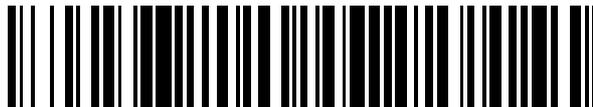


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 195**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2009** **E 09704223 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015** **EP 2245149**

54 Título: **Péptidos, composiciones, y sus usos**

30 Prioridad:

22.01.2008 US 22747 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2016

73 Titular/es:

**FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO
ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP (33.3%)**

Rua Pio XI, 1500 - Alto da Lapa

05468-901 São Paulo, BR;

BIOLAB SANUS FARMACÉUTICA LTDA (33.3%) y

CHUDZINSKI-TAVASSI, ANA MARISA (33.3%)

72 Inventor/es:

CHUDZINSKI-TAVASSI, ANA MARISA;

DE SOUZA VENTURA, JANAINA y

CARRIJO CARVALHO, LINDA CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 559 195 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos, composiciones, y sus usos

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/022.747, presentada el 22 de enero de 2008.

Antecedentes de la invención

- 10 La proteína Lopap es una proteasa del veneno de la oruga *Lonomia obliqua*, que tiene varias actividades biológicas, que incluyen el aumento de la viabilidad celular, la inducción de óxido nítrico, y las proteínas de la matriz extracelular (MEC) (documento WO2007/028223 y Ricci-Silva *et al.*, *Toxicol* 51:1017-1028 (2008)).

- 15 La matriz extracelular (MEC) es una entidad estructuralmente compleja que rodea y soporta las células que se encuentran en los sistemas vivos. En los tejidos de los mamíferos, la MEC se encuentra más comúnmente en los tejidos conectivos, tales como tendón, cartílago, hueso o dermis de la piel.

- 20 La MEC guía la generación del tejido y la reparación de heridas, y se atribuyen varias afecciones médicas a una MEC defectuosa (por ejemplo, escorbuto); MEC continuamente degradada (por ejemplo, enfermedad periodontal, úlceras no cicatrizantes); o MEC deteriorada o producción reducida de la MEC (p. ej., tejido envejecido). La importancia de la MEC ha impulsado el desarrollo de las terapias que suministran la MEC para su uso en la generación tisular, reparación de las heridas, tratamientos de enfermedades y de envejecimiento, y usos cosméticos.

Sumario de la invención

- 25 La presente invención presenta péptidos que comparten homología con una región de la proteína Lopap. Los péptidos son capaces de estimular la producción de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) en las células (p. ej., fibroblastos), y por consiguiente pueden utilizarse como un agente de generación del tejido y piel así como utilizarse como un cosmético.

- 30 En algunas realizaciones, el péptido estimula la producción de las proteínas de la MEC (p. ej., fibronectina, tenascina, colágeno, procolágeno, o una combinación de los mismos).

- 35 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un péptido aislado que es sustancialmente homólogo a la SEC. ID. N.º 1.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición cosmética que incluye un péptido descrito en el presente documento (p. ej., en combinación con uno o más excipientes cosméticamente aceptables).

- 40 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que incluye un péptido descrito en el presente documento (p. ej., en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables).

- 45 Aunque la invención se describe en lo sucesivo adicionalmente, los inventores observaron en este caso que la invención abarca péptidos aislados que consisten en o que comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica, al menos, un 70 % (p. ej., al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica) a la secuencia de aminoácidos YAIGYSCKDYK (SEC. ID. N.º 1). Tales péptidos pueden estimular asimismo la producción de una o más proteínas de la MEC en las células (p. ej., en las células de fibroblastos).

- 50 El péptido aislado puede consistir en o comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de referencia (p. ej., la SEC. ID. N.º 1) en virtud de la inclusión de una o más sustituciones, adiciones, o deleciones de aminoácidos. Por ejemplo, el péptido aislado puede diferir de un péptido representado por la SEC. ID. N.º 1 por sustituciones, adiciones, y/o deleciones de hasta seis aminoácidos y es capaz de estimular la producción de una o más proteínas de la MEC en las células de fibroblastos.

- 55 La invención abarca además composiciones farmacéuticas que incluyen un péptido descrito en el presente documento. La composición farmacéutica puede incluir un transportador farmacéuticamente aceptable (p. ej., un diluyente a base de agua) y puede estar en forma de un líquido o un ungüento. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir asimismo un agente de cicatrización. La composición farmacéutica puede formularse para su uso oral, intramuscular, intravenoso, subcutáneo, tópico, pulmonar, intranasal, bucal, rectal, sublingual, intradérmico, intraperitoneal o intratecal.

- 65 Los métodos de la invención abarcan métodos para reducir la muerte celular y/o la degeneración tisular en un sujeto administrando una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento a las células del sujeto (p. ej., un paciente humano). El sujeto puede haberse identificado cuando experimenta muerte celular y/o generación tisular causadas, por ejemplo, por enfermedad, traumatismo, o envejecimiento. Los métodos pueden incluir además la administración de un agente de cicatrización.

Los métodos de la invención abarcan métodos de cicatrización y/o regeneración tisular en un sujeto administrando una o más de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento al sujeto (p. ej., un paciente humano). Los métodos pueden incluir además una etapa de identificación de un paciente en necesidad del tratamiento y, opcionalmente, de administración adicional de un agente de cicatrización.

5

Se puede administrar cualquiera de las composiciones en una cantidad terapéuticamente eficaz.

También dentro del alcance de la presente invención es el uso de un péptido aislado como se describe en el presente documento en la preparación de un medicamento. El medicamento puede utilizarse para reducir la muerte celular y/o la degeneración tisular o para la cicatrización y/o regeneración tisular.

10

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra la influencia de cuatro péptidos en la viabilidad de las células ensayadas por MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio).

15

La Figura 2 es un gráfico lineal que muestra la influencia del péptido CNF011.05B en la viabilidad, ensayada por MTT, de las células endoteliales incubadas durante 120 horas en medio suplementado con SFB al 1 %.

La Figura 3 es un gráfico lineal que muestra la influencia del péptido CNF011.05D en la viabilidad, ensayada por MTT, de las células endoteliales incubadas durante 120 horas en medio suplementado con SFB al 1 %.

20

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra la influencia del péptido CNF011.05D más L-NAME en la viabilidad, ensayada por citometría de flujo, de los neutrófilos incubados en medio suplementado con SFB al 1 %.

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra la influencia del péptido CNF011.05D más L-NAME en la viabilidad, ensayada por citometría de flujo, de las células endoteliales primarias incubadas en medio suplementado con SFB al 1 %.

25

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra la influencia del péptido CNF011.05D más L-NAME en la producción de NO₂ por neutrófilos según se mide por el uso de la reacción de Griess.

La Figura 7 es un gráfico que ilustra el porcentaje de fibroblastos que producen fibronectina tras la incubación con el péptido CNF011.05D a 0,35 µg y 5 µg.

30

La Figura 8 es un gráfico que ilustra el porcentaje de fibroblastos que producen tenascina tras la incubación con el péptido CNF011.05D a 0,35 µg y 5 µg.

La Figura 9 es un gráfico que ilustra el porcentaje de fibroblastos que producen procolágeno tras la incubación con el péptido CNF011.05D a 0,35 µg y 5 µg.

35

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación presenta péptidos innovadores que son útiles para estimular la producción de proteínas de la MEC, en particular, fibronectina, tenascina, colágeno, y procolágeno. Se describen en el presente documento métodos para utilizar tales péptidos, métodos para fabricar tales péptidos, y kits y composiciones que contienen tales péptidos.

40

Los péptidos pueden utilizarse para generar proteínas de la matriz extracelular, en particular, fibronectina, tenascina, colágeno, y procolágeno. Los péptidos pueden utilizarse para una variedad de fines beneficiosos, tales como la generación del tejido enfermo, dañado, o perdido (p. ej., debido a heridas, traumatismos, procedimientos quirúrgicos o implantes tisulares, enfermedad ósea, defectos cosméticos, enfermedad del cartílago, enfermedad periodontal, foto o cronoenvejecimiento, heridas dérmicas causadas por trastornos circulatorios, diabetes, enfermedades infecciosas, y similares). Los péptidos pueden utilizarse para la prevención de la degeneración tisular (p. ej., estructura tisular deteriorada o pérdida tisular) debido a enfermedad tisular, traumatismo, o envejecimiento. Los péptidos pueden utilizarse para reparar heridas. Los péptidos pueden utilizarse para reparar heridas con cicatrización reducida (p. ej., cantidades reducidas del tejido cicatricial o del tejido conectivo fibroso denso tras la curación en comparación con el no tratamiento). Pueden utilizarse además en diferentes enfermedades que implican la disfunción de los componentes de colágeno o de MEC (p. ej., asma).

