17	0,05	3,7
7	H13	0,100	0,145	0,12	0,00	0,2*
8	H14	0,132	0,176	0,15	0,03	2,6
-	H15	0,177	0,174	0,18	0,06	4,3
-	Blanco	0,120	0,115	0,12	0,00	0,0

5 Tabla 4A: Mediciones de la absorbancia y cuantificación del colágeno en las muestras de ensayo H16, H21-23, H25-26, o H29-38 a las 24 horas.

SEC ID Nº	Péptidos	A560nm		Promedio	Promedio menos blanco	Colágeno (µg)
9	H16	0,133	0,137	0,14	0,06	3,1
10	H21	0,129	0,119	0,12	0,04	2,5
11	H22	0,192	0,085	0,14	0,06	3,3
12	H23	0,090	0,073	0,08	0,00	0,1*
13	H25	0,129	0,076	0,10	0,02	1,3*
14	H26	0,114	0,149	0,13	0,05	2,9
15	H29	0,111	0,063	0,09	0,01	0,4*
16	H30	0,099	0,092	0,10	0,02	0,9*
17	H32 (cristales y toxicidad celular)	0,087	0,055	0,07	-0,01	-0,5*
-	H33	0,086	0,125	0,11	0,03	1,4*
-	H34	0,117	0,120	0,12	0,04	2,2*
-	H35	0,103	0,090	0,10	0,02	0,9*
-	H36	0,105	0,128	0,12	0,04	2,1*
17	H37	0,099	0,100	0,10	0,02	1,1*
8	H38	0,103	0,159	0,13	0,05	2,9
-	Blanco	0,072	0,086	0,08	0,00	0,0

Tabla 4B: Mediciones de la absorbancia y cuantificación del colágeno en las muestras de ensayo H16, H21-23, H25-26, o H29-38 a las 48 horas.

SEC ID Nº	Péptidos	A560nm		Promedio	Promedio menos blanco	Colágeno (µg)
9	H16	0,065	0,064	0,06	0,00	0,3*
10	H21	0,089	0,126	0,11	0,05	2,9
11	H22	0,102	0,087	0,09	0,03	2,1*
12	H23	0,093	0,082	0,09	0,03	1,7*
13	H25	0,059	0,084	0,07	0,01	0,7*
14	H26	0,081	0,153	0,12	0,06	3,5
15	H29	0,086	0,094	0,09	0,03	1,9*
16	H30	0,083	0,101	0,09	0,03	2,0*
17	H32 (cristales y toxicidad celular)	0,088	0,072	0,08	0,02	1,2*
-	H33	0,096	0,092	0,09	0,03	2,1*
-	H34	0,076	0,155	0,12	0,06	3,4
-	H35	0,120	0,074	0,10	0,04	2,3*
-	H36	0,154	0,082	0,12	0,06	3,6
17	H37	0,078	0,114	0,10	0,04	2,2*
8	H38	0,123	0,089	0,11	0,05	2,8
-	Blanco	0,106	0,0106	0,06	0,00	0,0

Como el tamaño de las muestras era de 100 µl, la concentración del colágeno producido en cada muestra en microgramos por mililitros se determinó multiplicando la cantidad de colágeno detectada por diez.. Los resultados de las muestras ensayadas se resumen en la Tabla 5.

5

Tabla 5: Síntesis de colágeno inducida por péptidos

SEC ID Nº	Nombre	Secuencia primaria	[Péptido] (µg/ml).	Colágeno producido (µg)	
				24 h	48 h
1	H07	PEGP	50	0	54
2	H08	GFPG	50	15	9
3	H09	GSPG	50	35	0
4	H10	PGPR	50	34	0
-	H06	H7, H8, H9, H10 (SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4)	50	25	13
5	H11	GEPG	50	45	21
6	H12	GAGP	50	2	37
7	H13	GPPG	50	18	2
8	H14	GEKG	50	30	26
8	H38	GEKG	0,3	29	28
-	H15	H11, H12, H13, H14 (SEC ID Nº: 5, 6, 7, 8)	50	25	43
9	H16	PEKP	50	31	3
10	H21	PKGP	50	25	29
11	H22	PGQP	50	33	21
12	H23	PGTP	50	1	17
13	H25	PMGP	50	13	7
14	H26	PGPP	50	29	35
15	H29	PQGP	50	4	19
16	H30	PGNP	50	9	20
17	H32	KTTKS (péptido SEDERMA™)	50	na	12
17	H37	KTTKS (péptido SEDERMA™)	0,3	11	22
-	H33	H16, H21, H22, H23 (SEC ID Nº: 9, 10, 11,12)	50	14	21
-	H34	H22, H23, H25, H26 (SEC ID Nº: 11, 12, 13,14)	50	22	34
-	H35	H25, H26, H29, H30 (SEC ID Nº: 13, 14, 15,16)	50	9	23
-	H36	H7, H12, H11, H14 (SEC ID Nº: 1, 6, 5,8)	50	21	36
18	LL37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRID FLRNLVPRTES	50	30	52

10 Todos los tetrapéptidos ensayados estimularon la producción de colágeno soluble. De las secuencias ensayadas, los tetrapéptidos GxxG con un ácido glutámico en la posición 2 estimularon mejor el colágeno en ambos puntos temporales a 24 y 48 horas. Estas secuencias son H11 (GEPG; SEC ID Nº: 5), H14 (GEKG; SEC ID Nº: 8) y H38 (GEKG; SEC ID Nº: 8). Los péptidos se cribaron inicialmente usando una concentración de péptido de 50 µg/ml. Para vigilar la concentración eficaz para estimular la producción de colágeno, también se sometió a ensayo la H14 (SEC ID Nº: 8) a 0,3 µg/ml como H38. Como se muestra en la Tabla 5, la estimulación de colágeno inducida por H38 no disminuyó a la concentración más baja, lo que indica que la concentración estimuladora máxima de la SEC ID Nº: 8 se encuentra en un valor igual o inferior a 0,3 µg/ml.

15 Para ensayar su eficacia, la SEC ID Nº: 8 (H14 y H38) se comparó con el péptido LL37, (SEC ID Nº: 18) conocido por estimular la producción de colágeno. Basándose en la cantidad de colágeno liberado por los fibroblastos en respuesta a LL37, se consideró que 25 µg/ml era una cantidad significativa de colágeno liberado debido al contacto con el tetrapéptido. La SEC ID Nº: 8 indujo aproximadamente la misma cantidad de colágeno que LL37 (SEC ID Nº: 18) a las 24 horas. De forma importante, el colágeno producido como resultado del contacto con la SEC ID Nº: 8 se mantuvo sustancialmente durante al menos 48 horas. La SEC ID Nº: 8 también se comparó con un péptido que conduce al cuidado de la piel conocido por estimular la producción de colágeno, KTTKS (SEC ID Nº: 17) (Katayama et. al, J. BIOL. CHEM. 288:9941-9944 (1983)). KTTKS es un ingrediente del producto MATRIXYL™ (SEDERMA SAS, Francia). La SEC ID Nº: 8 estimuló mayor producción de colágeno que el péptido KTTKS (SEC ID Nº: 17) (Tabla 5) a 24 y 48 horas.

