

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 706**

51 Int. Cl.:

C07K 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2008 E 08844747 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2205623**

54 Título: **Tetrapéptidos protectores para cuidado cutáneo**

30 Prioridad:

29.10.2007 US 815

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

26.04.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZHANG, LIJUAN;
HARRIS, SCOTT, M. y
FALLA, TIMOTHY, J.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 567 706 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

Tetrapéptidos protectores para cuidado cutáneo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos que tienen actividad biológica y terapéutica. Particularmente, la invención se refiere a tetrapéptidos que inhiben procesos inflamatorios en la piel. Dichos tetrapéptidos ejercen este efecto, en parte, reduciendo la cantidad de interleucina (IL)-6 y metaloproteinasa de matriz (MMP)-1 expresada por células epiteliales y fibroblastos cutáneos en respuesta a exposición a luz ultravioleta (UV). La invención se refiere además a procedimientos para usar estos tetrapéptidos para tratar diversas lesiones que afectan a la piel y superficies mucosas relacionadas.

Antecedentes de la invención

10 La exposición a luz solar excesiva es un factor etiológico importante en el desarrollo de inflamación aguda, que se caracteriza por eritema y edema. Las consecuencias a largo plazo de dicha inflamación incluyen envejecimiento de la piel acelerado y una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de piel. Se ha mostrado que la inflamación cutánea debida a exposición aguda a radiación UV se caracteriza por la liberación de diversos factores incluyendo neuropéptidos, histamina, prostaglandinas, serotonina y radicales de oxígeno, así como la regulación positiva de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Las células epiteliales cutáneas y queratinocitos desempeñan un papel importante en los procesos inflamatorios observados en la piel después de exposición a UV produciendo varios de los factores anteriores.

15 Los efectos a largo plazo de inflamación inducida por UV alteran negativamente la función cutánea. Los procesos de curación de heridas en piel que ha padecido múltiples episodios de inflamación se extienden en el tiempo y pueden ser imperfectos (por ejemplo, cicatrización aumentada). Además, la piel sobreexpuesta también es más propensa a arrugas, sequedad, adelgazamiento, flacidez y mayor susceptibilidad a hematomas. Los procesos inflamatorios en la piel que conducen a estos efectos negativos son complejos y probablemente impliquen varias rutas.

20 La luz UV consiste en rayos tanto UVA como UVB. UVB es una causa bien conocida de inflamación aguda así como cáncer de piel no melanoma. La inflamación epidérmica mediada por UVB está orquestada por citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α . Ya que los rayos UVB penetran a través de la epidermis, puede producirse inducción de citocinas en queratinocitos, así como en fibroblastos y células endoteliales que residen en la dermis superior. Sin embargo, estos últimos dos tipos celulares, que son de origen mesenquimal, también pueden inducirse a un estado inflamatorio de una manera algo indirecta de exposición a UV directa. Los factores (es decir, mediadores) expresados por células epiteliales y queratinocitos en respuesta a estimulación por UV pueden señalar fibroblastos y células endoteliales para regular positivamente rutas inflamatorias. IL-6 es uno de dichos mediadores.

25 La inducción de las citocinas tales como IL-6 en células epiteliales y fibroblastos tiene un efecto significativo en la aceleración del fotoenvejecimiento cutáneo, que se manifiesta mediante arrugas y flacidez, entre otras indicaciones. Estos efectos están mediados principalmente por la estimulación de expresión de MMP-1 en exceso por fibroblastos en respuesta a señalización de IL-6 (Fagot y col. Arch Dermatol Res. 293: 576, 2002; Fagot y col. Photochem Photobiol. 79: 499, 2004). La sobreexpresión de MMP-1 puede alterar significativamente la integridad estructural de la piel degradando proteínas de la matriz extracelular (ECM) tales como colágeno que están comprendidas en el tejido conectivo de la piel. Además, la degradación de la ECM potencia el reclutamiento de células inmunitarias al sitio de exposición a UV; la actividad celular aumentada es una causa principal de síntomas agudos tales como eritema y edema, así como síntomas crónicos tales como endurecimiento de la piel, que resulta de la deposición de fibrina en exceso. Dados estos efectos negativos de largo alcance en la fisiología cutánea en respuesta a exposición a UV, IL-6 y MMP-1 representan importantes dianas moleculares para combatir el fotoenvejecimiento cutáneo.

35 Un medio para combatir el fotoenvejecimiento es la administración tópica de proteínas que se sabe que inhiben una o más rutas de señalización que muestran actividad alterada después de exposición a UV. Sin embargo, la mayoría de los intentos que emplean dicha estrategia no han conseguido alcanzar resultados clínicamente significativos, debido en parte a dificultades asociadas con el uso de proteínas completas o fragmentos grandes de las mismas. Un problema que subyace a este fracaso está relacionado con el suministro ineficaz de proteínas a través de la epidermis; la mayoría de la proteína aplicada permanece lejos de las células que son responsables del inicio de las rutas de fotoenvejecimiento. Otros inconvenientes están relacionados con la alta inestabilidad y escasa retención de proteínas grandes después de la administración. Aparte de estas características negativas inherentes, el desarrollo de estas terapias también adolece de la complejidad y los altos costes asociados con la preparación de proteínas grandes. Por lo tanto, se buscan en la actualidad preparaciones menos caras y más eficaces.

40 Los péptidos bioactivos cortos representan un medio potencialmente útil para tratar y prevenir el fotoenvejecimiento cutáneo. Además de los beneficios inmediatos de ser menos caros y producirse y manipularse más fácilmente, los péptidos cortos también se absorben mejor y se conservan en la piel. Con respecto a la prevención del fotoenvejecimiento en la piel, se desean péptidos cortos (por ejemplo, tetrapéptidos) capaces de inhibir los procesos inflamatorios cutáneos.

Aunque otros han ensayado previamente los efectos de tetrapéptidos en la piel, pocos han mostrado que inhiban los procesos inflamatorios que se sabe que están regulados positivamente en la piel por la radiación UV. Por ejemplo, Lintner (Patente de Estados Unidos n.º 6.974.799) empleó ciertas mezclas de tetrapéptido-tripéptido para invertir presuntamente las señales del envejecimiento en la piel; sin embargo, se ha mostrado solamente que esta mezcla regula positivamente la producción de ECM, un proceso que no se ha predicho que prevenga los efectos deletéreos de la luz del sol. De una manera similar, Sandberg y col. (Patente de Estados Unidos n.º 6.962.904) enseña el uso de tetrapéptidos derivados de elastina para restaurar el tejido conectivo en la piel. Según Bissett y col. (Patente Estados Unidos n.º 6.284.802) tetrapéptidos particulares son útiles para tratar las arrugas; la única base de esta utilidad es la derivación del péptido de la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Como tales, no puede esperarse que estos péptidos ejerzan actividad antiinflamatoria, ya que se sabe que bFGF desempeña un papel positivo en el reclutamiento de células inmunitarias (Zittermann e Issekutz Am J Pathol. 168: 835, 2006). Tampoco se espera que los tetrapéptidos descritos por Dussourd y col. (Patente de Estados Unidos n.º 6.211.155) que estimulan la proliferación de células epidérmicas inhiban la inflamación inducida por UV. Lintner (documento WO 00/43417) proporciona péptidos pequeños tales como TKPR o RKPR, que se usan en cosméticos o productos dermofarmacéuticos para cuidado de la piel para prevenir y tratar la inflamación provocada por radiación UV reduciendo las concentraciones tisulares de IL-6 e IL-8. Por otro lado, la presente invención proporciona tetrapéptidos que regulan negativamente la inflamación inducida por UV en la piel, actuando de este modo para prevenir o tratar la principal etiología del fotoenvejecimiento.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a un péptido aislado que incorpora como su secuencia de aminoácidos prolina-glutamina-glutamato-X (P-Q-E-X), en la que X es un resto de lisina (K) o isoleucina (I). Por lo tanto, los tetrapéptidos SEQ ID NO: 14 (PQEK) y SEQ ID NO: 15 (PQEI) son ejemplos de péptidos aislados proporcionados por la presente invención. Aunque la secuencia de aminoácidos de los péptidos de la invención consiste en la secuencia PQEX anterior, el péptido puede comprender otros elementos aparte de la secuencia específica. Por ejemplo, realizaciones particulares de la invención se refieren a péptidos que están amidados, lipidados o conjugados con una molécula vehículo. Otras realizaciones del péptido de la invención incorporan al menos un resto de aminoácido en la forma D-enantiómerica o al menos un enlace no peptídico presente entre restos de aminoácidos adyacentes.