50

La descripción de los usos y las realizaciones de la invención son solo ilustrativas y no pretenden ser limitantes.

Definiciones

55

"Matriz extracelular" o MEC es una entidad estructuralmente compleja que rodea y soporta las células que se encuentran en los sistemas vivos. En los tejidos de los mamíferos, la MEC se encuentra más comúnmente en los tejidos conectivos, tales como tendón, cartílago, hueso y dermis de la piel. La MEC se produce y se mantiene por las células que la habitan.

60

"Proteínas de la matriz extracelular" o proteínas de la MEC son una o más de fibronectina, laminina, vitronectina, tenascina, entactina, trombospondina, elastina, gelatina, colágeno, fibrilina, merosina, ancorina, condronectina, proteína de enlace, sialoproteína ósea, osteocalcina, osteopontina, epinectina, hialuronectina, undulina, epiligrina, y kalinina. El término abarca las proteínas de la matriz extracelular actualmente desconocidas que pueden descubrirse

65

en el futuro, ya que su caracterización como una proteína de la matriz extracelular se determinará por un experto en la materia.

"Sustancialmente homólogo" se refiere a péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos que es idéntica, al menos, un 70 % (p. ej., 70 %, 75 %, 80 %, 82 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) a una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. N.º 1) cuando se compara o alinea para una correspondencia máxima a través del uso de algoritmos de comparación de secuencias, como por ejemplo, el algoritmo BLAST, (Altschul *et al.*, *JMB* 215:403-410 (1990)), el algoritmo de homología de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)), el algoritmo de homología de Needleman y Wunsch (*JMB* 48:443 (1970)), y el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (*PNAS EE. UU.* 85:2444 (1988)). Varios programas informáticos pueden implementar estos algoritmos (p. ej., GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA (Winconsin Genetics Computer Group, EE. UU.)).

Traumatismo

Los tejidos pueden soportar una variedad de lesiones, incluyendo traumatismo penetrante, traumatismo por quemaduras y traumatismo contundente. Todos estos traumatismos ponen en movimiento una secuencia ordenada de eventos que se implican en la respuesta de curación, caracterizada por el movimiento de las células especializadas en el sitio de la herida. Si se ha alterado el tejido, las células especializadas depositan proteínas de la matriz extracelular (p. ej., colágeno) en el sitio de la herida, que son necesarias para reparar el defecto y restaurar la estructura y la función anatómicas. Si se depositan muy pocas proteínas de la matriz extracelular, la herida es débil y puede abrirse.

La curación y la cascada de curación consisten en tres fases: una fase inflamatoria, una fase proliferativa, y una fase de remodelación. La fase inflamatoria se inicia por el colágeno expuesto durante la formación de heridas, que activa las proteínas de coagulación de la sangre. Poco después, las células inflamatorias migran a la herida. Las plaquetas, las primeras células de respuesta, liberan varias proteínas que incluyen fibronectina, que controlan el sangrado y quimioatraen otras células. Los neutrófilos, las segundas células de respuesta, matan las bacterias y eliminan los residuos extraños. Los leucocitos y los macrófagos, las células de respuesta posteriores, liberan varias proteínas, que incluyen colagenasas, que desbridan la herida, y las citoquinas, que estimulan la producción de colágeno y la angiogénesis mediante fibroblastos.

La fase proliferativa comprende la epitelización, la angiogénesis, la formación del tejido de granulación, y la deposición de colágeno. En la epitelización, si la membrana basal está intacta (como en las quemaduras de primer grado), las células epiteliales migran normalmente a la herida. Si se ha destruido (como en las quemaduras de segundo y tercer grado), las células epiteliales de la periferia vuelven a epitelizar la herida. En la angiogénesis, las células endoteliales migran a la herida y se forman los capilares. En la formación del tejido de granulación y la deposición de colágeno, los fibroblastos se diferencian y se depositan en la sustancia fundamental (p. ej., proteínas de la matriz extracelular (p. ej., procolágeno)) en la herida.

La fase de maduración se indica por la reticulación y la organización (p. ej., degradación enzimática específica de colágeno) de la nueva matriz extracelular.

Los tratamientos de las heridas se clasifican en dos categorías principales: (1) Primera intención: implica el cierre físico de la herida, normalmente mediante suturas, vendas, grapas, apósitos, y similares. El mecanismo principal de curación durante la primera intención es la deposición de la matriz del tejido conectivo, en el que se depositan colágeno, proteoglicanos y proteínas de fijación para formar una nueva matriz extracelular; y (2) Segunda intención: se deja la herida abierta, y se cura por contracción; la interacción entre las células y la matriz da lugar a un movimiento de células y tejidos al centro de la herida.

Ejemplos de tejidos que pueden regenerarse y repararse utilizando los péptidos descritos en el presente documento incluyen tejido nervioso, piel, tejido vascular, tejido cardíaco, tejido pericárdico, tejido muscular, tejido ocular, tejido periodontal, tejido conectivo tal como hueso, cartílago, tendón, y ligamento, tejido de órganos tales como tejido renal, y tejido hepático, tejido glandular tal como tejido pancreático, tejido mamario, y tejido adrenal, tejido urológico tal como tejido vesical y tejido del uréter, y tejido digestivo tal como tejidos intestinales.

Envejecimiento

El tejido envejecido, por ejemplo, piel, se indica por el deterioro de la MEC o la disminución de la producción de la MEC, y un deterioro de la fundación de la MEC. Estas propiedades dan lugar a una estructura tisular deteriorada. El tejido envejecido es más débil y menos elástico y flexible que la piel más joven. Se pierde resistencia, y la piel envejecida se somete a una ondulación (p. ej., arrugas).

Los tratamientos para las arrugas y (cicatrices) se han implicado principalmente en la inyección de material de relleno en la capa dérmica de la piel próxima al área de defecto o deseada del tejido. Ejemplos de materiales de relleno incluyen aceite mineral, grasa, colágeno bovino, y colágeno humano. Todos los materiales de relleno tienen

limitaciones bien documentadas. Por ejemplo, el colágeno humano es parcialmente eficaz en la reducción de arrugas, pero se requiere inyecciones repetidas dolorosas con grandes agujas para compensar la absorción de colágeno por el cuerpo.

5 Péptidos

La presente invención describe péptidos capaces de estimular la producción de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) (p. ej., fibronectina, tenascina, colágeno, y procolágeno), y por consiguiente pueden utilizarse como un agente que genera o facilita la generación de tejido o piel, y como un agente reparador de heridas.

10 Los péptidos de la presente invención incluyen péptidos que consisten en o incluyen la secuencia YAIGYSCKDYK (SEC. ID. N.º 1). Un péptido que consiste en la SEC. ID. N.º 1 se refiere en el presente documento como "el péptido CNF011.05D."

15 Se incluyen también péptidos que son sustancialmente homólogos a la SEC. ID. N.º 1; y péptidos codificados por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad a un péptido de la SEC. ID. N.º 1.

20 Como se utiliza en el presente documento, el término "se hibrida en condiciones de alta rigurosidad" describe las condiciones para la hibridación y el lavado. La guía para realizar las reacciones de hibridación puede hallarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad incluyen la hibridación en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C, o en condiciones sustancialmente similares.

25 El extremo N- y/o C-terminal del péptido puede modificarse para incrementar la estabilidad, p. ej., para reducir la degradación, p. ej., degradación proteolítica.