Ejemplo 4: Identificación de combinaciones de péptidos que potencian sinérgicamente la estimulación del colágeno - COMBIKINES

30 Las poblaciones heterogéneas de tetrapéptidos activos pueden estimular la producción de colágeno a mayor nivel que las muestras homogéneas de tetrapéptidos. Los componentes de la composición heterogénea se denominan COMBIKINES™. COMBIKINES son un grupo de REPLIKINES combinado para producir un efecto mayor o más amplio sobre uno o más tipos de células diana. Los péptidos H11 (SEC ID Nº: 5), H12 (SEC ID Nº: 6), H13 (SEC ID Nº: 7), y H14 (SEC ID Nº: 8) se combinaron a una concentración final de 50 µg/ml y se sometieron a ensayo usando

el mismo protocolo que para los péptidos individuales. Como era de esperar, el resultado obtenido en el punto temporal de 24 horas igualó el promedio de las puntuaciones de inducción individuales. La combinación de los péptidos a las 48 horas, sin embargo, indujo el colágeno a un nivel de 43 µg/ml. Sorprendentemente, esta cantidad era mucho mayor del promedio previsto (21 µg/ml) de los cuatro péptidos individuales (véase la Tabla 5). De esta manera, combinaciones específicas de péptidos pueden estimular la producción de colágeno a un grado mayor que los péptidos individuales a la misma concentración. Además, los tetrapéptidos procedentes de varias fuentes de ECM tales como colágeno, laminina, y elastina pueden producir una inducción potenciada de varias proteínas de la ECM (véanse las Tablas 1 y 5).

10 Ejemplo 5: Fabricación económica de COMBIKINE para potenciar la estimulación de la producción de colágeno

El elevado coste de la síntesis de péptidos limita la factibilidad de producir composiciones heterogéneas de péptidos bioactivos. La presente invención mitiga en gran medida esta limitación. Puesto que las secuencias descritas en el presente documento tienen una parte común (por ejemplo, una glicina o una prolina en ambos extremos), se puede sintetizar una gama de tetrapéptidos con variaciones en las posiciones 2 y 3 en un único ciclo de fabricación. Los péptidos sintéticos se pueden fabricar mediante cualquier método conocido en la técnica. (Benoiton, N., Chemistry of Peptide Synthesis, CRC (2005)). Durante la fabricación de los péptidos, se añaden los aminoácidos y las mezclas en lugar de las muestras homogéneas. La química para determinar las proporciones correctas de las concentraciones de aminoácidos añadidas en las composiciones mixtas para obtener la relación de péptidos resultantes deseada se ha descrito anteriormente (Greenbaum et al., Molecular and Cellular Proteomics 1:60-68, 2002; Krstenansky et al., Letters in Drug Design and Discovery 1:6-13, 2004). Con esta metodología, se puede fabricar una biblioteca de péptidos heterogéneos con prácticamente el mismo coste que para sintetizar un péptido.

La aplicación de este proceso de fabricación permite una producción económica de combiquinas bioactivas. Esto se posibilita mediante la composición única de los tetrapéptidos descritos. Las mezclas de tetrapéptidos están más adecuadas para su incorporación a formulaciones de uso tópico que los péptidos más largos. Debido a su longitud, los tetrapéptidos tienen ventajas prácticas y químicas sobre los péptidos más largos, incluyendo las siguientes: incorporación y disolución más sencillas en las formulaciones, mayor permeabilidad en la piel y en los poros, y mayores rendimientos de producción con métodos más sencillos para fabricar combinaciones de péptidos. Aunque no se requiere, las formulaciones ideales de tetrapéptidos, por separado o en combinación, son formulaciones que mantienen una producción de colágeno significativa desde 24 horas hasta las 48 horas. Más preferentemente, las formulaciones inducirían la síntesis de ECM durante el periodo completo de 48 horas, de forma que se produce más colágeno a las 48 horas que a las 24 horas. Aunque dentro del alcance de la presente invención, los tetrapéptidos que estimulan la producción de las proteínas de la ECM a las 24 horas, pero muestran una disminución de la producción a las 48 horas, están menos favorecidos. En este sentido, la Tabla 6 muestra los resultados de los péptidos descritos en el presente documento. Los péptidos preferidos se muestran en negrita.

Tabla 6: Péptidos descritos

SEC ID Nº	Péptidos	Colágeno liberado (µg/ml) 24 h	Colágeno liberado (µg/ml) 48 h	Liberación significativa de colágeno a 24 h y 48 h	Aumento en la liberación de colágeno a las 48 h v. 24 h	Disminución en la liberación de colágeno a las 48 h v.
18	LL37	30	52	√	√	
-	H6	25	13			
1	H7	0	54		√	
2	H8	15	9			
3	H9	35	0			√
4	H10	34	0			√
5	H11	45	21			√
6	H12	2	37		√	
7	H13	18	2			
8	H14	30	26	√		
8	H38	29	28	√		
-	H15	25	43	√	√	
9	H16	31	3			√
10	H21	25	29	√		
11	H22	33	21			√
12	H23	1	17		√	
13	H25	13	7			√
14	H26	29	35	√		
15	H29	4	19		√	
16	H30	9	20		√	

17	H32 (cristales y toxicidad celular)	NA	12			
17	H37	11	22		√	
-	H33	14	21		√	
-	H34	22	34		√	
-	H35	9	23		√	
-	H36	21	36		√	

Ejemplo 6: Los estimuladores del colágeno también sirven como moléculas multifactoras que potencian el cierre de heridas de las células epiteliales cutáneas

5 Los colágenos son componentes clave de todas las fase de la cicatrización de heridas. El estímulo de la producción de colágeno refleja que se han producido daños en la red del colágeno (por ejemplo, mediante enzimas o por destrucción física). De hecho, el colapso total de la red de colágeno ocasiona, de hecho, que se produzca la cicatrización. Por tanto, un estimulador del colágeno también puede servir como molécula multifactora que orquesta determinada remodelación de la matriz y potencia la cicatrización de heridas.

10 Se llevaron a cabo experimentos de cicatrización de heridas sobre monocapas de células epiteliales cutáneas (CRL-2592) sembradas en placas de 12 pocillos. Las células se privaron de suero durante 24 horas antes de la experimentación. Las monocapas confluentes de CRL-2592 se dañaron con una punta de pipeta (200 µl). Las heridas se lavaron y se documentaron mediante imágenes antes del tratamiento con péptido. Los péptidos se añadieron a una concentración final de 20 a 40 µg/ml. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad del 92 %, excepto cuando se tomaron las imágenes, durante un periodo de tiempo corto a temperatura ambiente. El cierre de las heridas se siguió a puntos temporales de 6 horas y 10 horas. Las heridas tratadas con PBS se utilizaron como controles negativos a fines de comparación.