Más realizaciones específicas de la presente invención incluyen tetrapéptidos con secuencias de aminoácidos proporcionadas por SEQ ID NO: 1 (PQEK-NH₂) y SEQ ID NO: 2 (PQEI-NH₂). Estos péptidos constituyen por lo tanto ejemplos de formas modificadas de péptidos con la secuencia PQEX como se ha descrito anteriormente. Los tetrapéptidos proporcionados por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 pueden tener otras modificaciones además de amidación en el extremo carboxilo terminal.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden al menos uno de los tetrapéptidos anteriores que tienen la secuencia de aminoácidos PQEX junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml o de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml. Las realizaciones preferidas de la composición de la invención pueden estar en forma de un aerosol, una emulsión, un líquido, una loción, una crema, una pasta, una pomada, un polvo o una espuma. Otras realizaciones preferidas más de la composición comprenden al menos uno de los tetrapéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 1, 2, 14 o 15. La composición de la invención puede comprender múltiples formas diferentes de tetrapéptidos PQEX, tales como los descritos en el presente documento. Pueden incluirse inhibidores de proteasa en todas las composiciones anteriormente descritas.

La presente invención también se refiere a ciertos procedimientos que emplean los péptidos de la invención anteriormente mencionados y composiciones farmacéuticas. En particular, la invención abarca un procedimiento para tratar inflamación en un mamífero que incluye la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición/péptido de la invención a un sitio de inflamación durante una cantidad de tiempo eficaz. La inflamación que acompaña o resulta de abrasiones, ampollas, quemaduras, laceraciones, úlceras, hematomas, erupciones y cicatrices es susceptible de tratarse por el procedimiento de la invención. Las realizaciones preferidas del procedimiento de la invención emplean al menos uno de los péptidos anteriores, tales como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, a una concentración que varía de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml o de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml.

Ciertas realizaciones del procedimiento de la invención se refieren al tratamiento de inflamación que sucede en la piel o el tejido asociado tal como dentro de la cavidad oral. Otra realización más del procedimiento de la invención se refiere a tratar inflamación cutánea que sucede como resultado de exposición a radiación ultravioleta (UV) (por ejemplo, quemadura solar). Pueden emplearse tetrapéptidos proporcionados por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, por ejemplo, en esta realización preferida.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para inhibir la expresión de IL-6 y/o MMP-1 por una célula. Este procedimiento comprende la etapa de exponer una célula a un péptido como se ha descrito en el texto anterior. Dicha exposición al péptido da como resultado expresión reducida por la célula de uno o ambos de estos mediadores inflamatorios. La etapa de exposición puede realizarse poniendo en contacto la célula con el péptido,

que puede acompañarse de medios de incubación sencillos. Los péptidos que pueden emplearse en este procedimiento, bien individualmente o bien en combinación, son preferentemente SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 2. En una realización particular de este procedimiento, la expresión celular de IL-6 o MMP-1 es un resultado de la exposición de la célula a radiación ultravioleta, tal como rayos UVA y/o UVB. Sin embargo, el procedimiento también es aplicable al control de la expresión celular de IL-6 y/o MMP-1 que sucede como resultado de cualquier otro acontecimiento relacionado con inflamación tal como traumatismo o quemaduras. Las realizaciones preferidas de este procedimiento se refieren a células que derivan de la piel (por ejemplo, células primarias o inmortalizadas, *in vitro* o *ex vivo*) o están presentes de otro modo en la piel (es decir, *in vivo*); dichas células pueden ser células epiteliales de la piel, queratinocitos y fibroblastos cutáneos. Otras realizaciones del procedimiento pueden usarse emplearse usando cualquier tipo de célula epitelial o fibroblasto.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra el efecto de ciertos tetrapéptidos (40 µg/ml) en la expresión de IL-6 por células epiteliales humanas 24 horas después de la exposición a UVB. "M1" indica un cultivo celular de control no irradiado (sin tratamiento peptídico) y por lo tanto muestra el nivel de expresión basal de IL-6 de células epiteliales cutáneas. "UVB" indica un cultivo celular de control irradiado (sin tratamiento peptídico) y por lo tanto muestra el nivel de IL-6 inducido en las células epiteliales tras exposición a UVB. Refiérase al Ejemplo 3.

La FIG. 2 muestra el efecto de los tetrapéptidos P1422 (SEQ ID NO: 1) y P1423 (SEQ ID NO: 2) a dos concentraciones diferentes (10 y 20 µg/ml) en la inducción de IL-6 en células epiteliales cutáneas tratadas con UVB. "Control" indica células que se irradiaron con UVB, pero no recibieron péptido. Refiérase al Ejemplo 3.

La FIG. 3 muestra el efecto de los tetrapéptidos P1422 (SEQ ID NO: 1) (A) y P1423 (SEQ ID NO: 2) (B) a 10 µg/ml en la inducción de IL-6 en queratinocitos tratados con UVB. "Control" indica células que se irradiaron con UVB, pero no recibieron péptido. "DO450" indica expresión de IL-6 relativa como se mide por ELISA. Refiérase al Ejemplo 4.

La FIG. 4 muestra el efecto de los tetrapéptidos P1422 (SEQ ID NO: 1) (A) y P1423 (SEQ ID NO: 2) (B) a 10 µg/ml en la inducción de MMP-1 en fibroblastos cutáneos tratados con UVA. La cantidad relativa de MMP-1 producida por cada cultivo se determinó usando valores de absorción DO450 generados por ELISA. "Control" indica células que se irradiaron con UVA, pero no recibieron péptido. Refiérase al Ejemplo 5.

La FIG. 5 muestra el efecto de los tetrapéptidos P1422 (SEQ ID NO: 1) (A) y P1423 (SEQ ID NO: 2) (B) a 10 µg/ml en la inducción de MMP-1 en fibroblastos cutáneos tratados con medio acondicionado por queratinocitos tratados con UVB. La cantidad relativa de MMP-1 producida por cada cultivo se determinó usando valores de absorción DO450 generados por ELISA. "Control" indica células que se incubaron en medios acondicionados por queratinocitos irradiados con UVB, pero que no recibieron péptido. Refiérase al Ejemplo 5.

Descripción detallada de la invención

Los péptidos de la presente invención son tetrapéptidos con la secuencia de aminoácidos prolina-glutamina-glutamato-X (P-Q-E-X), en la que X puede ser lisina (K) o isoleucina (I). Por lo tanto, se proporcionan tetrapéptidos PQEK (SEQ ID NO: 14) y PQEI (SEQ ID NO: 15) por la presente invención. Son ejemplos no limitantes de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 son SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente; estos últimos tetrapéptidos están amidados en sus extremos carboxilo terminal respectivos. Solamente para fines de referencia, los códigos de tres letras de los restos de aminoácidos en los péptidos de la invención son Pro (prolina, P), Gln (glutamina, Q), Glu (glutamato o ácido glutámico, E), Lys (lisina, K) e Ile (isoleucina, I).