30 Los péptidos pueden modificarse para contener un epítipo marcador (p. ej., un marcador His (por ejemplo, 6x His o poli-His), Myc, HA, GST, MBP, VSV, tiorredoxina, beta-galactosidasa, FLAG, proteína fluorescente (p. ej., PVF), o similares) por ejemplo, para ayudar en la identificación o purificación del péptido. Un sitio de escisión (p. ej., un sitio de reconocimiento para el Factor Xa de la proteasa, enteroquinasa, trombina, proteasa TEV, proteasa PRESSION™, inteína 1 o inteína 2, o una peptidasa de señal, etc.) puede situarse opcionalmente entre el marcador y la secuencia peptídica de manera que el marcador puede escindirse a partir del péptido. Tales técnicas se conocen en la materia. Véase también *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Inc, Nueva York, NY.

35 Preparación de Péptidos

Los péptidos descritos en el presente documento pueden prepararse en un sistema biológico o sintetizarse químicamente.

40 Para producir los péptidos en un sistema biológico, el péptido puede producirse por tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido descrito en el presente documento (p. ej., los péptidos representados por la SEC. ID. N.º 1 pueden codificarse por las secuencias de ácido nucleico obtenidas a partir de la SEC. ID. N.º 7 o las secuencias relacionadas según el código genético) puede introducirse en un sistema biológico (p. ej., un sistema de expresión bacteriano, en levaduras, en plantas, en insectos, o en mamíferos) y se expresó utilizando técnicas convencionales. El péptido se purifica a continuación a partir del sistema biológico (p. ej., a partir de células o medio de cultivo) utilizando técnicas convencionales de purificación (p. ej., utilizando técnicas de separación en base a las propiedades físicas o químicas de las técnicas de purificación de péptidos o por afinidad). Tales técnicas se conocen en la materia. Véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology* 3ª ed., John Wiley y Sons, Inc, Nueva York, NY.

50 Los péptidos pueden sintetizarse químicamente, p. ej., utilizando síntesis en fase líquida o sólida. Tales técnicas son convencionales en la materia, véanse, por ejemplo, Atherton, E., Sheppard, R.C. *Solid Phase peptide synthesis: A practical approach*. IRL Press, Oxford, Inglaterra, 1989; Stewart J.M., Young, J.D. *Solid Phase peptide synthesis*, 2ª edición, Pierce Chemical Company, Rockford, 1984; Carpino (*J. Am. Chem. Soc.* 115:4397-4398 (1992)). Los péptidos se sintetizan al acoplar el grupo carboxilo o extremo C-terminal de un aminoácido al grupo amino o de otro extremo N-terminal.

60 Composiciones cosméticas

Un péptido de la divulgación puede formularse como una composición cosmética, p. ej., para la administración a un sujeto para tratar la piel. El péptido puede administrarse solo o en combinación con otro cosmético, ya sea en la misma composición o como una composición diferente.

65 Normalmente, una composición cosmética incluye un transportador cosméticamente aceptable. Como se utiliza en el presente documento, "transportador cosméticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los espesantes sólidos,

semisólidos y líquidos; excipientes, diluyentes; sustancias con propiedades de filtración UV; perfumes; bases cosméticas; y formulaciones cosméticas.

5 La composición cosmética puede encontrarse en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquida, sólida y semisólida, tales como soluciones líquidas, polvos, pomadas, geles, cremas, adhesivos, etc.

Composiciones farmacéuticas

10 Un péptido de la divulgación puede formularse como una composición farmacéutica, p. ej., para la administración a un sujeto para generar tejido o reparar la piel. El péptido puede administrarse solo o en combinación con otro preparado farmacológico, ya sea en la misma composición o como una composición diferente.

15 Normalmente, una composición farmacéutica incluye un transportador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, excipientes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, liposomas, micropartículas, microesferas, nanoesferas, y similares que son fisiológicamente compatibles.

20 La composición farmacéutica puede incluir una sal farmacéuticamente aceptable del péptido, p. ej., una sal de adición de ácido o una sal de adición de base (véase, p. ej., Berge *et al. J. Pharm. Sci.* 66:1-19 (1977)).

25 La formulación farmacéutica es una técnica bien establecida, y se describe con más detalle, p. ej., en Gennaro (ed.), Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª ed., Lippincott, Williams y Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª Ed, Editorial Lippincott Williams y Wilkins (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association*, 3ª ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

30 En una realización, los excipientes incluyen solución salina, cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico heptahidratado, fosfato de sodio monobásico, y estabilizadores.

35 Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquida, sólida y semisólida, tales como soluciones líquidas (p. ej., soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, geles o ungüentos. La forma preferente puede depender del modo previsto de administración y aplicación terapéutica.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración tópica, p. ej., en un sitio de una herida. La administración tópica incluye, por ejemplo, la administración epicutánea, intranasal, por inhalación, y vaginal. La composición puede administrarse a la piel (p. ej., para una quemadura, ampolla o corte), labios, encías, dientes, cavidad oral, ojos, oídos, lecho ungueal, o garganta, etc., p. ej., en el sitio de una herida. La composición para la administración tópica puede encontrarse en forma de crema, gel, loción o ungüento, etc.

45 En ciertas realizaciones, el transportador farmacéuticamente aceptable puede proteger el péptido contra la rápida liberación o degradación (p. ej., para preparar una formulación de liberación controlada), que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Se patentan o se conocen generalmente muchos métodos para la preparación de tales formulaciones, p. ej., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

50 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede prepararse con un agente cicatrizante. Como se utiliza en el presente documento, "agente cicatrizante" incluye cualquiera y todos los agentes que favorecen la reparación de heridas, la generación tisular, o previenen o inhiben la degeneración tisular. Ejemplos de agentes cicatrizantes incluyen agentes que estimulan la producción de las proteínas de la matriz extracelular (MEC), los elementos estructurales de la MEC (p. ej., proteínas, glucoproteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos), los factores de crecimiento y los factores de diferenciación (véanse Adams *et al.*, *Development* 117:1183-1198 (1993) y Kreis *et al.* (eds.), *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Oxford University Press (1993) (en adelante "Kreis *et al.*"), y los materiales de andamios (p. ej., la solicitud de Estados Unidos n.º 20030211793). Las enseñanzas de Adams *et al.* y Kreis *et al.* describen factores de crecimiento y componentes de la MEC que regulan la diferenciación y el desarrollo.

60 Ejemplos de factores de crecimiento y factores de diferenciación incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de insulina, factor de crecimiento nervioso, factor estimulante de las células mastoides, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante d, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de dispersión, factor de crecimiento de hepatocitos y factor de crecimiento celular de Schwann.

65

Cuando el péptido se utiliza en combinación con un agente cicatrizante, los dos agentes pueden formularse por separado o juntos.

Administración

5 El péptido puede administrarse a un sujeto, p. ej., un sujeto humano, mediante una variedad de métodos. Para muchas aplicaciones, la vía de administración es parenteral, p. ej., entre: inyección intravenosa o infusión (IV), inyección intraarterial, inyección subcutánea (SC), por vía intraperitoneal (IP), inyección intracardíaca, infusión intraósea, inyección intradérmica, infusión o inyección intraperitoneal, inyección intravítrea, inyección intramuscular, inyección intratecal, inyección intraarticular, o administración epidural. En algunas realizaciones preferentes, el péptido se administra por vía enteral (p. ej., por vía oral). El péptido puede administrarse localmente, p. ej., por vía tópica (p. ej., por vía epicutánea, intranasal, por inhalación, vaginal, etc.) (p. ej., en una crema, gel, loción o unguento), p. ej., a la piel o labios o encías o cavidad oral o garganta, p. ej., en el sitio de una herida. En algunos casos, la administración puede realizarse directamente en el sitio que requiere la matriz extracelular.

15 El péptido puede administrarse local o sistémicamente.

El péptido puede administrarse p. ej., mediante inyección, infusión, difusión, implantes, aplicación tópica, o administración oral.

20 El péptido puede administrarse como una dosis fija, o en una dosis de $\mu\text{g}/\text{kg}$ o mg/kg .

La dosis también puede seleccionarse para reducir o evitar la producción de anticuerpos contra el péptido.