20 **Tabla 7: Efecto de los péptidos sobre el cierre de heridas epiteliales cutáneas *in vitro***

	0 h	6 h		10 h	
Compuesto	Tamaño H*	Tamaño H	% cierre	Tamaño H	% cierre
PBS-1	36	29	19,40 %	21	41,70 %
PBS-2	52	42	19,20 %	30	42,30 %
SEC ID N°: 14	25	12	52 %	2,75	89 %
SEC ID N°: 5	48	39	19 %	30	37,50 %

* Tamaño H: tamaño de la herida (arbitraria)

El cierre de heridas de monocapas *in vitro* es resultado de la migración celular, que es importante en muchos procesos biológicos tales como la embriogénesis, angiogénesis, reacciones inflamatorias y reparación de heridas. Se cree que estos procesos están regulados por interacciones con otras células, citoquinas y proteínas de la ECM. Como se muestra en la Tabla 7, SEC ID N°: 14 induce significativamente el cierre de heridas en comparación con los efectos del PBS solo. Dicha actividad es específica del péptido así como específica del tipo de célula ya que la SEC ID N°: 14 no induce el cierre de heridas e la monocapa de fibroblastos de la piel humana (no se muestran los datos). La SEC ID N°: 5 es también un inductor de colágeno, pero no potencia la cicatrización de heridas o la migración del epitelio celular en ninguna extensión, comparado con los efectos del PBS solo. El hecho de que la SEC ID N°: 14 induzca la migración celular o el cierre de heridas de una forma específica de las células epiteliales cutáneas (es decir, es decir, no recluta fibroblastos) puede añadir una ventaja al uso de este péptido para el cuidado de la piel, ya que se cree que el alistamiento de grandes cantidades de fibroblastos activos hacia el sitio de una herida da como resultado una deposición excesiva y una contracción del tejido que da como resultado una cicatriz.

35 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Harris, Scott M. Falla, Timothy J. Zhang, Lijuan

40 <120> FRAGMENTOS DE PÉPTIDO PARA INDUCIR LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

<130> 11181.0034.NPUS00

<150> US 60/813.284

45 <151> 13-06-2006

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.4

ES 2 545 219 T3

5 <210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético H7

10 <400> 1

Pro Glu Gly Pro
1

15 <210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético H8

20 <400> 2

Gly Phe Pro Gly
1

25 <210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético H9

30 <400> 3

Gly Ser Pro Gly
1

35 <210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético H10

40 <400> 4

Pro Gly Pro Arg
1

45 <210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Péptido sintético H11

<400> 5

55 Gly Glu Pro Gly
1

<210> 6
<211> 4

ES 2 545 219 T3

	<212> PRT <213> Artificial	
5	<220> <223> Péptido sintético H12 <400> 6	
		Gly Ala Gly Pro 1
10	<210> 7 <211> 4 <212> PRT <213> Artificial	
15	<220> <223> Péptido sintético H13 <400> 7	
		Gly Pro Pro Gly 1
20	<210> 8 <211> 4 <212> PRT <213> Artificial	
25	<220> <223> Péptido sintético H14 <400> 8	
30		Gly Glu Lys Gly 1
35	<210> 9 <211> 4 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> Péptido sintético H16 <400> 9	
40		Pro Glu Lys Pro 1
45	<210> 10 <211> 4 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> Péptido sintético H21 <400> 10	
50		Pro Lys Gly Pro 1
55	<210> 11 <211> 4 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> Péptido sintético H22 <400> 11	
60		

ES 2 545 219 T3

Pro Gly Gln Pro
1

5 <210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético H23

10 <400> 12

Pro Gly Thr Pro
1

15 <210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético H25

<400> 13

Pro Met Gly Pro
1

25 <210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético H26

<400> 14

Pro Gly Pro Pro
1

35 <210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético H29

<400> 15

Pro Gln Gly Pro
1

45 <210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>

<223> Péptido sintético H30

55 <400> 16

Pro Gly Asn Pro
1

ES 2 545 219 T3

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético H32
 10
 <400> 17

 Lys Thr Thr Lys Ser
 1 5

 <210> 18
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido LL37
 20
 <400> 18

 Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
 1 5 10 15

 Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val Pro
 20 25 30

 Arg Thr Glu Ser
 35

 <210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30
 <400> 19

 Gly Ala Ala Gly
 1

 <210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Péptido sintético
 40
 <400> 20

 Gly Ala Lys Gly
 1

 <210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 45

ES 2 545 219 T3

5 <213> Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
<400> 21

Gly Ala Pro Gly
1

10 <210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 22

Gly Asp Lys Gly
1

20 <210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 23

Gly Asp Arg Gly
1

30 <210> 24
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 24

Gly Glu Arg Gly
1

40 <210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 25

Gly Ile Pro Gly
1

ES 2 545 219 T3

5 <210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <400> 26

Gly Lys Asp Gly
1

15 <210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

20 <400> 27

Gly Lys Pro Gly
1

25 <210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

30 <400> 28

Gly Leu Lys Gly
1

35 <210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

40 <400> 29

Gly Leu Pro Gly
1

45 <210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>

<223> Péptido sintético

55 <400> 30

ES 2 545 219 T3

Gly Asn Pro Gly

1

5 <210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

10 <223> Péptido sintético
<400> 31

Gly Pro Ala Gly

1

15 <210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

20 <223> Péptido sintético
<400> 32

Gly Pro Lys Gly

1

25 <210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

30 <223> Péptido sintético
<400> 33

Gly Pro Gln Gly

1

35 <210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

40 <223> Péptido sintético
<400> 34

Gly Pro Arg Gly

1

45 <210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

50 <223> Péptido sintético

<400> 35

ES 2 545 219 T3

Gly Pro Ser Gly

1

5 <210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <400> 36

Gly Pro Thr Gly

1

15 <210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 37

Gly Pro Val Gly

1

25 <210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 38

Gly Gln Pro Gly

1

35 <210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 39

Gly Arg Asp Gly

1

45 <210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 40

55

ES 2 545 219 T3

Gly Arg Pro Gly
1

5 <210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <400> 41

Gly Thr Pro Gly
1

15 <210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

20 <400> 42

Gly Val Lys Gly
1

25 <210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

30 <400> 43

Gly Val Pro Gly
1

35 <210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 44

Gly Tyr Pro Gly
1

45 <210> 45
<211> 1669
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 45

ES 2 545 219 T3

Met Gly Pro Arg Leu Ser Val Trp Leu Leu Leu Leu Pro Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu His Glu Glu His Ser Arg Ala Ala Ala Lys Gly Gly Cys Ala
20 25 30

Gly Ser Gly Cys Gly Lys Cys Asp Cys His Gly Val Lys Gly Gln Lys
35 40 45

Gly Glu Arg Gly Leu Pro Gly Leu Gln Gly Val Ile Gly Phe Pro Gly
50 55 60

Met Gln Gly Pro Glu Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Gln Lys Gly Asp
65 70 75 80

Thr Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Thr Lys Gly Thr Arg Gly Pro Pro
85 90 95