Una actividad biológica inducida por los tetrapéptidos anteriores es la inhibición de la inflamación cutánea en el sitio de exposición a UV. Esta actividad se consigue en parte mediante el efecto negativo de los péptidos en la secreción de IL-6 por células epiteliales cutáneas y fibroblastos (refiérase a los ejemplos). La secreción de IL-6 en este ambiente se debe a los efectos de la radiación de UV en estas células. La actividad inhibitoria de los tetrapéptidos anteriores en la inflamación se debe además en parte a su efecto negativo en la expresión de MMP-1 en fibroblastos.

Los expertos en la materia reconocerían que, dada la capacidad de los tetrapéptidos de la invención PQEK (SEQ ID NO: 14) y PQEI (SEQ ID NO: 15) para inhibir la producción de IL-6, estos péptidos serían adicionalmente útiles para tratar formas de daño cutáneo resultante de lesiones distintas de exposición a UV. Además, se reconocería que los péptidos de la invención serán útiles para tratar heridas en el tejido mucoso. IL-6 se libera por queratinocitos y fibroblastos en sitios de heridas y señala la infiltración celular inmunitaria, un proceso que puede agravar de hecho la curación y provocar cicatrización. El control de la expresión de IL-6 en dichas circunstancias mediante aplicación de los péptidos de la invención aliviará estos procesos de curación de heridas negativos. Estas actividades biológicas se enumeran para proporcionar orientación sobre cómo los péptidos de la invención pueden usarse terapéuticamente; sin embargo, la presente invención no se limita de ninguna manera a estos modos particulares de función peptídica.

Péptidos

Cada uno de los tetrapéptidos de la invención [por ejemplo, PQEK (SEQ ID NO: 14) y PQEI (SEQ ID NO: 15)] puede comprender enantiómeros de aminoácido L o D, que contienen restos de una forma enantiomérica o una

combinación de ambas formas. Los péptidos pueden aumentarse o modificarse adicionalmente como se describe en los siguientes ejemplos no limitantes, solamente en la medida en que sus secuencias de aminoácidos primarias estén inalteradas; de esta manera, los péptidos consisten en una cierta secuencia de aminoácidos, pero pueden comprender ciertas modificaciones. El extremo carboxilo terminal de los péptidos puede ser ácido (-COOH) o estar amidado (por ejemplo, -CONH₂, -CONHR, o -CONR₂). La amidación del extremo carboxilo terminal puede hacer a los péptidos de la invención menos susceptibles a degradación por proteasa y aumentar su solubilidad en comparación con sus formas de ácido libre, proporcionando de este modo potencia terapéutica aumentada. Son ejemplos de péptidos de la presente invención que están carboxilo-amidados SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Los péptidos también pueden estar lipidados, lo que puede proporcionar una penetración cutánea potenciada. Uno o más de los enlaces moleculares que ligan los aminoácidos de cada péptido pueden ser enlaces no peptídicos. Dichos enlaces no peptídicos incluyen, pero sin limitación, enlaces imido, éster hidracina, semicarbazoido y azo. Son otros ejemplos de péptidos de acuerdo con la descripción anterior los que incorporan SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 con modificaciones adicionales (obsérvese que tanto SEQ ID NO: 1 como 2 ya están carboxilo-amidadas).

Puede realizarse una diversidad de modificaciones de los tetrapéptidos de la invención siempre que sus secuencias de aminoácidos primarias se conserven. Algunas modificaciones pueden usarse para aumentar la potencia del péptido, mientras que otras modificaciones pueden facilitar la manipulación de los péptidos. Los grupos funcionales peptídicos que pueden modificarse típicamente incluyen grupos hidroxilo, amino, guanidinio, carboxilo y amida. Las reacciones típicas, no limitantes, de estos grupos incluyen las siguientes: acetilación de grupos hidroxilo por alquil haluros; esterificación, amidación o hidrogenización (es decir, reducción a alcohol) de grupos carboxilo, desamidación, acilación, alquilación, arilación de grupos amino (por ejemplo, el grupo amino primario del péptido o el grupo amino de restos de lisina).

Los péptidos pueden conjugarse con moléculas vehículos solubles o insolubles para modificar sus propiedades de solubilidad según sea necesario y para aumentar las concentraciones locales de péptidos en tejidos diana. Los ejemplos de moléculas vehículo solubles incluyen polímeros de polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona; los ejemplos de polímeros insolubles incluyen silicatos, poliestireno y celulosa. Los péptidos también pueden microencapsularse para potenciar su estabilidad durante y después de la aplicación terapéutica; típicamente, se usan microesferas de poliéster y PEG para encapsular y estabilizar los péptidos.

Pueden emplearse diversos procedimientos para preparar microesferas para encapsulación de péptidos dependiendo de la naturaleza hidrófila o hidrófoba de la composición peptídica para encapsular. Se encuentran ejemplos de protocolos para dichos procedimientos en Wang y col. (J. Control. Release 17: 23, 1991) y Patente de Estados Unidos n.º 4.324.683. Pueden realizarse estudios de liberación de péptidos *in vitro* para determinar la disponibilidad relativa del péptido después de la incorporación en una microesfera. Se suspenden microesferas (200 mg) en 2,5 ml de solución tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2) y se agitan a 37 °C y 100 rpm en un agitador incubador medioambiental (G-24, New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J.). En momentos de toma de muestras específicos (cada día durante los primeros 4 días y en lo sucesivo cada dos días) la solución de tampón se retira completamente y se reemplaza con PBS nuevo. El contenido peptídico del PBS se mide usando el procedimiento de Bradford u otro ensayo cuantitativo adecuado típicamente usado para análisis de proteínas.

Los siguientes procedimientos y parámetros se proporcionan para fines de orientación solamente y se conocen todos bien por los expertos en la materia. Todos los péptidos desvelados pueden sintetizarse usando química de fase sólida de Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) convencional en un sintetizador de Péptido Múltiple Advanced ChemTech Apex 396. El Apex 496 está equipado con un bloque de reacción de 40 pocillos para la producción de hasta 40 péptidos simultáneamente a una escala de 0,15 mmol. Los péptidos pueden prepararse como secuencias de ácidos libres o amidados usando aminoácidos convencionales. La resina se lava en primer lugar y se prehincha con N,N-dimetil formamida (DMF). El tiempo de hinchamiento es una hora para resinas de amida de Rink. El grupo protector de Fmoc se retira con piperidina al 25 % en DMF durante 25 minutos, después de lo cual la piperidina se lava completamente de la resina. Para controlar los procesos de racemización, los monómeros de aminoácidos de Fmoc se preactivan en una solución equimolar de 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) o 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol (HOAt) en DMF 0,5 M. Los acoplamientos de amida se llevan a cabo usando O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU) PyBop[®] o 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) como un agente de activación y un exceso molar de 2,5-5,0 veces de aminoácidos en condiciones básicas usando una base con impedimentos estéricos (diisopropiletilamina). Los tiempos de acoplamiento son 1-1,5 horas seguido de un lavado y reacoplamiento para conseguir un acoplamiento doble o triple antes de la desprotección y continuación de la cadena peptídica creciente. La eficacia de acoplamiento se supervisa usando un ensayo de Kaiser convencional. Una vez que se ha completado la síntesis peptídica en la resina, el grupo Fmoc final se retira como anteriormente y las secuencias se dejan como la forma de base libre.

Se consigue escisión del enlace lábil por ácidos del péptido a la resina usando ácido trifluoroacético (TFA) al 95 % y agua con los neutralizantes apropiados. Después de permitir que la escisión continúe durante aproximadamente 30 minutos a una hora, los péptidos liberados se retiran inmediatamente del bloque de escisión y se transfieren a tubos para la retirada del TFA con presión reducida. Los péptidos se preparan después para purificación y análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando una columna C18 de fase inversa y espectrometría de masas. Se consiguen confirmación de secuencia primaria y purificación preparatoria usando un sistema CL/EM/EM (ABI API2000).