25 La vía y/o modo de administración del péptido también puede adaptarse para el caso individual, p. ej., mediante la evaluación o la monitorización del sujeto, p. ej., utilizando electromiografía, estudios de conducción nerviosa, estudios de potenciales evocados, imágenes por resonancia magnética, examen neurológico, rayos X, y/o parámetros convencionales asociados con el trastorno particular, p. ej., criterios para evaluar el dolor de espalda.

30 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada, p. ej., una respuesta terapéutica o un efecto terapéutico combinatorio. En general, cualquier combinación de dosis (ya sea por separado o coformulada) del péptido (y, opcionalmente, un segundo agente, p. ej., como se describe en el presente documento) puede utilizarse con el fin de proporcionar un sujeto con el péptido en cantidades biodisponibles. Por ejemplo, pueden administrarse dosis en el intervalo de $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $10 \text{mg}/\text{kg}$, $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $1 \text{mg}/\text{kg}$, $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $500 \mu\text{g}/\text{kg}$, $0,1$ - $100 \text{mg}/\text{kg}$, $0,5$ - $100 \text{mg}/\text{kg}$, $1 \text{mg}/\text{kg}$ - $100 \text{mg}/\text{kg}$, $0,5$ - $20 \text{mg}/\text{kg}$, o 1 - $10 \text{mg}/\text{kg}$. Se pueden utilizar asimismo otras dosis.

35 La forma de dosificación unitaria o "dosis fija" como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido y, opcionalmente, en asociación con el otro agente. Pueden administrarse dosificaciones únicas o múltiples. Alternativamente, o además, el péptido puede administrarse mediante infusión continua.

45 El péptido puede administrarse, p. ej., una o dos veces al día, o aproximadamente de una a cuatro veces por semana, o preferentemente semanalmente, quincenalmente, o mensualmente, p. ej., entre aproximadamente 1 a 10 semanas, o durante más tiempo si es necesario para un sujeto sometido a un periodo de tratamiento largo. El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requerido para tratar eficazmente un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a la gravedad de la enfermedad o trastorno, formulación, vía de administración, tratamientos previos, salud general y/o edad del sujeto, otras enfermedades presentes, y otros tratamientos a los que se ha sometido un sujeto. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. Los modelos animales también pueden utilizarse para determinar una dosis útil, p. ej., una dosis inicial o un régimen. Por ejemplo, los estudios en animales pueden utilizarse para medir la duración de la matriz extracelular favorecida por los péptidos.

50 Si un sujeto se encuentra en riesgo de degeneración tisular (p. ej., envejecimiento de la estructura tisular deteriorada o pérdida de tejido) debido a daños en los tejidos, enfermedad o traumatismo, el péptido puede administrarse antes o durante el evento que puede causar la degeneración tisular, p. ej., como una medida preventiva. La duración de dicho tratamiento preventivo puede ser una única dosificación del péptido o el tratamiento puede continuar (p. ej., múltiples dosificaciones) desde un tiempo antes del evento, durante el evento, y/o después del evento, p. ej., para minimizar la pérdida en el sujeto. Por ejemplo, un sujeto en riesgo de pérdida de tejido puede tratarse con el péptido durante horas o días antes del evento que puede causar la degeneración tisular, a fin de prevenir la pérdida de tejido de producir o disminuir la cantidad de pérdida de tejido experimentada.

65

Una composición farmacéutica puede incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un péptido descrito en el presente documento. Tales cantidades eficaces pueden determinarse basándose en el efecto del agente administrado (p. ej., péptido), o el efecto combinatorio de los agentes si se utiliza más de un agente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente también puede variar según factores tales como el tipo de dolor, estadio de la enfermedad, edad, sexo y peso del sujeto, y la capacidad del agente para provocar una respuesta deseada en el sujeto, p. ej., reparación de heridas. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición se sobrepasa en peso por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Como se utiliza en el presente documento, el "sujeto" puede ser cualquier organismo en necesidad de reparación, reconstrucción o sustitución de una matriz extracelular para generar o reparar el tejido que se ha dañado, enfermado, o perdido, p. ej., un mamífero, p. ej., humano, animales de granja (p. ej., caballo, burro, mula, ganado, vaca, toro, oveja, cerdo, etc.), mascotas domésticas (p. ej., perro, gato, rata, ratón, conejo, hámster, cobaya, hurón, etc.), o animales de zoológico (p. ej., jirafa, león, tigre, oso, cebra, mono, gorila, ballena, delfín, etc.).

Uso in vitro

Los péptidos pueden utilizarse *in vitro*, por ejemplo, como sistemas modelo para investigar, o para fabricar prótesis o implantes para reemplazar tejidos dañados o enfermos, o para proporcionar andamios que, cuando se ocupan por las células, p. ej., células huésped, se remodelan para convertirse en tejidos funcionales.

Dispositivos y kits

Las composiciones farmacéuticas que incluyen el péptido pueden administrarse con un dispositivo médico. El dispositivo puede incluir, p. ej., una o más carcasas para el almacenamiento de preparaciones farmacéuticas que incluyen el péptido, y puede configurarse para administrar una o más dosis unitarias del péptido. El dispositivo puede configurarse, además, para administrar un segundo agente, p. ej., un agente de generación tisular o de reparación de heridas descrito en el presente documento, ya sea como una única composición farmacéutica que también incluye el péptido o como dos composiciones farmacéuticas distintas.

Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja (p. ej., patentes de Estados Unidos 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556); por implante, módulo o bomba (p. ej., patentes de Estados Unidos 4.487.603; 4.447.233; 4.447.224); por dispositivos de administración en la piel (p. ej., patente de Estados Unidos n.º 4.486.194), y por sistemas osmóticos de administración de fármacos (p. ej., patente de Estados Unidos 4.439.196). También se conocen muchos otros dispositivos, implantes, sistemas de administración y módulos.

Se puede proporcionar un péptido en un kit. En una realización, el kit incluye (a) un recipiente que contiene una composición que incluye un péptido descrito en el presente documento, y opcionalmente (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, de marketing u otro material que se refiere a los métodos descritos en el presente documento y/o al uso del péptido para beneficio terapéutico.

En una realización, el kit incluye también un segundo agente para la generación tisular o la reparación de heridas, p. ej., otro agente descrito en el presente documento. Por ejemplo, el kit incluye un primer recipiente que contiene una composición que incluye el péptido, un segundo recipiente que incluye el segundo agente, y opcionalmente el material informativo.

Además del péptido, la composición en el kit puede incluir otros ingredientes, tales como un disolvente o tampón, un estabilizador, o un conservante. El péptido puede proporcionarse en cualquier forma, por ejemplo, forma líquida, seca o liofilizada, preferentemente de manera sustancial pura y/o estéril. Cuando los agentes se proporcionan como una forma seca, la reconstitución se realiza generalmente mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, p. ej., agua estéril o tampón, puede proporcionarse opcionalmente en el kit.

El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para la administración de la composición, p. ej., una jeringa u otro dispositivo de administración adecuado. El dispositivo puede proporcionarse precargado con uno o ambos de los agentes o puede estar vacío, pero apto para la carga.

Ejemplos

Los ejemplos ilustrativos de la presente invención utilizaron los péptidos sintéticos presentados en la Tabla 1, y se sintetizaron por ORPEGEN Pharma (Alemania).

TABLA 1

Péptido	Masa molecular	Secuencia	
CNF011.05A	2452,8	VSKFDMNAYQGTWYEIKKFP	SEC. ID. N.º 2

Péptido	Masa molecular	Secuencia	
CNF011.05B	2165,4	APLWILSTDYDNYAIGYSC	SEC. ID. N.º 3
CNF011.05C	2305,7	IWILSRKTLNESSKSTVNK	SEC. ID. N.º 4
CNF011.05D	1310,5	YAIGYSCKDYK	SEC. ID. N.º 1

EJEMPLO 1

EFFECTO EN LA VIABILIDAD CELULAR

5 Los ensayos de viabilidad celular (% de viabilidad) se realizaron utilizando condiciones de suero reducidas y el ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazolio) (Mosmann, 1983). Los resultados se ilustran en las Figuras 1 a 3.

10 La Figura 1 ilustra el efecto de los péptidos (5 µg/ml) en la viabilidad celular (% de viabilidad) de las células endoteliales (HUVEC) cuando se incubaron juntas durante 48 horas en RPMI 1640 con SFB al 1 %. El control tiene células incubadas en RPMI 1640 con SFB al 1 % (sin péptido).