Gly Ala Ser Gly Tyr Pro Gly Asn Pro Gly Leu Pro Gly Ile Pro Gly
100 105 110

Gln Asp Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ile Pro Gly Cys Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Gly Glu Arg Gly Pro Leu Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Phe Ala
130 135 140

Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Met Lys Gly Asp Pro Gly
145 150 155 160

Glu Ile Leu Gly His Val Pro Gly Met Leu Leu Lys Gly Glu Arg Gly
165 170 175

Phe Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Leu
180 185 190

Gln Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Phe Thr Gly Pro Pro Gly Pro Pro
195 200 205

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Gln Met Gly Leu Ser Phe
210 215 220

Gln Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Asp Gln Gly Val Ser Gly Pro Pro
225 230 235 240

Gly Val Pro Gly Gln Ala Gln Val Gln Glu Lys Gly Asp Phe Ala Thr

ES 2 545 219 T3

				245						250				255		
Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Gln	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Phe	Gln	Gly	Met	Pro	
			260					265					270			
Gly	Val	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Lys	
		275					280					285				
Pro	Gly	Lys	Asp	Gly	Asp	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Ser	Pro	Gly	Phe	Pro	
	290					295					300					
Gly	Glu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Arg	Gln	Gly	Pro	Gln	Gly	
305					310					315					320	
Glu	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Ile	Val	Ile	Gly	
				325					330					335		
Thr	Gly	Pro	Leu	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Tyr	Pro	Gly	Thr	Pro	
			340					345					350			
Gly	Pro	Arg	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Phe	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	
		355					360					365				
Gln	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Pro	Gly	Gln	Ala	Gly	Ala	Pro	
	370					375					380					
Gly	Phe	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Phe	Pro	Gly	
385					390					395					400	
Thr	Ser	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Arg	Asp	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	
				405					410					415		
Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Tyr	Thr	Asn	Gly	Ile	Val	
			420					425					430			
Glu	Cys	Gln	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Asp	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Ile	Pro	
		435					440					445				
Gly	Gln	Pro	Gly	Phe	Ile	Gly	Glu	Ile	Gly	Glu	Lys	Gly	Gln	Lys	Gly	
	450					455					460					
Glu	Ser	Cys	Leu	Ile	Cys	Asp	Ile	Asp	Gly	Tyr	Arg	Gly	Pro	Pro	Gly	
465					470					475					480	
Pro	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Ile	Gly	Phe	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Ala	
				485					490					495		
Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Leu	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	Val	Ala	Gly	Val	Pro	
			500					505					510			
Gly	Pro	Gln	Gly	Thr	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Gln	Pro	Gly	Ala	Lys	Gly	
		515					520					525				
Glu	Pro	Gly	Glu	Phe	Tyr	Phe	Asp	Leu	Arg	Leu	Lys	Gly	Asp	Lys	Gly	
	530					535					540					
Asp	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Met	Pro	Gly	Arg	Ala	Gly	Ser	
545					550					555					560	
Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	His	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Ser	Pro	
				565				570						575		
Gly	Ser	Val	Gly	Leu	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Pro	Gly	Gly	Val	Gly	
			580					585					590			

ES 2 545 219 T3

Phe Pro Gly Ser Arg Gly Asp Thr Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Tyr
 595 600 605
 Gly Pro Ala Gly Pro Ile Gly Asp Lys Gly Gln Ala Gly Phe Pro Gly
 610 615 620
 Gly Pro Gly Ser Pro Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Lys
 625 630 635 640
 Ile Val Pro Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Glu Gly Leu Pro Gly Ser
 645 650 655
 Pro Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Asp Arg Gly Phe Pro Gly Thr Pro
 660 665 670
 Gly Arg Pro Gly Leu Pro Gly Glu Lys Gly Ala Val Gly Gln Pro Gly
 675 680 685
 Ile Gly Phe Pro Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Val Asp Gly Leu Pro
 690 695 700
 Gly Asp Met Gly Pro Pro Gly Thr Pro Gly Arg Pro Gly Phe Asn Gly
 705 710 715 720
 Leu Pro Gly Asn Pro Gly Val Gln Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Val
 725 730 735
 Gly Leu Pro Gly Leu Lys Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Ile Pro Gly
 740 745 750
 Thr Pro Gly Glu Lys Gly Ser Ile Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Glu
 755 760 765
 His Gly Ala Ile Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Ile Arg Gly Glu Pro
 770 775 780
 Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Ser Val Gly Ser Pro Gly Val Pro Gly
 785 790 795 800
 Ile Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Pro Pro Gly Gly Gln Gly Pro Pro
 805 810 815
 Gly Leu Ser Gly Pro Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Phe Pro Gly
 820 825 830
 Phe Pro Gly Leu Asp Met Pro Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Ala Gln
 835 840 845
 Gly Leu Pro Gly Ile Thr Gly Gln Ser Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly
 850 855 860
 Gln Gln Gly Ala Pro Gly Ile Pro Gly Phe Pro Gly Ser Lys Gly Glu
 865 870 875 880
 Met Gly Val Met Gly Thr Pro Gly Gln Pro Gly Ser Pro Gly Pro Val
 885 890 895
 Gly Ala Pro Gly Leu Pro Gly Glu Lys Gly Asp His Gly Phe Pro Gly
 900 905 910
 Ser Ser Gly Pro Arg Gly Asp Pro Gly Leu Lys Gly Asp Lys Gly Asp
 915 920 925
 Val Gly Leu Pro Gly Lys Pro Gly Ser Met Asp Lys Val Asp Met Gly

ES 2 545 219 T3

930						935						940					
Ser	Met	Lys	Gly	Gln	Lys	Gly	Asp	Gln	Gly	Glu	Lys	Gly	Gln	Ile	Gly		
945					950					955					960		
Pro	Ile	Gly	Glu	Lys	Gly	Ser	Arg	Gly	Asp	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Val		
				965					970					975			
Pro	Gly	Lys	Asp	Gly	Gln	Ala	Gly	Gln	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Lys		
			980					985					990				
Gly	Asp	Pro	Gly	Ile	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly		
		995					1000					1005					
Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Gly	Gly	Met	Gly	Leu	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly			
	1010					1015						1020					
Glu	Lys	Gly	Val	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Pro	Gly			
	1025					1030					1035						
Leu	Pro	Gly	Asp	Lys	Gly	Ala	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Gln	Ala	Gly			
	1040					1045					1050						
Pro	Pro	Gly	Ile	Gly	Ile	Pro	Gly	Leu	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp			
	1055					1060					1065						
Gln	Gly	Ile	Ala	Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu			
	1070					1075					1080						
Lys	Gly	Ser	Ile	Gly	Ile	Pro	Gly	Met	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Leu			
	1085					1090					1095						
Lys	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Leu			
	1100					1105					1110						
Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Lys	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Asp	Gly	Ile			
	1115					1120					1125						
Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly	Leu	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Pro			
	1130					1135					1140						
Thr	Gly	Pro	Ala	Gly	Gln	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Ser	Asp	Gly	Ile			
	1145					1150					1155						
Pro	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Arg			
	1160					1165					1170						
Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Ala	Lys	Gly	Asp	Lys	Gly	Ser	Lys			
	1175					1180					1185						
Gly	Glu	Val	Gly	Phe	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Gly	Ile	Pro			
	1190					1195					1200						
Gly	Ser	Lys	Gly	Glu	Gln	Gly	Phe	Met	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Gln			
	1205					1210					1215						
Gly	Gln	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	His	Ala	Thr	Glu	Gly			
	1220					1225					1230						
Pro	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Pro	Gln	Gly	Gln	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly			
	1235					1240					1245						
Leu	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ile	Asp	Gly			
	1250					1255					1260						