En general para el protocolo anterior, los péptidos pueden producirse usando cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia tal como los desvelados en Merrifield (J Am Chem Soc. 85: 2149, 1963); Carpino y col. (J Org Chem. 51: 3732, 1986); Merrifield y col. (Anal Chem. 38: 1905, 1966); o Kent y col. [High Yield Chemical Synthesis Of Biologically Active Peptides On An Automated Peptide Synthesizer Of Novel Design, EN: PEPTIDES 1984 (Ragnarsson, ed.) Almqvist y Wiksell Int., Estocolmo (Suecia), pp. 185-188]. Preferentemente, los péptidos se producirán por una máquina con capacidad de adición secuencial de aminoácidos a una cadena peptídica creciente. Sin embargo, los péptidos también pueden fabricarse usando metodología en fase de solución convencional, que puede ser susceptible de intentos de producción a gran escala.

La presente invención puede comprender uno o más inhibidores de proteasa. Un inhibidor de proteasa puede seleccionarse para dirigirse específicamente a proteasas que se esperaría que degradaran el péptido bioactivo seleccionado; dicha selección se determinaría basándose en la longitud y/o secuencia del péptido bioactivo. Sin embargo, no es necesario estrictamente que los inhibidores de proteasa se seleccionen de ninguna manera específica; por ejemplo, puede emplearse en la presente invención un cóctel de inhibidores de proteasa, que contiene dos o más inhibidores. Con ciertas realizaciones de la invención, el inhibidor de proteasa no es uno que sea específico para inhibir un virus. Pueden incorporarse en la invención los siguientes tipos de inhibidores de proteasa: inhibidores de serina proteasa, inhibidores de cisteína proteasa, inhibidores de aspartato proteasa, inhibidores de metaloproteína, inhibidores de tiol proteasa e inhibidores de treonina proteasa.

Se conocen en la técnica inhibidores de proteasa. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de proteasa que pueden incorporarse en la presente invención incluyen acetil-pepstatina, clorhidrato de AEBSF (4-[2-aminoetil] bencenosulfonil fluoruro), ALLM (N-acetil-Leu-Leu-Met), ALLN (N-acetil-Leu-Leu-Nle-CHO), amastatina (*Streptomyces* sp.), ácido ϵ -amino-*n*-caproico, inhibidor de aminopeptidasa N, α_1 -antiquimotripsina, antipaína (clorhidrato o diclorhidrato), α_2 -antiplasmina, antitrombina III, α_1 -antitripsina, clorhidrato de *p*-APMSF, aprotinina (por ejemplo, de pulmón bovino), ATBI (un péptido de 11 restos), clorhidrato de benzamidina, bestatina, metil éster de bestatina, calpastatina, calpeptina, inhibidor de carboxipeptidasa, inhibidor de caspasa, inhibidor de catepsina B II, inhibidor de catepsina G I, inhibidor de catepsina II, inhibidor de catepsina III, inhibidor de catepsina I, inhibidor de catepsina K I, inhibidor de catepsina K II, inhibidor de catepsina K III, inhibidor de catepsina L I, inhibidor de catepsina L II, inhibidor de catepsina L IV, inhibidor de catepsina L V, inhibidor de catepsina L VI, inhibidor de catepsina S, inhibidor de catepsina/subtilisina, quimostatina, inhibidor de quimotripsina I, cistatina, diclorhidrato de 1,5-dansil-glu-gly-arg clorometil cetona, 3,4-dicloroisocoumarina, diisopropilfluorofosfato, inhibidor de dipeptidilpeptidasa II, inhibidor de dipeptidilpeptidasa IV I, inhibidor de dipeptidilpeptidasa IV II, inhibidor de E-64 proteasa, ecotina, dihidrato de sal disódica de EDTA, sal tetrasódica de EDTA, EGTA, inhibidor de elastasa I, inhibidor de elastasa II, inhibidor de elastasa III, elastatinal, 6-amidino-2-naftil-4-guanidinobenzoato dimetanosulfonato, glu-gly-arg-clorometil cetona, ácido 2-guanidinoetilmercaptosuccínico, fluoruro de hexadecilsulfonilo, α -yodoacetamida, quinínogeno, leuhistina, hemisulfato de leupeptina, α_2 -macroglobulina, ácido DL-2-mercaptometil-3-guanidinoetilpropanoico, pepstatina A, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, sal disódica de fosforamidón, sal de trifluoroacetato de PPACK II, diclorhidrato de PPACK, inhibidor de prolil endopeptidasa II, clorhidrato de Na-tosil-lys clorometilcetona, Na-tosil-phe clorometilcetona, inhibidor de tripeptidilpeptidasa II, inhibidor de tripsina (de maíz o soja), clorhidrato de D-val-phe-lys clorometilcetona, 1,3-di-(N-carboxibenzoil-L-leucil-L-leucil)amino acetona, o-fenantrolina, ácido úrsólico (por ejemplo, extracto de romero), ácido tranexámico (4-[aminometil]ciclohexano-1-carboxílico) (clínicamente comercializado como Cyklokapron en los Estados Unidos y como Transamin en Asia), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Arg(Pmc), benzoil-Arg-nitroanilida, benzoil-Arg-naftilamida, y α -2-macroglobulina.

El inhibidor de proteasa usado en la invención puede ser un péptido o una proteína, tal como una enzima. Son ejemplos no limitantes de estos inhibidores las serpinas, que incluyen alfa-1-antitripsina, inhibidor de complemento 1, antitrombina, alfa-1-antiquimotripsina, inhibidor de activador de plasminógeno 1, y neuroserpina.

Se conocen bien en la técnica componentes que se incorporan típicamente en preparaciones de cuidados de la piel. Además del componente de péptido bioactivo, la presente invención puede contener otros agentes activos tales como niacinamida, fitantríol, farnesol, bisabolol y ácido salicílico. Se espera que ciertos agentes activos adicionales actúen de forma sinérgica con el componente de péptido bioactivo, o potencien el periodo de validez de la formulación.

Cuando la composición debe estar en contacto con piel animal o humana, deberían elegirse componentes adicionales que sean adecuados para aplicación a tejido queratinoso (es decir, estables, de baja toxicidad, hipoalergénicos). El CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Segunda Edición (1992), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, describe una amplia diversidad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos no limitantes habitualmente usados en la industria de los cuidados de la piel que son adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención. Los ejemplos de estos ingredientes incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos tales como fragancias, pigmentos, colorantes, aceites esenciales, sensibilizadores cutáneos, astringentes, etc. (por ejemplo, aceite de trébol, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, mentil lactato, destilado de hamamelis), agentes anti acné (por ejemplo, resorcinol, azufre, ácido salicílico, peróxido de benzoilo, eritromicina, zinc), agentes antiapelmazantes, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos (por ejemplo, yodopropil butilcarbamato), antioxidantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tamponantes, agentes masificantes, agentes quelantes, aditivos químicos, desnaturalizantes, analgésicos externos,

5 polímeros (por ejemplo, copolímero de eicoseno y vinil pirrolidona), agentes opacificantes, agentes de ajuste del pH, propulsores, agentes reductores, secuestrantes, agentes blanqueantes y aclarantes de la piel (por ejemplo, hidroquinona, ácido kójico, ácido ascórbico, ascorbil fosfato de magnesio, ascorbil glucosamina), agentes de acondicionamiento de la piel (por ejemplo, humectantes, incluyendo misceláneos y oclusivos), agentes suavizantes y/o de curación de la piel (por ejemplo, pantenol y derivados [por ejemplo, etil pantenol], aloe vera, ácido pantoténico y sus derivados, alantoína, bisabolol, glicirricinato dipotásico), espesantes, materiales en partículas, agentes estructurantes y vitaminas. Muchos de estos agentes se describen en detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6.492.326, específicamente con respecto a las diversas descripciones de ingredientes.