15 La Figura 2 ilustra el efecto de diferentes concentraciones de CNF011.05B en la viabilidad celular (% de viabilidad) de las células endoteliales cuando se incubaron juntas durante 120 horas en RPMI suplementado con SFB al 1 %.

La Figura 3 ilustra el efecto de diferentes concentraciones de CNF011.05D en la viabilidad celular (% de viabilidad) de las células endoteliales cuando se incubaron juntas durante 48 horas en RPMI suplementado con SFB al 1 %.

20 Los resultados demuestran que los péptidos CNF011.05B y CNF011.05D (5 µg/ml) aumentan la viabilidad celular en condiciones apoptóticas inducidas por la carencia de suero fetal bovino (SFB), probablemente a través de un mecanismo para inhibir la muerte celular y apoptosis programadas.

25 El aumento de la viabilidad celular soporta el uso de CNF011.05B y CNF011.05D en la reparación de heridas, para tal aumento se puede incrementar (1) la viabilidad celular en las heridas y (2) evitar la pérdida de la matriz en las heridas (Gilbert *et. al.*, *Tissue Eng.*, 2 de enero de 2009., presentación electrónica en PubMed). Dicho aumento en la viabilidad celular también permite el uso de estos péptidos en la generación tisular y la prevención de la degeneración tisular.

EJEMPLO 2

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (ON)

35 Los neutrófilos o células endoteliales primarias cultivadas de ratas Wistar se cultivaron en medio de suero reducido (1 %) en presencia de CNF011.05D (3,0 µg/ml) y/o L-NAME 1 M, un inhibidor de la ON sintasa (y por consiguiente, un inhibidor de ON y el metabolito resultante de la producción de NO₂). Tras 24 horas, la viabilidad celular se midió utilizando el análisis de citometría de flujo con anexina V FITC (1:500) y yoduro de propidio (10 µl de 50 mg/ml). La viabilidad de tanto los neutrófilos (Figura 4) como las células endoteliales primarias (Figura 5) se incrementó solo con el péptido CNF011.05D y este aumento se redujo en presencia de L-NAME.

MEDICIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO (ON)

45 Los neutrófilos se cultivaron durante 18 horas con CNF011.05D (1,5 µg/ml), y la producción del metabolito de ON NO₂ secretado en el cultivo se evaluó mediante el uso de la reacción de Griess, y la medición de la absorbancia a 550 nm. La Figura 9 demuestra que el péptido CNF011.05D aumenta la producción de NO₂, y por consiguiente, la producción de ON en las células tratadas.

50 La producción inducida de ON soporta el uso de CNF011.05D en la reparación de heridas, para (1) las células en las heridas producen ON durante la fase proliferativa de curación y la cascada de curación (Witte y Barbul, *Am. J. Surg.* 183:406-12 (2002)); y (2) ON en las heridas aumenta la curación, por ejemplo, aumenta la angiogénesis en las heridas, y recluta células inflamatorias en las heridas que son importantes para la curación (Zhu *et. al.*, *J. Burn Care Res.* 29:804-14 (2008)).

EJEMPLO 3

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

60 Se adquirieron fibroblastos humanos a partir de fragmentos de piel del lóbulo de la oreja (0,5 x 0,5 cm) de 5 donantes femeninas afro-brasileñas normales, con edades comprendidas entre 10 y 40 años, respectivamente llamadas 2/05, 3/05, 4/05, 6/05 y 8/05. Las donantes se sometieron a biopsias por escisión en un entorno quirúrgico tras el consentimiento libre y voluntario.

Las células del 6° subcultivo se colocaron en placas de cultivo estériles y se incubaron con CNF011.05D a concentraciones de 0,35 µg y 5 µg en un medio de cultivo durante 4 días. El grupo de control consistía en fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, al que se añadió una solución salina (un disolvente de CNF011.05D) en lugar de CNF011.05D.

5 Se realizó inmunofluorescencia indirecta mediante (1) AcMo anti-fibronectina (celular) o AcMo anti-tenascina humana (Sigma-EE. UU.); y (2) Alexa Fluor 488 (Molecular Probes-EE. UU.).

10 PRODUCCIÓN DE FIBRONECTINA

Las muestras analizadas son FBN-CN (células tratadas con solución salina), FBN-0.35 (células tratadas con CNF011.05D a 0,35 µg), y FBN-5 µg (células tratadas con CNF011.05D a 5 µg).

15 Los resultados de inmunofluorescencia indirecta para la producción de fibronectina se ilustran en la Figura 7, y demuestran una mejora significativa ($p < 0,001$) en la producción de fibronectina mediante fibroblastos cultivados con CNF011.05D a 0,35 µg.

20 PRODUCCIÓN DE TENASCINA

Las muestras ensayadas son CN (células tratadas con solución salina), TN-0.35 (células tratadas con CNF011.05D a 0,35 µg), y TN-5 µg (células tratadas con CNF011.05D a 5 µg).

25 Los resultados de inmunofluorescencia indirecta para la producción de tenascina en la Figura 8 mostraron una diferencia significativa ($p < 0,001$) en la producción de tenascina mediante fibroblastos cultivados con CNF011.05D a 0,35 µg.

30 PRODUCCIÓN DE PROCOLÁGENO

Las muestras ensayadas son % procol/control (células tratadas con solución salina), % procol/0.35 (células tratadas con CNF011.05D a 0,35 µg), y % procol/5 µg (células tratadas con CNF011.05D a 5 µg).

35 Los resultados de inmunofluorescencia indirecta para la producción de procolágeno en la Figura 9 mostraron una diferencia significativa ($p < 0,001$) en la producción de procolágeno mediante fibroblastos cultivados con CNF011.05D a 0,35 µg.

EJEMPLO 4

40 PRODUCCIÓN DE COLÁGENO EN LA DERMIS

Se examinaron los niveles de colágeno tras diferentes administraciones de CNF011.05D: una dosis única subcutánea, dos dosis subcutáneas, y cuatro dosis subcutáneas.

TABLA 2

Porcentaje de colágeno en la dermis de los animales tras la dosis única subcutánea de CNF011.05D (0,30 µg) (grupos AE y BE) o solución salina (grupos AD y BD). Los valores se obtuvieron a las 1, 2, o 12 semanas tras la dosis final.								
Piel de control		Colágeno (%)	Evaluación tras la dosis	Número de tratamientos	Dosis única	Piel tratada		Colágeno (%)
Animal	Piel					Animal	Piel	
G2S1AD	2AD	27,83	1 semana	1	0,30	G2S1AE	2AE	41,20
G2S1BD	2BD	38,07	1 semana	1	0,30	G2S1BE	2BE	57,15
G2S2AD	8AD	32,78	2 semanas	1	0,30	G2S2AE	8BE	43,78
G2S2BD	8BD	33,99	2 semanas	1	0,30	G2S2BE	8AE	39,20
G2S5AD	19AD	28,24	12 semanas	1	0,30	G2S5AE	19AE	29,57
G2S5BD	19BD	21,68	12 semanas	1	0,30	G2S5BE	19BE	27,22

45

TABLA 3

Porcentaje de colágeno en la dermis de los animales tras dos dosis subcutáneas (0,30 µg) (grupos AE y BE) o solución salina (grupos AD y BD). Las dosis se administraron con una semana de diferencia, y los valores se obtuvieron 1 semana o 12 semanas tras la dosis final.								
Piel de control		Colágeno (%)	Evaluación tras la dosis	Número de tratamientos	Dosis total	Piel tratada		Colágeno (%)
Animal	Piel					Animal	Piel	
G6S2AD	9AD	24,27	2 semanas	2	0,60	G6S2AE	9AE	44,19
G6S2BD	9BD	30,00	2 semanas	2	0,60	G6S2BE	9BE	37,91
G6S6AD	21AD	24,71	12 semanas	2	0,60	G6S6AE	21AE	39,23
G6S6BD	21BD	29,12	12 semanas	2	0,60	G6S6BE	21BE	47,33