ES 2 545 219 T3

Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro Gly
1265 1270 1275

Val Pro Gly Pro Lys Gly Asp Pro Gly Phe Gln Gly Met Pro Gly
1280 1285 1290

Ile Gly Gly Ser Pro Gly Ile Thr Gly Ser Lys Gly Asp Met Gly
1295 1300 1305

Pro Pro Gly Val Pro Gly Phe Gln Gly Pro Lys Gly Leu Pro Gly
1310 1315 1320

Leu Gln Gly Ile Lys Gly Asp Gln Gly Asp Gln Gly Val Pro Gly
1325 1330 1335

Ala Lys Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Tyr Asp
1340 1345 1350

Ile Ile Lys Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Pro Glu Gly Pro Pro
1355 1360 1365

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Gln Gln
1370 1375 1380

Gly Val Thr Gly Leu Val Gly Ile Pro Gly Pro Pro Gly Ile Pro
1385 1390 1395

Gly Phe Asp Gly Ala Pro Gly Gln Lys Gly Glu Met Gly Pro Ala
1400 1405 1410

Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Pro Pro Gly Pro Asp
1415 1420 1425

Gly Leu Pro Gly Ser Met Gly Pro Pro Gly Thr Pro Ser Val Asp
1430 1435 1440

His Gly Phe Leu Val Thr Arg His Ser Gln Thr Ile Asp Asp Pro
1445 1450 1455

Gln Cys Pro Ser Gly Thr Lys Ile Leu Tyr His Gly Tyr Ser Leu
1460 1465 1470

Leu Tyr Val Gln Gly Asn Glu Arg Ala His Gly Gln Asp Leu Gly
1475 1480 1485

Thr Ala Gly Ser Cys Leu Arg Lys Phe Ser Thr Met Pro Phe Leu
1490 1495 1500

Phe Cys Asn Ile Asn Asn Val Cys Asn Phe Ala Ser Arg Asn Asp
1505 1510 1515

Tyr Ser Tyr Trp Leu Ser Thr Pro Glu Pro Met Pro Met Ser Met
1520 1525 1530

Ala Pro Ile Thr Gly Glu Asn Ile Arg Pro Phe Ile Ser Arg Cys
1535 1540 1545

Ala Val Cys Glu Ala Pro Ala Met Val Met Ala Val His Ser Gln
1550 1555 1560

Thr Ile Gln Ile Pro Pro Cys Pro Ser Gly Trp Ser Ser Leu Trp
1565 1570 1575

Ile Gly Tyr Ser Phe Val Met His Thr Ser Ala Gly Ala Glu Gly

ES 2 545 219 T3

1580 1585 1590
 Ser Gly Gln Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Cys Leu Glu Glu Phe
 1595 1600 1605
 Arg Ser Ala Pro Phe Ile Glu Cys His Gly Arg Gly Thr Cys Asn
 1610 1615 1620
 Tyr Tyr Ala Asn Ala Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Thr Ile Glu Arg
 1625 1630 1635
 Ser Glu Met Phe Lys Lys Pro Thr Pro Ser Thr Leu Lys Ala Gly
 1640 1645 1650
 Glu Leu Arg Thr His Val Ser Arg Cys Gln Val Cys Met Arg Arg
 1655 1660 1665
 Thr

<210> 46
 <211> 1466
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 46

Met Met Ser Phe Val Gln Lys Gly Ser Trp Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 His Pro Thr Ile Ile Leu Ala Gln Gln Glu Ala Val Glu Gly Gly Cys
 20 25 30
 Ser His Leu Gly Gln Ser Tyr Ala Asp Arg Asp Val Trp Lys Pro Glu
 35 40 45
 Pro Cys Gln Ile Cys Val Cys Asp Ser Gly Ser Val Leu Cys Asp Asp
 50 55 60
 Ile Ile Cys Asp Asp Gln Glu Leu Asp Cys Pro Asn Pro Glu Ile Pro
 65 70 75 80
 Phe Gly Glu Cys Cys Ala Val Cys Pro Gln Pro Pro Thr Ala Pro Thr
 85 90 95
 Arg Pro Pro Asn Gly Gln Gly Pro Gln Gly Pro Lys Gly Asp Pro Gly
 100 105 110
 Pro Pro Gly Ile Pro Gly Arg Asn Gly Asp Pro Gly Ile Pro Gly Gln
 115 120 125
 Pro Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Pro Pro Gly Ile Cys Glu Ser Cys
 130 135 140
 Pro Thr Gly Pro Gln Asn Tyr Ser Pro Gln Tyr Asp Ser Tyr Asp Val
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Val Ala Val Gly Gly Leu Ala Gly Tyr Pro Gly Pro Ala
 165 170 175
 Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Thr Ser Gly His Pro Gly
 180 185 190
 Ser Pro Gly Ser Pro Gly Tyr Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Gln

10

ES 2 545 219 T3

195					200					205					
Ala	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Ile	Gly	Pro	Ser
210					215					220					
Gly	Pro	Ala	Gly	Lys	Asp	Gly	Glu	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Arg	Pro	Gly
225				230						235					240
Glu	Arg	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Ile	Lys	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile
			245						250					255	
Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Met	Lys	Gly	His	Arg	Gly	Phe	Asp	Gly	Arg	Asn
			260					265					270		
Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Thr	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Lys	Gly	Glu	Asn	Gly
		275					280						285		
Leu	Pro	Gly	Glu	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Arg	Gly	Ala
290					295					300					
Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Arg	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Arg
305				310						315					320
Gly	Asn	Asp	Gly	Ala	Arg	Gly	Ser	Asp	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly
				325					330					335	
Pro	Pro	Gly	Thr	Ala	Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Ala	Lys	Gly	Glu
			340					345					350		
Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg
		355					360					365			
Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	His	Ala	Gly	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly
		370					375					380			
Pro	Pro	Gly	Ile	Asn	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Lys	Gly	Glu	Met	Gly	Pro
385				390						395					400
Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Met	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Pro
				405					410					415	
Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Gly
			420					425					430		
Glu	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	Ala	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Glu
		435					440					445			
Arg	Gly	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Lys	Gly	Glu	Asp
450							455					460			
Gly	Lys	Asp	Gly	Ser	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Ala	Asn	Gly	Leu	Pro	Gly
465				470							475				480
Ala	Ala	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Phe	Arg	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro
				485					490					495	
Asn	Gly	Ile	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro
			500					505					510		
Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Glu	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly
		515					520					525			
Val	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Met	Arg	Gly	Met	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly
530							535					540			