10 Las composiciones de la presente invención pueden contener un material en partículas, preferentemente un óxido metálico. Estas partículas pueden estar revestidas o no revestidas, con carga o sin carga. Los ejemplos no limitantes de materiales en partículas útiles para preparar la presente invención incluyen oxiclورو de bismuto, óxido de hierro, mica, mica tratada con sulfato de bario y TiO₂, sílice, nylon, polietileno, talco, estireno, polipropileno, copolímero de etileno/ácido acrílico, sericita, óxido de aluminio, resina de silicona, sulfato de bario, carbonato cálcico, acetato de celulosa, dióxido de titanio, polimetil metacrilato y mezclas de los mismos. Estas disponibles de varias fuentes en el mercado materiales en partículas inorgánicos tales como TiO₂, ZnO (óxido de zinc), o ZrO₂. Preferentemente, están presentes materiales en partículas en la composición a niveles de 0,01 % a 2 % en peso, más preferentemente de 0,05 % a 1,5 % en peso, o aún más preferentemente de 0,1 % a 1 % en peso (todas las medidas aproximadamente).

20 Las composiciones de la presente invención pueden contener un agente acondicionante seleccionado de humectantes, hidratantes o acondicionadores cutáneos. Puede emplearse una diversidad de estos materiales y cada uno puede estar presente a un nivel de 0,01 % a 20 %, más preferentemente de 0,1 % a 10 %, y aún más preferentemente de 0,5 % a 7 % en peso de la composición (todas las medidas aproximadas). Estos materiales incluyen, pero sin limitación, guanidina; urea; ácido glicólico y sales de glicolato (por ejemplo, amonio y alquil amonio cuaternario); ácido salicílico; ácido láctico y sales de lactato (por ejemplo, amonio y alquil amonio cuaternario); aloe vera en cualquiera de sus diversas formas (por ejemplo, gel de aloe vera); polihidroxi alcoholes tales como sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, glicerol, hexanotriol, butanotriol, propilenglicol, butilenglicol y hexilenglicol; polietilenglicoles; azúcares (por ejemplo, melibiosa) y almidones; azúcar y derivados de almidón (por ejemplo, glucosa alcoxilada, fructosa, glucosamina); ácido hialurónico; monoetanolamina de lactamida; monoetanolamina de acetamida; pantenol; alantoína; vaselina; y mezclas de los mismos.

30 Las composiciones de la presente invención pueden contener un agente estructurante, que se prefiere para preparar una emulsión de aceite en agua. Sin quedar limitada a ninguna teoría, se cree que el agente estructurante ayuda a proporcionar características reológicas a la composición que contribuyen a la estabilidad de la composición. Por ejemplo, el agente estructurante tiende a ayudar en la formación de estructuras de redes de geles cristalinas líquidas. El agente estructurante puede también actuar como un emulsionante o tensioactivo. Las composiciones preferidas de la presente invención contienen de 0,1 % a 20 %, más preferentemente de 0,1 % a 10 %, aún más preferentemente de 0,5 % a 9 %, de uno o más agentes estructurantes en peso de la composición (todas las medidas aproximadas).

40 Se seleccionan agentes estructurantes preferidos para incorporación en la presente invención de ácido esteárico, ácido palmítico, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, teniendo el polietilenglicol éter de alcohol estearílico un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de óxido de etileno, teniendo el polietilenglicol éter de alcohol cetílico un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de óxido de etileno, y mezclas de los mismos. Se seleccionan más agentes estructurantes preferidos de la presente invención de alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, teniendo el polietilenglicol éter de alcohol estearílico un promedio de aproximadamente 2 unidades de óxido de etileno (steareth-2), teniendo el polietilenglicol éter de alcohol cetílico un promedio de aproximadamente 2 unidades de óxido de etileno, y mezclas de los mismos.

45 Procedimientos de uso

Realizaciones adicionales de la presente invención se dirigen a procedimientos de uso de los péptidos anteriormente descritos, tales como en formulaciones o como agentes terapéuticos. Estos procedimientos pueden implicar el uso de un único péptido, o múltiples péptidos en combinación.

50 Los péptidos de la presente invención pueden usarse para tratar y prevenir el daño la piel por sobreexposición a rayos UV. Además, los péptidos pueden usarse para tratar heridas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis) y tejidos mucosos asociados. Los efectos saludables de los péptidos de la invención para estas afecciones están relacionados en parte con sus propiedades antiinflamatorias. Como se usa en el presente documento, la expresión "tejidos mucosos asociados" se refiere a cualquier tejido organizado de una manera similar a la piel y contiene células epiteliales. Son ejemplos de dichos tejidos las superficies oral, nasofaríngea, auditiva y urogenital, así como la conjuntiva palpebral del ojo. Otros ejemplos de tejidos mucosos asociados incluyen el revestimiento completo (es decir, el lumen) del canal alimentario, incluyendo el esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso (colon) y recto. Estos últimos ejemplos pueden sufrir heridas/lesiones muy parecidas a las que pueden afectar a la piel, y como tales pueden ser diana de la presente invención. Son ejemplos de heridas/lesiones/daños que pueden afectar a estos tejidos y son susceptibles de tratamiento con los péptidos de la invención abrasiones, ampollas, quemaduras, laceraciones, perforaciones, úlceras, hematomas, erupciones y cicatrices. El traumatismo tisular

posquirúrgico también puede tratarse con los péptidos. Aunque la inflamación ayuda a proteger de infección en sitios de lesión, la provisión de buenas prácticas antisépticas niega cualquier desventaja que pueda asociarse con el bloqueo de la inflamación usando los péptidos de la invención.

5 Los péptidos de la invención también pueden usarse para evitar o invertir los efectos del envejecimiento en todos los tejidos anteriormente mencionados. De una manera relacionada, los péptidos podrían aplicarse a tejido que se ha dañado por exposición a diversos agentes externos tales como luz del sol. Son ejemplos de debilitamiento de la piel relacionado con el envejecimiento y exposición arrugas cutáneas, sequedad, adelgazamiento, flacidez y mayor susceptibilidad a los hematomas. La invención también puede usarse como un cosmético a este respecto para proporcionar una apariencia más joven y textura a la piel, y para proporcionar una mejor función.

10 Otros problemas tisulares que se tratan eficazmente usando los péptidos de la presente invención se relacionan con alergia o autoinmunidad, ambos de los cuales tienen un componente inflamatorio. Dichas dolencias incluyen dermatitis, psoriasis, esclerodermia, pénfigo y enfermedad inflamatoria del intestino.

15 Las composiciones usadas para suministrar a los péptidos en el procedimiento terapéutico anterior pueden estar en forma de un aerosol, emulsión, líquido, loción, crema, pasta, pomada, polvo, espuma u otra formulación farmacéuticamente aceptable. Además, los péptidos pueden suministrarse usando formulaciones menos implicadas tales como agua desionizada/destilada, PBS o soluciones salinas médicas convencionales. En general, una formulación farmacéuticamente aceptable incluiría cualquier vehículo adecuado para su uso en piel humana o superficie mucosa. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen etanol, dimetil sulfoxido, glicerol, sílice, aluminio, almidón y vehículos y diluyentes equivalentes. La formulación puede opcionalmente tener atractivo cosmético y/o contener otros agentes tales como retinoides u otros péptidos que pueden actuar como adyuvantes para la acción terapéutica de los péptidos de la invención. También puede añadirse antibióticos a la formulación para proteger contra la infección, permitiendo de este modo que se produzcan procesos de curación máximos. La concentración de péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml o de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml; sin embargo, la concentración última empleada puede variar fuera de estos intervalos, dependiendo de la naturaleza de la condición tisular/de herida, la bioactividad del péptido de la invención y el uso de cualquier adyuvante o técnica para obtener absorción de composición potenciada. Dichas determinaciones están dentro de la experiencia normal de la técnica.