TABLA 4

Porcentaje de colágeno en la dermis de los animales tras cuatro dosis subcutáneas (0,30 µg) (grupos AE y BE) o solución salina (grupos AD y BD). Las dosis consecutivas se administraron una semana, y los valores se obtuvieron 4 semanas tras la dosis final.								
Piel de control		Colágeno (%)	Evaluación tras la dosis	Número de tratamientos	Total	Piel tratada		Colágeno (%)
Animal	Piel					Animal	Piel	
G6S4AD	13AD	25,23	4 semanas	4	1,20	G6S4AE	13AE	37,60
G6S4BD	13BD	24,42	4 semanas	4	1,20	G6S4BE	13BE	34,94

EJEMPLO 5

CICATRIZACIÓN EN RATAS

El tamaño y el aspecto microscópico de la perforación en las heridas se evaluaron en ratas tras una única dosis de CNF011.05D. Las ratas eran ratas Wistar de 6 a 8 semanas de vida, que se anestesiaron y operaron en la parte dorsal de la espalda. Tras el recorte de pelo y el lavado de esterilización, se hicieron heridas en cada rata utilizando una biopsia por punción de 6 mm. Después de realizar la herida y secarla con una gasa estéril, las heridas se sometieron a (1) vendaje (tratamiento convencional) o (2) aplicación de CNF011.05D (235 nm en solución salina), seguido de vendaje. Los veterinarios evaluaron y documentaron las heridas evaluadas en los días 3, 7, 14 y 21, acerca de si la herida cicatrizaba normalmente al día posterior a la herida, y el tamaño de la herida en cm².

TABLA 5

El tamaño de la perforación en las heridas se muestra en la Tabla 5 en diferentes momentos tras la cirugía de 8 ratas por momento. CNF011.05D demuestra una mayor velocidad en reducir el tamaño de la herida.				
Muestra	Tamaño día 3	Tamaño día 7	Tamaño día 14	Tamaño día 21
Convencional	0,229 cm ²	0,093 cm ²	0,069 cm ²	Cicatriz
CNF011.05D	0,200 cm ²	0,084 cm ²	0,053 cm ²	Cicatriz**

Los momentos a los 21 días mostraron heridas cerradas y una cicatriz. Las heridas tratadas con CNF011.05D tuvieron cicatrices de tamaño y color reducidos en comparación con las heridas tratadas con el tratamiento convencional (control negativo).

EJEMPLO 6

CICATRIZACIÓN EN CERDOS

Los niveles de la formación del tejido de granulación - un marcador de la fase proliferativa de la curación (cascada) - se evaluaron en la perforación de las heridas tras las administraciones diarias de CNF011.05D o control positivo (gel de becaplermina al 0,01 %). Los animales heridos eran cerdos cruzados domésticos Yorkshire de 20 semanas de vida, que se anestesiaron y operaron en la parte dorsal de la espalda. Tras el recorte de pelo y el lavado de esterilización, se hicieron 8 heridas de grosor completo en cada cerdo utilizando una biopsia por punción de 8 mm.

Después de realizar la herida y secarla con una gasa estéril, las heridas se sometieron a una aplicación con diferentes tratamientos (véanse la Tabla 5 y 6) seguido de vendaje. La monitorización postoperatoria a largo plazo incluyó la inspección diaria de los sitios quirúrgicos durante 14 días. La inspección diaria incluyó la limpieza de las heridas, la reaplicación de los mismos tratamientos - tratamiento convencional o control positivo o CNF011.05D (1x) o CNF011.05D (100x) - seguido de la reaplicación de un vendaje. Los veterinarios evaluaron y documentaron las

heridas evaluadas en los días 1, 4, 7, 10 y 14 acerca de si la herida cicatrizaba normalmente al día posterior a la herida, y la primera aparición de tejido de granulación que llena la herida por completo.

TABLA 6

5

Después de realizar la herida y secarla con una gasa estéril, (1) se vendaron cuatro heridas (tratamiento convencional); (2) cuatro heridas se sometieron a la aplicación del control positivo seguido de vendaje; (3) seis heridas se sometieron a la aplicación de CNF011.05D (1x) (1 ml a 1,57 µg/ml en solución salina), seguido de vendaje; y (4) seis heridas se sometieron a la aplicación de CNF011.05D (1 ml a 157 µg/ml en solución salina) (100X), seguido de vendaje.

Las heridas con la primera aparición de tejido de granulación que llena la herida por completo se indican en la fila Sí de la Tabla 6. CNF011.05D (1x) y CNF011.05D (100x) demuestran una mayor velocidad de llenado completo que el tratamiento convencional (control negativo).

Muestra	Llenado del tejido de granulación	Día 1	Día 5	Día 7	Día 10	Día 14
Convencional	Sí	-	1	2	3	3
	No	4	3	2	1	1
Positivo	Sí	-	2	3	3	4
	No	4	1	1	1	-
CNF011.05D 1x	Sí	-	3	4	6	6
	No	6	3	2	-	-
CNF011.05D 100x	Sí	-	-	1	6	6
	No	6	6	5	-	-

TABLA 7

Después de realizar la herida y secarla con una gasa estéril, (1) dos heridas se sometieron a la aplicación de CNF011.05D (1x) (1 ml de ungüento a 1,57 µg/ml en Hidroxietilcelulosa/Glicerina (20 %/80 %), seguido de vendaje; y (2) dos heridas se sometieron a la aplicación de CNF011.05D (100x) (1 ml de ungüento a 157 µg/ml en Hidroxietilcelulosa/Glicerina (20 %/80 %), seguido de vendaje.

Las heridas con la primera aparición de tejido de granulación que llena la herida por completo se indican en la fila Sí de la Tabla 7. CNF011.05D en ungüento demuestra una mayor velocidad de llenado completo que el tratamiento convencional (control negativo) o CNF011.05D en solución salina (Tabla 6).

Muestra	Llenado del tejido de granulación	Día 1	Día 5	Día 7	Día 10	Día 14
CNF011.05D 1x	Sí	-	2	2	2	2
	No	2	-	-	-	-
CNF011.05D 100x	Sí	-	2	2	2	2
	No	2	-	-	-	-

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos que es idéntica, al menos, un 70 % a la secuencia de aminoácidos: YAIGYSCKDYK (SEC. ID. N.º 1); en el que el péptido es capaz de estimular la producción de una o más proteínas de la matriz extracelular en las células de fibroblastos.
- 10 2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos YAIGYSCKDYK (SEC. ID. N.º 1).
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de la reivindicación 1.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que la composición se formula para su uso tópico o su uso intradérmico.
- 15 5. El péptido de la reivindicación 1 para reducir la muerte celular en un sujeto.
6. El péptido de la reivindicación 5, en el que la muerte celular es causada por una enfermedad, un traumatismo o envejecimiento.
- 20 7. El péptido de la reivindicación 1 para reducir la degeneración tisular en un sujeto.
8. El péptido de la reivindicación 1 para regenerar el tejido en un sujeto.
- 25 9. El péptido de la reivindicación 1 para la cicatrización en un sujeto.