ES 2 545 219 T3

Pro Gly Ser Asp Gly Lys Pro Gly Pro Pro Gly Ser Gln Gly Glu Ser
 545 550 555 560
 Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Gln Pro Gly
 565 570 575
 Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Asn Asp Gly Ala Pro Gly Lys
 580 585 590
 Asn Gly Glu Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro
 595 600 605
 Gly Lys Asn Gly Glu Thr Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly
 610 615 620
 Pro Gly Gly Asp Lys Gly Asp Thr Gly Pro Pro Gly Glu Asn Gly Lys Pro
 625 630 635 640
 Gln Gly Leu Pro Gly Thr Gly Gly Pro Pro Gly Glu Asn Gly Lys Pro
 645 650 655
 Gly Glu Pro Gly Pro Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly
 660 665 670
 Gly Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Leu
 675 680 685
 Ala Gly Ala Pro Gly Leu Arg Gly Gly Ala Gly Pro Pro Gly Pro Glu
 690 695 700
 Gly Gly Lys Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Ala Gly
 705 710 715 720
 Thr Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Gly Leu Gly Ser
 725 730 735
 Pro Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Glu Pro Gly Gly Pro Gly Ala Asp
 740 745 750
 Gly Val Pro Gly Lys Asp Gly Pro Arg Gly Pro Thr Gly Pro Ile Gly
 755 760 765
 Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Pro Gly Asp Lys Gly Glu Gly Gly Ala
 770 775 780
 Pro Gly Leu Pro Gly Ile Ala Gly Pro Arg Gly Ser Pro Gly Glu Arg
 785 790 795 800
 Gly Glu Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Pro Gly Ala Pro Gly
 805 810 815
 Gln Asn Gly Glu Pro Gly Gly Lys Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu
 820 825 830
 Lys Gly Glu Gly Gly Pro Pro Gly Val Ala Gly Pro Pro Gly Gly Ser
 835 840 845
 Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Val Lys Gly Glu Arg Gly
 850 855 860
 Ser Pro Gly Gly Pro Gly Ala Ala Gly Phe Pro Gly Ala Arg Gly Leu
 865 870 875 880
 Pro Gly Pro Pro Gly Ser Asn Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser

ES 2 545 219 T3

				885						890						895
Gly	Ser	Pro	Gly	Lys	Asp	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Asn	Thr	Gly	
			900					905					910			
Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Ala	Gly	Gln	
		915					920					925				
Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Ser	Pro	Gly	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Pro	
	930					935					940					
Gly	Pro	Leu	Gly	Ile	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Gly	
945					950					955					960	
Pro	Pro	Gly	Met	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Val	
			965					970						975		
Lys	Gly	Glu	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ala	Asn	Gly	Leu	Ser	Gly	Glu	Arg	
			980					985					990			
Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Gly	
		995					1000						1005			
Glu	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	Asn	Pro	Gly	Ser	Asp	Gly	Leu	Pro	Gly		
	1010					1015					1020					
Arg	Asp	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Glu	Asn	Gly		
	1025					1030					1035					
Ser	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	His	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly		
	1040					1045					1050					
Pro	Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Lys	Ser	Gly	Asp	Arg	Gly	Glu	Ser	Gly		
	1055					1060					1065					
Pro	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Ser	Arg	Gly		
	1070					1075					1080					
Ala	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro	Arg	Gly	Asp	Lys	Gly	Glu	Thr	Gly		
	1085					1090					1095					
Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile	Lys	Gly	His	Arg	Gly	Phe	Pro	Gly		
	1100					1105					1110					
Asn	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Gln	Gln	Gly		
	1115					1120					1125					
Ala	Ile	Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro	Val	Gly		
	1130					1135					1140					
Pro	Ser	Gly	Pro	Pro	Gly	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	Gly	His	Pro	Gly		
	1145					1150					1155					
Pro	Ile	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Asn	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly		
	1160					1165					1170					
Ser	Glu	Gly	Ser	Pro	Gly	His	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly		
	1175					1180					1185					
Pro	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Cys	Cys	Gly	Gly	Val	Gly	Ala	Ala		
	1190					1195					1200					
Ala	Ile	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	Glu	Lys	Ala	Gly	Gly	Phe	Ala	Pro		
	1205					1210					1215					

ES 2 545 219 T3

Tyr Tyr Gly Asp Glu Pro Met Asp Phe Lys Ile Asn Thr Asp Glu
 1220 1225 1230
 Ile Met Thr Ser Leu Lys Ser Val Asn Gly Gln Ile Glu Ser Leu
 1235 1240 1245
 Ile Ser Pro Asp Gly Ser Arg Lys Asn Pro Ala Arg Asn Cys Arg
 1250 1255 1260
 Asp Leu Lys Phe Cys His Pro Glu Leu Lys Ser Gly Glu Tyr Trp
 1265 1270 1275
 Val Asp Pro Asn Gln Gly Cys Lys Leu Asp Ala Ile Lys Val Phe
 1280 1285 1290
 Cys Asn Met Glu Thr Gly Glu Thr Cys Ile Ser Ala Asn Pro Leu
 1295 1300 1305
 Asn Val Pro Arg Lys His Trp Trp Thr Asp Ser Ser Ala Glu Lys
 1310 1315 1320
 Lys His Val Trp Phe Gly Glu Ser Met Asp Gly Gly Phe Gln Phe
 1325 1330 1335
 Ser Tyr Gly Asn Pro Glu Leu Pro Glu Asp Val Leu Asp Val Gln
 1340 1345 1350
 Leu Ala Phe Leu Arg Leu Leu Ser Ser Arg Ala Ser Gln Asn Ile
 1355 1360 1365
 Thr Tyr His Cys Lys Asn Ser Ile Ala Tyr Met Asp Gln Ala Ser
 1370 1375 1380
 Gly Asn Val Lys Lys Ala Leu Lys Leu Met Gly Ser Asn Glu Gly
 1385 1390 1395
 Glu Phe Lys Ala Glu Gly Asn Ser Lys Phe Thr Tyr Thr Val Leu
 1400 1405 1410
 Glu Asp Gly Cys Thr Lys His Thr Gly Glu Trp Ser Lys Thr Val
 1415 1420 1425
 Phe Glu Tyr Arg Thr Arg Lys Ala Val Arg Leu Pro Ile Val Asp
 1430 1435 1440
 Ile Ala Pro Tyr Asp Ile Gly Gly Pro Asp Gln Glu Phe Gly Val
 1445 1450 1455
 Asp Val Gly Pro Val Cys Phe Leu
 1460 1465

DM_US:20506893_1
 FRAGMENTOS DE PÉPTIDO PARA INDUCIR LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS DE LA MATRIZ
 EXTRACELULAR
 11181.0034.NPUS00
 DNA Seq. ver. 3.4
 ??
 ??