20 La administración de los péptidos de la invención y composiciones asociadas puede realizarse a seres humanos y animales, incluyendo todos los mamíferos (por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, ovejas, cabras, ratones, ratas, gatos, perros, hurones). La aplicación también puede realizarse en combinación con materiales típicos y/o experimentales tales como injertos tisulares, productos de cultivo tisular, oxígeno y apósitos. En general, la composición puede administrarse por vía tópica, por vía oral, por vía transdérmica, por vía sistémica o por cualquier otro procedimiento conocido por los expertos en la materia que sea útil para suministrar los péptidos de la invención al sitio inflamatorio. Las composiciones también pueden aplicarse de una manera *in vitro* o *ex vivo*, bien a células o bien a injertos de pacientes que han crecido en cultivo, por ejemplo.

25 Debido a su pequeño tamaño, se espera que los péptidos sean capaces de alcanzar por sí mismos algún de nivel de permeabilidad a través de la piel; sin embargo, pueden usarse ciertas técnicas para amplificar este movimiento. Por ejemplo, pueden añadirse grupos lipófilos (no polares) a los péptidos, o los péptidos pueden suministrarse a la piel en un excipiente lipófilo, para potenciar la accesibilidad del péptido al estrato córneo para permitir la translocación a las capas epidérmicas inferiores. De esta manera puede considerarse que dichas modificaciones lipófilas tienen un efecto profarmacológico. Pueden usarse potenciadores de la permeación tales como disolventes y tensioactivos conocidos en el excipiente para permitir una mejor absorción de péptidos. Las técnicas especiales que se anticipa que serán útiles en la potenciación de acceso del péptido al tejido/la lesión diana incluyen iontoforesis, electroforesis y ultrasonidos. Un dispositivo iontoforético consiste en dos electrodos sumergidos en una solución de electrolitos y colocados en la piel. Cuando se aplica una corriente eléctrica a través de los electrodos, se crea un campo eléctrico a través del estrato córneo que conduce el suministro de los péptidos. La electroporación implica la aplicación de pulsos eléctricos de alta tensión para aumentar la permeación a través de bicapas lipídicas. Esto difiere de la iontoforesis en la duración y la intensidad de la aplicación de corriente eléctrica (la iontoforesis usa un campo eléctrico de baja tensión relativamente constante). Se cree que el pulso eléctrico de alta tensión de electroporación induce una formación reversible de poros hidrófilos en las membranas de lamelas lipídicas que puede proporcionar un alto grado de potenciación de la permeación. El ultrasonido aplica ondas sonoras que tienen una frecuencia mayor de 16 kHz a la piel, lo que provoca compresión y expansión del tejido a través del que viajan las ondas de sonido. Las variaciones de presión resultantes provocan varios procesos (por ejemplo, cavitación, mezclado, aumento de la temperatura) que pueden potenciar la permeación de los péptidos.

30 Se describen características adicionales, modos de producción y uso de péptidos de la invención, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 6.974.799 y 5.492.894.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertas realizaciones preferidas de la invención.

Ejemplos

El objetivo en el desarrollo de la presente invención fue identificar péptidos de menos de 500 Dalton que tengan la capacidad de regular negativamente procesos inflamatorios tales como los inducidos por radiación UV. El peso molecular pequeño de dichos péptidos identificados aseguraría su capacidad para penetrar a través de las capas superiores de la piel. La siguiente información inferida a partir de la técnica anterior guio en parte el desarrollo de la presente invención.

1. La radiación UV provoca inflamación que conduce a la producción de citocinas y la posterior inducción de elementos que contribuyen al fotoenvejecimiento de la piel. Ciertas evidencias de este último proceso son arrugas debido a degradación del colágeno, engrosamiento de la piel debido a proliferación de queratinocitos excesiva y deposición de fibrina, e hiperpigmentación debido a sobreproducción de melanina. Los factores que inician la inflamación inducida por UV son citocinas tales como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α .
2. Se han identificado ciertas secuencias peptídicas que pueden inhibir la unión de TRAF6 (factor asociado a receptor de TNF 6) a una amplia serie de proteínas inmunorreguladoras incluyendo CD40 humana, Trance e IRAK (quinasa asociada a receptor de IL-1). Estos acontecimientos de unión relacionados con TRAF6 trasladan estímulos de TNF, IL-1 y proteínas de la familia del receptor de tipo toll a NF- κ B, que es un regulador central de respuestas inmunitarias celulares. Los péptidos que inhiben estos acontecimientos de unión a TRAF6 tienen la fórmula general Pro-X-Glu-X-X-(aminoácido aromático/ácido) [PXQXX-(aromático/ácido)] (SEQ ID NO: 16) y se localizan en varias proteínas que interactúan con TRAF6 (documento WO 02/092623).
3. Péptidos que contienen la secuencia PXQXX-(aromático/ácido) (SEQ ID NO: 16) no pueden usarse para combatir el fotoenvejecimiento por varias razones. En primer lugar, este péptido debe incorporarse dentro de una proteína de fusión para ejercer sus efectos inhibidores; dichas proteínas grandes no se disolverían eficazmente a través de las capas cutáneas superiores para acceder al sitio de reacción inflamatorio. Además, en un nivel práctico, los péptidos de fusión que tienen la secuencia peptídica inhibidora serían demasiado grandes y caros para su inclusión en un producto tópico.
4. La ruta de señalización de NF- κ B es la ruta predominante directamente implicada en la regulación de citocinas proinflamatorias y respuesta a la tensión. Se ha demostrado que la exposición de células cutáneas a diversos activadores de NF- κ B, incluyendo TNF- α , lipopolisacáridos y luz UV conduce a la fosforilación y degradación de la proteína inhibidora I κ B. NF- κ B liberado se transloca posteriormente al núcleo en el que modula la expresión de citocinas.
5. Diversos tipos de colágeno contribuyen a las matrices extracelulares comprendidas en diferentes tejidos conectivos del cuerpo. Estos colágenos diferentes se degradan por MMP específicos producidos por fibroblastos, otras células de tejido conectivo y células inflamatorias que se inducen por citocinas proinflamatorias tales como IL-1 y TNF. Resulta evidente que IL-1, IL-6, TNF- α e interferones (IFN- α y IFN- γ) que se liberan en respuesta a estímulos inflamatorios son inductores potentes de MMP. Aunque la regulación de la secreción de MMP depende del tipo celular y estímulo, se ha demostrado que el factor transcripcional AP-1 está ligado directamente a la regulación positiva de MMP-1 en fibroblastos. Se ha mostrado también *in vitro* e *in vivo* que la radiación UV induce actividad AP-1 y posterior expresión de MMP en la piel.

Basándose en esta información se ha postulado que, aunque se ha mostrado que el péptido PXQXX-(aromático/ácido) (SEQ ID NO: 16) solamente inhibe procesos inflamatorios no inducidos por UV, podría idearse una secuencia relacionada que sea capaz de inhibir la inflamación inducida por UV sin requerir la incorporación dentro de una proteína de fusión (es decir, el péptido sería un péptido corto). Los ejemplos 1-5 posteriores se refieren a este asunto. El ejemplo 6 se refiere al uso general de inhibidores de proteasa en composiciones que comprenden péptidos bioactivos.

Ejemplo 1: Diseño y síntesis de péptidos que están relacionados con el péptido PXQXX-(aromático/ácido) (SEQ ID NO: 16).