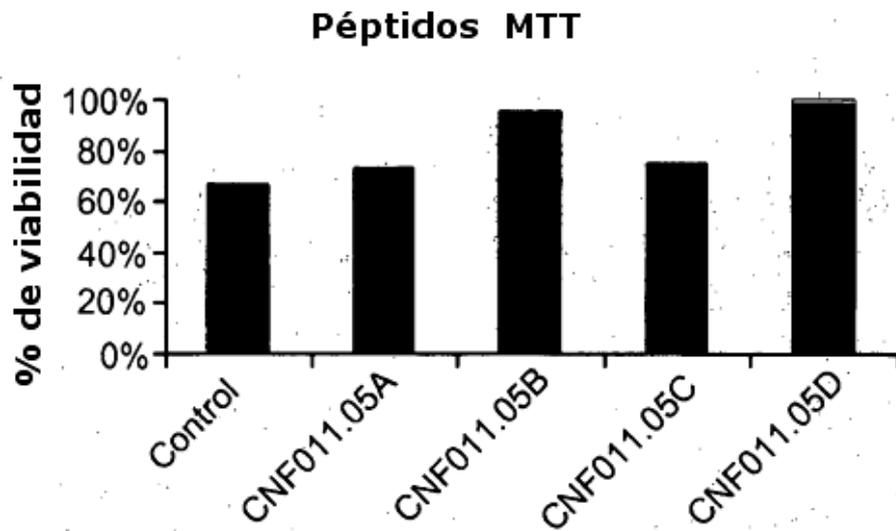


FIG. 1

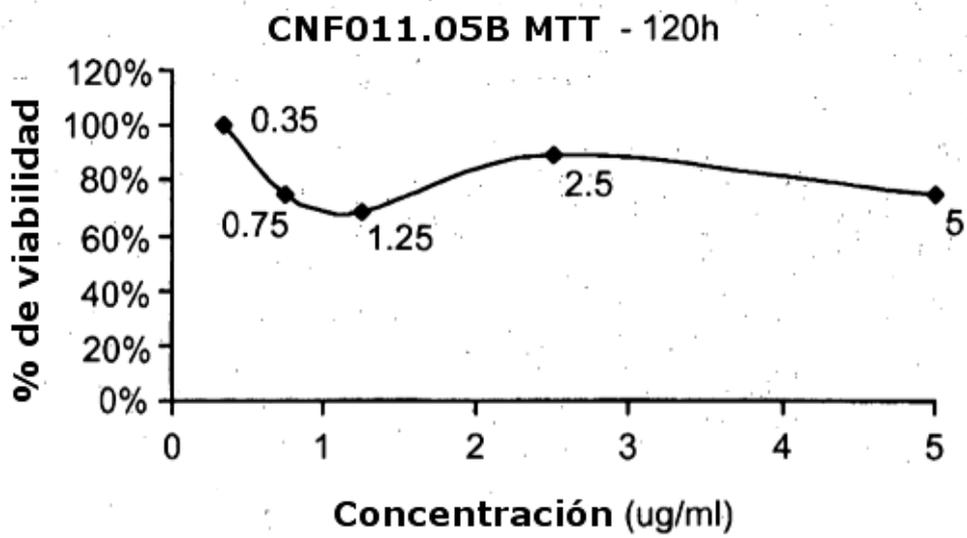


FIG. 2

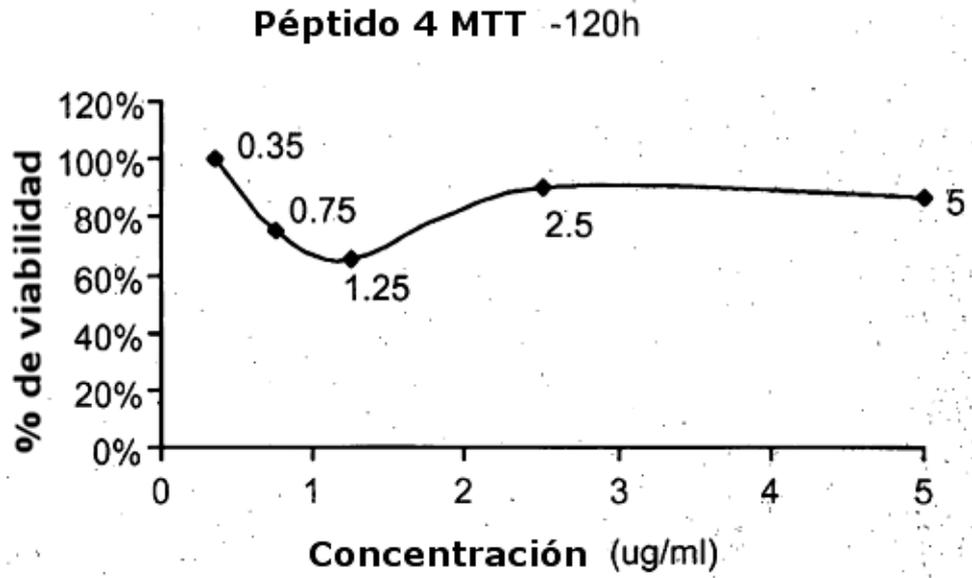


FIG. 3

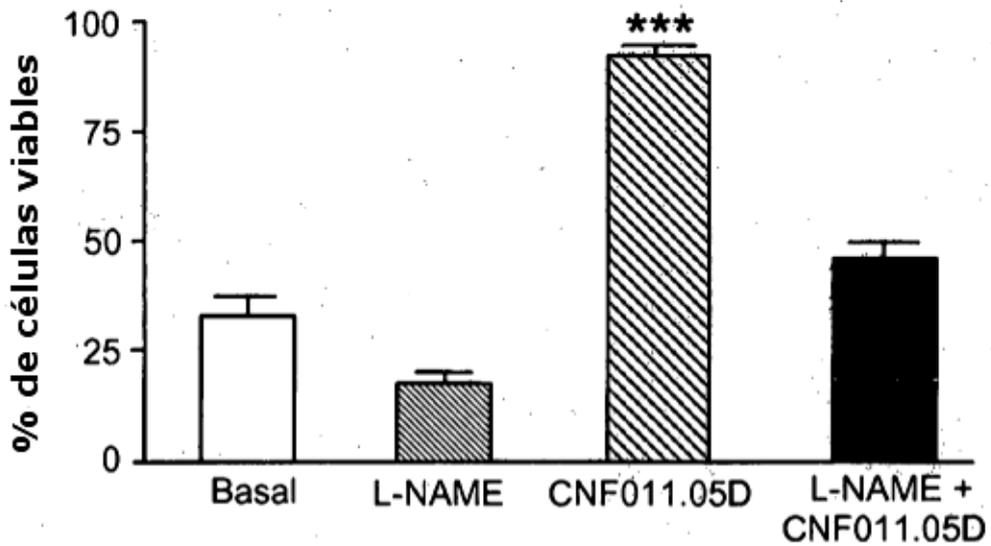


FIG. 4

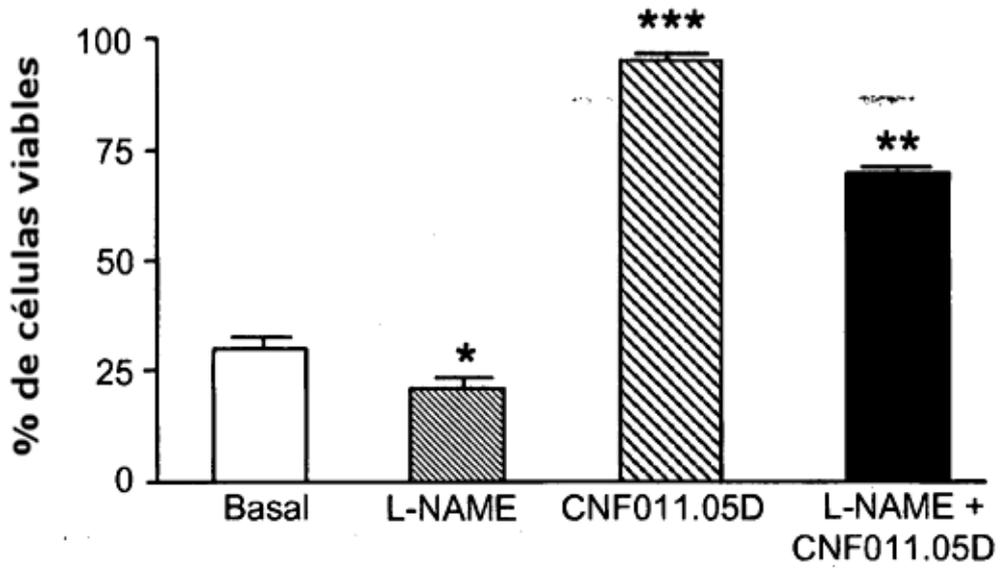