??
?? 1

REIVINDICACIONES

1. Un tetrapéptido que comprende la SEC ID N^o: 14 para su uso como medicamento.
- 5 2. Un tetrapéptido que comprende la SEC ID N^o: 14 para su uso como medicamento en el tratamiento de una piel dañada o en el manteniendo de una piel sana.
3. Uso de un tetrapéptido que comprende la SEC ID N^o: 14 como producto cosmético.
- 10 4. El tetrapéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o el uso de un tetrapéptido de la reivindicación 3 en el que el tetrapéptido está amidado en el extremo carboxi.
- 15 5. Una composición farmacéutica para su uso como medicamento que comprende un tetrapéptido que comprende la SEC ID N^o: 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el tetrapéptido está presente en una concentración eficaz comprendida entre aproximadamente 0,01 µg/ml y aproximadamente 100 µg/ml, y más preferentemente comprendida de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición está en forma de un aerosol, una emulsión, un líquido, una loción, una crema, una pasta, una pomada o una espuma.
- 25 8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para su uso en un tratamiento para el cuidado de la piel.
- 30 9. Un método *in vitro* para estimular la producción de colágeno por una célula, comprendiendo el método exponer una célula a un tetrapéptido que comprende la SEC ID N^o: 14, induciendo de esta forma la producción de colágeno por parte de la célula.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el tetrapéptido está amidado en el extremo carboxi.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que la célula es un fibroblasto.
- 35 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho uso comprende el tratamiento de una piel dañada y dicha piel dañada es el resultado de envejecimiento, enfermedad, lesión, traumatismo o cirugía.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho cuidado de la piel se dirige a envejecimiento de la piel, tonificación, firmeza y ptosis.
- 40 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el tetrapéptido estimula la producción de colágeno cuando se aplica a la piel.

MGPRLSVWLL LLPAALLLHE EHSRAAAKGG CAGSGCGKCD CHGVKGQKGE
 RGLPGLQGI GFPGMQGP PGQPPGQKGD TGEPGLPGTK GTRGPPGASG
 YPGNPGLPGI PGQDGP GPPGPP GIPGCNGTKG ERGPLGPPGL PGFAGNPGPP
GLPGMKGD EILGHVPGML LKGERGFPGI PGTGP PPGLP GLQGPV GPPG
 FTGPPGPPGP PGPPGEKGM GLSFQGPKG KGDQGVSGPP GVPGQAQVQE
 KGDFATKGEK GQKGE PGFQG MPGVGEKGP GKPGPRGKPG KDGDKGEKGS
PGFPGEPGY GLIGRQGPQ EKGEAGPPGP PGIVIGTGPL GEKGERGYPG
 TPGPRGEPGP KGFPG LPQGP GPPGLFVPGQ AGAPGFPGER GEKDRGFP
 TSLPGPSGRD GLP PPGSPG PPGQPGYTNG IVECQPGPPG DQGP PGIPGQ
PGFIGEIGE GQKGESCLIC DIDGYRPPG PGQPPGEIGF PGQPGAKGDR
GLPGRDGVAG VPGQGP LPGL IGQPGAKGEP GEFYFDLRLK GDKGD PGFP
QPGMPGRAGS PGRDGH GLP GPKGSPG SVG LKGERGPPGG VGFP PSRGDT
GPPGPPGYGP AGPIGDKGQA GFP GPPGSPG LP GPKGEPGK IVPL PGPPGA
 EGLPGSPGFP GPOGDR GFP TPGR GLPGE KGAVGQPGIG FP PPGPKGV
 DGLPGDMGPP GTPGR PGFNG LPGN PGVQGO KGEP GVGLPG LKGL PLPGLPI
PGTPGEKGI GVP GVPEHG AIG PPGLQGI RGE PPGGLP GSV GSPGVP
IGPPGARGPP GGQ PPGLSG PPGI KGEKGF PGFP GLDMPG PKGD KGAQGL
PGITGQSLP GLP QOQAGP IP GFP PSKGE MGVM GTPGQP GSP GPV GAPG
LPGEKGDHGF PGSS GPRGDP GLKGD KGDVG LP GKPGSMDK VDM GSMKGQK
 GDOGEKQIG PI GEK SRGD PGT PGV PKD GO QO PGQPG PKGD PGISGT
PGAPGLPGK GSV GMGLPG TP GEK VPGI PG QO SPGLP GDK GAKGEK
QAGPPGIGIP GLR GEK DQG IAG F PS PGE KGEK SIGIP GMP GSP GLK
SPGS VGYPGS P GLP GEK GDK GLP GLD GIPG VKGE AGL P GT PG PT GP AGQK
GE PS DGIPG SAGE KGE PGL PGR G F PF PG AKGD KG SKGE VG FP LAG SP
GIP GS KGEQ FM GPP PGQ P GLP GSP CHA TE G PK GDR GP QO Q GLP GLP
GPM GPP GLPG ID GV KGD KGN PG W P G AP GVP GPK GD PF Q MP G IG GS PGI
TG SK GD M GPP GVP G FQ PKG LP GLQ IKGD QD Q GV PAK GLP PP PP
PYDI IK GE PG LP PE GPP GL KGL Q LP PK GO Q VT GLV IP PP PI PGF
DGAP GQ KGEM GP AG PT GPRG FP GPP PDGL PG SM GPP GT SVD HG FLVTR
 HSQTIDDPQC PSGTKILYHG YSLLYVOGNE RAHQDLGTA GSCLRKFTM
 PFLFCNINNV CNFASRDYS YWLSTPEPMP MSMAPITGEN IRPFISCAV
 CEAPAMVMAV HSQTIQIPPC PSGWSSLWIG YSFVMHTSAG AEGSGQALAS
 PGSCLEEFRS APFIECHGRG TCNYANAYS FWLATIERSE MFKKPTSTL
 KAGELRTHVS RCQVCMRRT