El motivo para diseñar los péptidos de la invención implicó los siguientes parámetros:

1. Los péptidos son de solamente cuatro aminoácidos de longitud (es decir, tetrapéptidos menores de 500 Dalton).
2. Las secuencias se seleccionan del dominio de unión conservado [PXQXX-(aromático/ácido)] (SEQ ID NO: 16) de proteínas de unión de TRAF6.
3. Secuencias tetrapeptídicas conservan la prolina en la posición 1 y el glutamato en la posición 3 de PXQXX-(aromático/ácido) (SEQ ID NO: 16).
4. Las posiciones 2 y 4 son restos de aminoácidos asignados que existen en estos sitios en formas de origen natural de PXQXX-(aromático/ácido) (SEQ ID NO: 16):
 - a. Posición 2: Q, T, L, G, E, V o P.
 - b. Posición 4: I, M, D, V, N, S o T.
5. Para crear variación adicional, también se usó un resto con carga positiva en la posición 4; dicha colocación de aminoácidos se ha evitado en la naturaleza.

Síntesis de péptidos: Todos los péptidos se sintetizaron usando química Fmoc convencional en un sintetizador de péptidos múltiple Advanced ChemTech (Louisville, KY) Apex 396. La resina de amida de Rink se lavó en primer lugar y se prehinchó con DMF. El grupo protector de Fmoc se retiró con piperidina al 25 % en DMF, después de lo cual la resina se lavó para retirar las trazas de piperidina. Los monómeros de aminoácidos de Fmoc se preactivaron en una solución equimolar (0,5 M) de HOAt o HOBt en DMF. Los acoplamientos de amida se llevaron a cabo usando HATU, PyBop o HBTU y un exceso molar de 2,5 a 5 veces de aminoácido en condiciones básicas usando una base con impedimentos estéricos (diisopropiletilamina). Se supervisó la eficacia de acoplamiento usando el ensayo de Kaiser convencional.

Se consiguió escisión del péptido del engarce lábil por ácidos usando ácido trifluoroacético al 95 % y agua con los neutralizantes apropiados añadidos. Después de retirada del bloque de escisión, estos péptidos se purificaron y se analizaron mediante HPLC usando una columna C-18 de fase inversa y espectrometría de masas. Se consiguió confirmación de secuencia primaria y purificación preparatoria usando un sistema CL/EM/EM (ABI API2000). Se proporcionan secuencias de los péptidos preparados en la Tabla 1.

HBX N.º	P N.º	SEQ ID NO	Secuencia (extremo N→C)
20	1422	1	PQEK-NH ₂
21	1423	2	PQEI-NH ₂
22	1424	3	PQEM-NH ₂
23	1425	4	PTED-NH ₂
24	1426	5	PGED-NH ₂
25	1427	6	PLEV-NH ₂
26	1428	7	PQEN-NH ₂
27	1429	8	PVES-NH ₂
28	1430	9	PEES-NH ₂
29	1431	10	PVET-NH ₂
30	1432	11	PEET-NH ₂
31	1433	12	PPEN-NH ₂
32	1434	13	PTEN-NH ₂

15 Ejemplo 2: Cultivos celulares y detección de IL-6 y MMP-1.

Se emplearon células epiteliales de piel humana (ATCC CRL-2592), queratinocitos (ATCC CRL-2404) y fibroblastos de piel (ATCC CRL-7481) en el estudio. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se permitió que crecieran hasta > 95 % de confluencia en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; L-glutamina 4 mM, glucosa 4,5 g/l) ajustado para contener bicarbonato sódico 1,5 g/l y complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS). Para queratinocitos, las células se cultivaron en medio de cultivo de queratinocitos (sin suero) complementado con factor de crecimiento epitelial recombinante humano 5 ng/ml (EGF; Invitrogen, Grand Island, NY). Después de que la monocapa celular alcanzó > 95 % de confluencia, las células se privaron de suero o se privaron de EGF durante 24 horas en medio completo sin suero. Se generó UVA o UVB usando una lámpara de UVLMS (modelo 4-W, ensamblaje de 3UV; Upland, CA) con la longitud de onda de irradiación ajustada a 365 o 302 nm, respectivamente. La lámpara de UV se colocó a 15 cm por encima de la placa de cultivo tisular. Antes del tratamiento con UV, el medio de cultivo tisular se reemplazó con PBS, después de lo cual las células se colocaron bajo la lámpara de UVB (450 µW/cm², medido usando un radiómetro) durante 35 segundos (células epiteliales y fibroblastos) o 25 segundos (queratinocitos). Se realizó tratamiento de UVA (500 µW/cm²) durante 30 segundos con fibroblastos. Después del tratamiento de UV, el PBS se reemplazó inmediatamente con medio completo (sin suero o EGF) que no contenía péptido o contenía péptido a una concentración específica, y las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ 5 % durante 15-24 horas. El medio celular se recogió después y se centrifugó a 15000 rpm durante 2 minutos para retirar los residuos celulares. Se midieron los niveles de IL-6 y MMP-1 en el medio, respectivamente, usando kits de ELISA de IL-6 humana (DIACLONE, Stamford, CT) y MMP-1 (Calbiochem, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Estas mediciones actuaron como indicadores de la actividad inflamatoria celular en respuesta a exposición a UV.

Ejemplo 3: Exploración de péptidos con respecto a actividad antiinflamatoria: inhibición de expresión de IL-6 inducida por UV en células epiteliales de piel humana

Como se muestra en la Figura 1, las células epiteliales humanas regulan positivamente la expresión de IL-6 en respuesta a irradiación de UVB. Todos los tetrapéptidos enumerados en la Tabla 1 se sometieron a un ensayo de exploración a 40 µg/ml con respecto a regulación negativa potencial de esta respuesta (datos no mostrados). Los péptidos que regulaban negativamente la expresión de IL-6 en un primer experimento se volvieron a ensayar en un segundo experimento, cuyos resultados se muestran en la Figura 1.

Ambos tetrapéptidos P1422 (SEQ ID NO: 1) y P1423 (SEQ ID NO: 2) a 40 µg/ml mostraban represión reproducible de expresión de IL-6 inducida por UVB en células epiteliales cutáneas. Como se muestra en la Figura 2, dicha regulación negativa dependía de la concentración para ambos de estos péptidos. P 1422 (SEQ ID NO: 1) redujo los niveles de IL-6 en 19 % y 25 % a 10 y 20 µg/ml, respectivamente; y P1423 (SEQ ID NO: 2) redujo los niveles de IL-6 en 10 % y 20 % a 10 y 20 µg/ml, respectivamente. El hecho de que el efector inhibidor para la expresión de IL-6 no se observó cuando las células se trataron con otros tetrapéptidos aparte de P1422 (SEQ ID NO: 1) y P1423 (SEQ ID NO: 2) sugiere que la actividad antiinflamatoria nueva queda en secuencias específicas tales como SEQ ID NO 14 y SEQ ID NO 15.

Ejemplo 4: Exploración de péptidos con respecto a actividad antiinflamatoria: inhibición de la expresión de IL-6 inducida por UV en queratinocitos y fibroblastos cutáneos humanos.

Se conoce bien que los queratinocitos y fibroblastos epidérmicos irradiados con UV liberan citocinas proinflamatorias. Por tanto estas células, además de células epiteliales cutáneas, pueden contribuir a la cascada de acontecimientos que da como resultado los efectos debilitantes del fotoenvejecimiento. Por estas razones, P 1422 (SEQ ID NO: 1) y P 1423 (SEQ ID NO: 2) se ensayaron con respecto a actividad inhibidora para expresión de IL-6 inducida por UV en estos tipos celulares. Como se muestra en la Figura 3 (A y B), ambos de estos tetrapéptidos regulan negativamente la expresión de IL-6 en queratinocitos humanos tratados con UVB.