FIG. 5

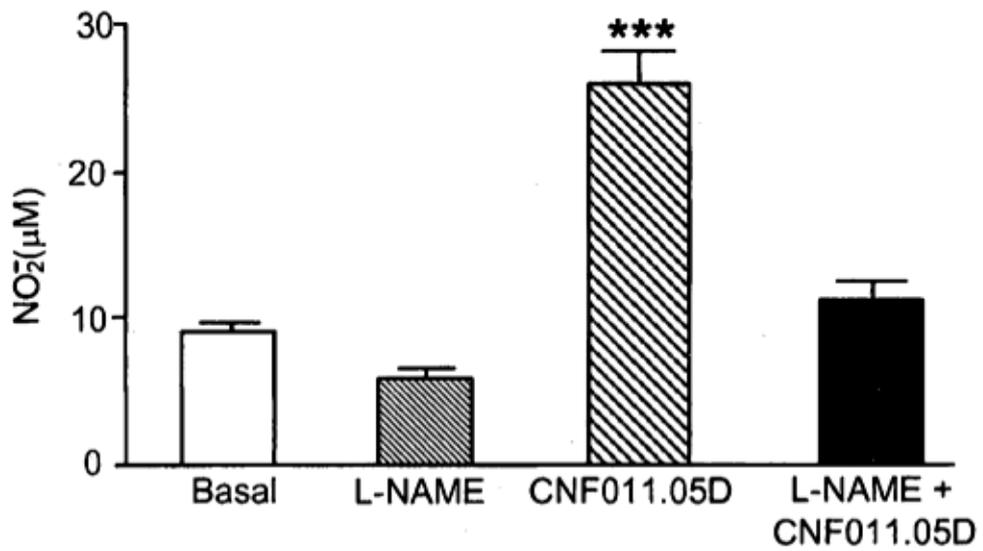


FIG. 6

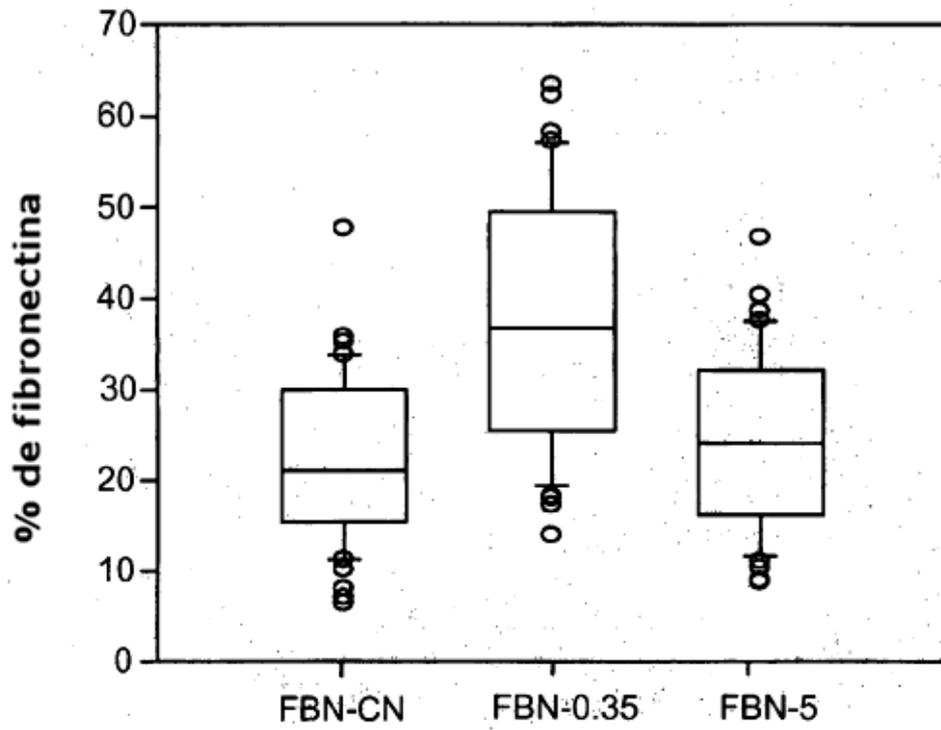


FIG. 7

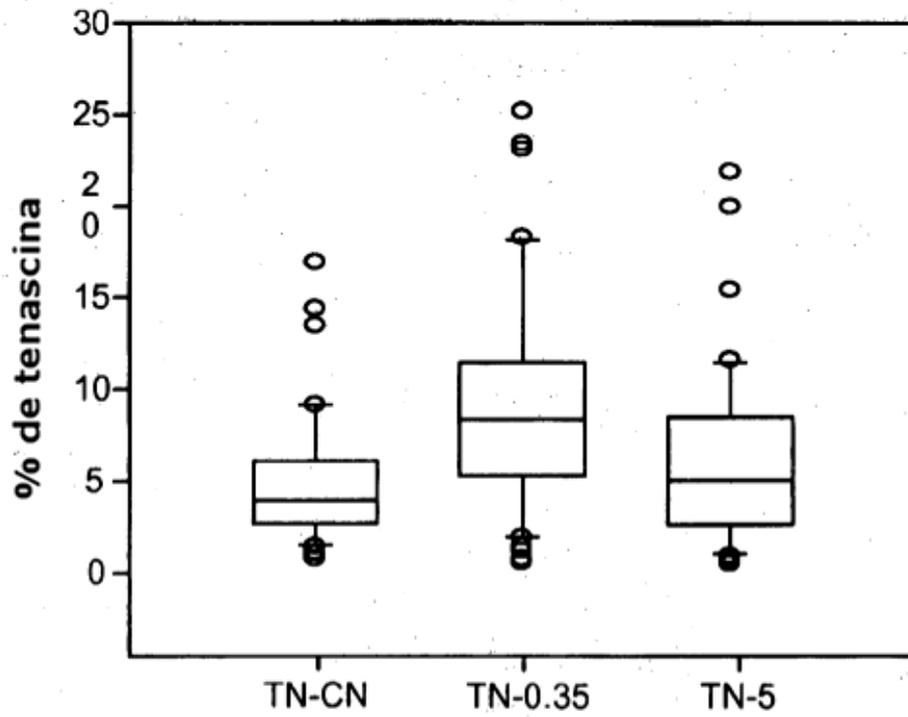


FIG. 8

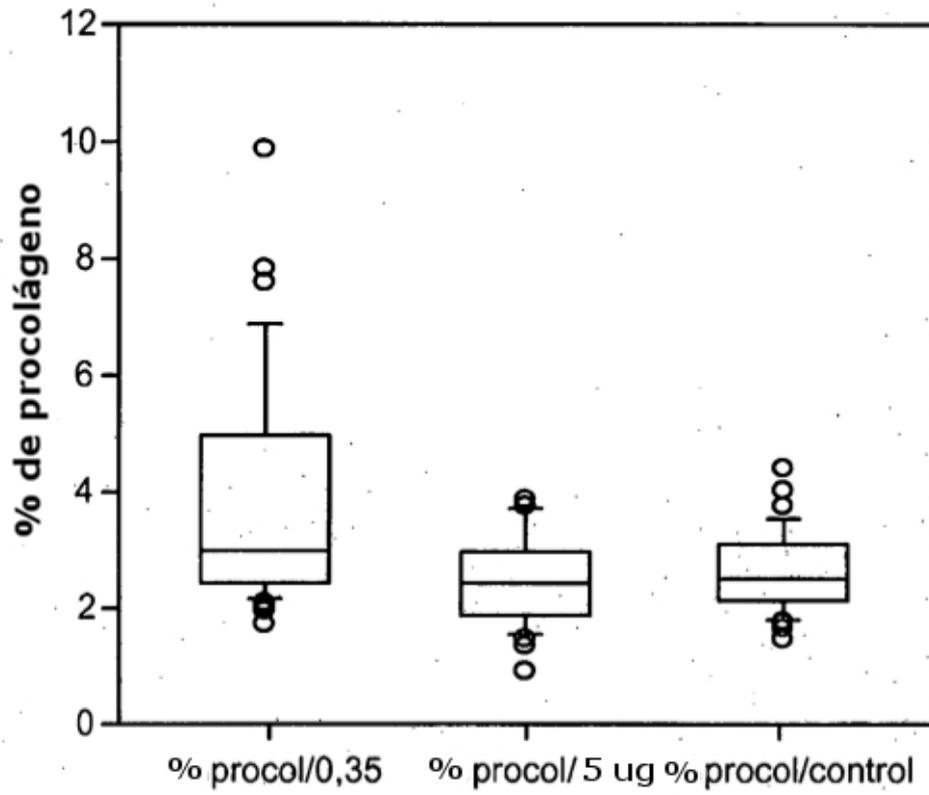


FIG. 9