FIG. 1

MMSFVQKGSW LLLALLHPTI ILAQQEAVEG GCSHLGQSYA DRDVWKPEPC
QICVCDSSGSV LCDDIICDDQ ELDCPNPEIF FGECCAACPQ PPTAPTRPPN
GQGPQGPKGD PGPPGIPGRN GDPGIPGQPG SPGSPGPPGI CESCPTGFPQ
YSPQYDSYDV KSGVAVGGLA GYPGPAGPPG PPGPPGTSGH PGSPGSPGYQ
GPPGEPGQAG PSGPPGPPGA IGPSGPAGKD GESGRPGRPG ERGLPGPPGI
KGPAGIPGFP GMKGHRGFDG RNGEKGETGA PGLKGENGLP GENGAPGPMG
PRGAPGERGR PGLPGAAGAR GNDGARSDG QPGPPGPPGT AGFPSPGAK
GEVGPAGSPG SNGAPGQRGE PGQGHAGAQ GPPGPPGING SPGGKGEMGP
AGIPGAPGLM GARGPPGPAG ANGAPGLRGG AGEPPGKNGAK GEPPGRGERG
EAGIPGVPGA KGEDGKDGSP GEPGANGLPG AAGERGAPGF RGPAGPNGIP
GEKGPAGERG APGPAGPRGA AGEPPRDGVP GPGMRGMPG SPGGPGSDGK
PGPPGSQGES GRPGPPGPPG PRGQPGVMGF PGPKNDGAP GKNGERGGPG
GPGPQGPQPK NGETGPQGPP GPTGPGGDKG DTGPPGQQL QGLPGTGGPP
GENGKPGEPG PKGDAGAPGA PGGKGDAGAP GERGPPGLAG APGLRGGAGP
PGPEGGKGA GPPGPPGAAG TPGLQMPGE RGLGSPGPK GDKGEPGGPG
ADGVPKDGPRGPTGPIGPP GPAGQPGDKG EGGAPGLPGI AGPRGSPGER
GETGPPGPAG FPGAPQNGE PGKGERGAP GEKGEPPG VAGPPGSGP
AGPPGPQGVK GERGSPGGPG AAGFPARGL PGPPGSNGNP GPPGSPGSPG
KDGPPGPAGN TGAPGSPGVS GPKGDAGQPG EKGSPGAQGP PGAPPLGIA
GITGARGLAG PPGMPGPRGS PGQGVKGES GKPGANGLSG ERGPPGQQL
PGLAGTAGEP GRDGNPGSDG LPGRDGSPGG KDRGENGSP GAPGAPGHPG
PPGPVGPAGK SGDRGESGPA GPAGAPGPAG SRGAPGPQGP RGDKGETGER
GAAGIKGHRG FPGNPGAPGS PGPAGQGGAI GSPGPAGPRG PVGSPGPPGK
DGTSGHGPI GPPGPRGNRG ERGSEGSFGH PGQPGPPGPP GAPGPCCGV
GAAAIAGIGG EKAGGFAPYY GDEPMDFKIN TDEIMTSLKS VNGQIESLIS
PDGSRKNPAR NCRDLKFCHP ELKSGEYWVD PNQGCKLDAI KVFCNMETGE
TCISANPLNV PRKHWWTDSS AEKKHVWFGE SMDGGFQFSY GNPPELPELVL
DVQLAFLRLS SSRASQNTY HCKNSIAYMD QASGNVKKAL KLMGSNEGEF
KAEGNSKFTY TVLEDGCTKH TGEWSKTVFE YRTRKAVRLP IVDIAPYDIG
GPDQEFVVDV GPVCFL

FIG. 2

MGPRLSVWLL	LLPAALLLHE	EHSRAAAKGG	CAGSGCGKCD	CHGVKGQKGE
RGLPGLQGVI	GFPGMQGPEG	PQGPPGQKGD	TGEPGLPGTK	GTRGPPGASG
YPGNPGLPGI	PGQDGP <u>PGPP</u>	GIPGCNGTKG	ERGPLGPPGL	PGFAGN <u>PGPP</u>
GLPGMKGDPG	EILGHVPGML	LKGERGFPGI	PGT <u>PGPP</u> GLP	GLQGPFVGPPG
FTGP <u>PGPP</u> GP	<u>PGPP</u> GEKQOM	GLSFQGPKGD	KGDQGVSGPP	GVPGQAQVQE
KGDFATKGEK	GQKGEPGFQG	MPGVGEKGEF	GKPGPRGKPG	KDGDKGEKGS
PGFPGEPGYF	GLIGRQGPQG	EKGEAG <u>PGP</u>	<u>PGP</u> IVIGTGPL	GEKGERGYPG
TPGPRGEPGP	KGFPGLPGQP	GPPGLPVPGQ	AGAPGFPPGER	GEKGDORGFP
TSLPGPSGRD	<u>GLPGPP</u> SGSPG	PPGQPGYTNG	IVECQ <u>PGPP</u> G	DQGPPGIPGQ
PGFIGEIGEK	GQKGESCLIC	QIDGYRGPFG	PQGPPGEIGF	PGQPGAKGDR
GLPGRDGVAG	VPGPQGTPL	IGQPGAKGEP	GEFYFDLRLK	GDKGDFGFP
QPGMPGRAGS	PGRDGHPLP	GPKGSPGSPG	LKGERGPPGG	VGFPGSRGDT
<u>GPPGPP</u> GYGP	AGPIGDKQA	GFPGGPGSPG	LPGPKGEPGK	IVPL <u>PGPP</u> GA
EGLPGSPGFP	GPQGDGRGFP	TPGRPGLPGE	KGAVGQPGIG	<u>FGPP</u> GPKGV
DGLPGDMGPP	GTPGRPGFNG	LPGNPGVQQQ	KGEPGVGLPG	LKGLPGLPGI
PGTPGEKGS	GVPGVPGEHG	AIGPPGLQGI	RGE <u>PGPP</u> GLP	GSVGS PGVPG
IGPPGARGPP	GGQGPPGLSG	PPGIKGEKGF	PGFPGLDMPG	PKGDKGAQGL
PGITGQSGLP	GLPGQQGAPG	IPGFPGSKGE	MGVMGTPGQP	GSPGPFVAPG
LPGEKGDHGF	PGSSGPRGDP	GLKGDKGDVG	LPGKPGSMDK	VDMGSMKGQK
GDQGEKQIG	PIGEKGSRGD	PGTPGVPGKD	QAGQPGQPG	PKGDPGISGT
PGAPGLPGPK	GSVGGMGLPG	TPGEKGVPGI	PGPQGSPLP	GDKGAKGEKG
QAGPPGIGIP	GLRGEKGDQG	IAGFFGSPGE	KGEKGSIGIP	GMPGSPGLKG
SPGSVGYPGS	PGLPGEKGDK	GLPGLDGI PG	VKGEAGLPGT	PGPTGPAGQK
GEPGSDGIPG	SAGEKGEPL	PGRGFPGFPG	AKGDKGSKGE	VGFPGLAGSP
GIPGSKGEQG	FMGPPGPQGG	PGLPGSPGHA	TEGPKGDRGP	QQQPGLPGLP
GPMGPPGLPG	IDGVKGDKGN	PGWPGAPGVF	GPKGDPGFQG	MPGIGGSPGI
TGSKGDMGPP	GVPGFQGPKG	LPGLQGIKGD	QGDQGVPGAK	<u>GLPGPP</u> GPPG
PYDIIKGEPP	LPGPEGPPGL	KGLQGLPGPK	GQQGVTGLVG	<u>IPGPP</u> GIPGF
DGAPGQKGEM	GPAGPTGPRG	<u>FGPP</u> PGPDGL	PGSMGPPGTP	SVDHGFLVTR
HSQTIDDPQC	PSGTKILYHG	YSLLYVQONE	RAHGQDLGTA	GSCLRKFSTM
PFLFCNINNV	CNFASRNDYS	YWLSTPEPMP	MSMAPITGEN	IRPFISRCAV
CEAPAMVMAV	HSQTIQIPPC	PSGWSSLWIG	YSFVMHTSAG	AEGSQALAS
PGSCLEEFRS	APFIECHGRG	TCNYYANAYS	FWLATIERSE	MEKKPTPSTL
KAGELRTHVS	RCQVCMRRT			

FIG. 3