Dicha regulación negativa de IL-6 mediada por péptidos también fue evidente en fibroblastos humanos después de exposición a UVB. La inhibición mediada por P 1423 (SEQ ID NO: 2) de la expresión de IL-6 depende de la dosis, ya que el péptido a 2, 5 y 10 µg/ml redujo los niveles de IL-6 en 24, 30 y en 48 %, respectivamente, en comparación con la producción de IL-6 de células de control (sin tratamiento peptídico, datos no mostrados). A 10 µg/ml, P1422 (SEQ ID NO: 1) redujo la expresión de IL-6 estimulada por UV en fibroblastos en 30 % en comparación con la producción de IL-6 de células de control; sin embargo, no se observó reducción significativa de IL-6 cuando se aplicaron concentraciones menores del péptido.

Ejemplo 5: Péptidos de exploración para actividad antiinflamatoria: inhibición de la expresión de MMP-1 inducida por UV en fibroblastos cutáneos humanos.

La irradiación UV (UVA y UVB) aumenta la expresión de MMP-1 y activación de fibroblastos. La mayoría de las MMP producidas en la piel humana en respuesta a exposición a UV proceden de fibroblastos residentes. Ya que la producción de MMP contribuye a reacciones inflamatorias inducidas por UV en piel (por ejemplo, edema) y los efectos crónicos de las mismas (por ejemplo, arrugas), la inhibición de la expresión de MMP-1 en fibroblastos debería aliviar los efectos negativos de la luz del sol en la piel.

Teniendo en cuenta esto, se realizaron experimentos para determinar los efectos de los tetrapéptidos P1422 (SEQ ID NO: 1) y P1423 (SEQ ID NO: 2) en la expresión de MMP-1 inducida por UV en fibroblastos. Después del tratamiento de UVA (500 µW/cm²) durante 45 segundos, los fibroblastos se trataron con o sin estos péptidos. Tanto P 1422 (SEQ ID NO: 1) como P1423 (SEQ ID NO: 2) a 10 µg/ml fueron capaces de regular negativamente la expresión de MMP-1 inducida por UVA, como se muestra en la Figura 4 (A y B).

Fagot y col., (2002, 2004) han mostrado que las citocinas producidas por queratinocitos estimulados por UVB efectúan regulación positiva paracrina de MMP-1 en fibroblastos dérmicos. Este modo de señalización se modeló experimentalmente incubando fibroblastos en medio acondicionado por queratinocitos tratados con UVB. Aunque MMP-1 estaba regulado positivamente en cultivos de fibroblastos tratados de esta manera, los cultivados con tetrapéptido P1422 (SEQ ID NO: 1) o P1423 (SEQ ID NO: 2) mostraron mucha menos inducción de MMP-1 (Figura 5A y B).

En conclusión, estos estudios muestran que ciertos tetrapéptidos basados en el dominio de unión a TRAF6 son capaces de regular negativamente el nivel de IL-6 y MMP-1 inducido por radiación UV. Estos hallazgos son sorprendentes, ya que no se ha conocido previamente que estas rutas inflamatorias, como se inducen por radiación UV, impliquen acontecimientos de señalización relacionados con TRAF6. La inhibición tanto de un mediador inflamatorio principal (IL-6) como de un efector (MMP-1) por estos péptidos cortos demuestra su aplicabilidad para la prevención y el tratamiento de inflamación cutánea y sus efectos deletéreos.

Ejemplo 6: Realizaciones de la invención que incorporan un inhibidor de proteasa

La presente invención también se dirige a formulaciones de cuidado de la piel que contienen inhibidores de proteasa en combinación con péptidos bioactivos. Se esperaría que dichas composiciones muestren actividad cosmética y terapéutica con respecto a la piel y otras superficies epiteliales (por ejemplo, superficies mucosas). Los inhibidores de serina proteasa son un componente ejemplar de la invención. Otro aspecto de la presente invención son procedimientos para usar composiciones que contienen péptidos bioactivos e inhibidores de proteasa para efectuar cambios terapéuticos y cosméticos en la piel.

Se usa una amplia serie de ingredientes peptídicos en la industria cosmética y el cuidado de la piel para suministrar una serie de bioactividades a y dentro de la piel (Tabla 2). Se ha documentado bien que la capa externa de la piel, el estrato córneo (SC), contiene una serie de proteasas capaces de degradar proteínas y péptidos. Las bioactividades de ciertos péptidos cuando se aplican a la piel se ejercen en el SC. Por tanto, las proteasas localizadas en el SC constituyen una barrera para conseguir los beneficios terapéuticos y/o cosméticos completos de aplicaciones cutáneas tópicas que comprenden péptidos bioactivos.

El SC contiene al menos tres familias de proteasas: serina, cisteína y aspartato proteasas. Las serina proteasas (SP) incluyen las proteasas específicas de epidermis calicreína 5 (también conocida como enzima triptica SC, SCTE) (Brattsand y Egelrud, 1999) y calicreína-7 (también conocida como enzima quimotriptica SC) (Hansson y col., 1994). Se sabe que ambas de estas calicreínas están implicadas en procesos descamantes (es decir, desprendimiento de la piel). Son serina proteasas adicionales que se han aislado en la piel plasmína y uroquinasa (Voegeli y col., 2007). SC tiol proteasa (SCTP) y catepsina D son algunas de las cisteína y aspartato proteasas, respectivamente, presentes en el SC (Bernard y col., 2003; Horikoshi y col., 1998).

La variación estacional en las características biofísicas y biológicas del SC está bien documentada. En particular, se ha mostrado que el invierno afecta más gravemente a las propiedades de la piel expuesta frente a piel cubierta de forma rutinaria. Además, cuando está comprometido, tal como en condiciones de piel seca, se ha mostrado que el SC facial contiene niveles aumentados de citocinas y proteasas proinflamatorias. Voegeli y col., (2007) examinaron la distribución de actividades serina proteasa claves (calicreína-5, calicreína-7, uroquinasa, plasmína y una enzima de tipo triptasa) en diferentes capas de SC de la mejilla y el antebrazo analizando tiras de cinta consecutivas de sujetos caucásicos sanos durante el invierno y el verano. En comparación con los niveles de actividad observados en SC del antebrazo, los niveles de actividad de plasmína, uroquinasa y triptasa en la cara eran aproximadamente de cinco a ocho veces mayores, mientras que los niveles de actividad de calicreínas -5 y -7 en la mejilla eran aproximadamente de dos a cuatro veces mayores. Por lo tanto, las áreas de piel protegidas muestran menos actividad proteasa que las áreas que están expuestas al ambiente, lo que indica posiblemente inflamación subclínica en piel expuesta. La siguiente información también se obtuvo por Voegeli y col., (2007): (i) en piel del antebrazo sana normal, el SC externo muestra mayor actividad serina proteasa que en sus capas más profundas; (ii) en comparación con el antebrazo, las actividades tipo uroquinasa y plasmína están elevadas en tiras de SC de la mejilla, lo que confirma la activación de la cascada de plasminógeno; y (iii) la actividad de tipo triptasa en el SC también está elevada en muestras de la mejilla, lo que indica posiblemente la implicación de mastocitos en piel con barrera comprometida y/o la síntesis de una nueva enzima de tipo triptasa por queratinocitos. Como hay una elevación de la uroquinasa, plasmína, calicreína-5, calicreína-7 y actividades enzimáticas de tipo triptasa observadas en SC derivado de piel de mejillas clínicamente normales, se anticipa que existirán actividades aún mayores de estas enzimas en condiciones cutáneas en las que la barrera epidérmica está alterada.

Ha habido varios estudios recientes que ligan las proteasas presentes en el SC a condiciones clínicas de la piel tales como rosácea y psoriasis (Borgono y col., 2007; Yamasaki y col., 2007; Pampalakis y Sotiropoulou, 2007). En estos casos, las proteasas en cuestión son las serina proteasas de tipo tripsina y tipo quimotripsina de la familia de calicreína. El papel de las proteasas en la rosácea puede basarse parcialmente en la degradación del péptido inmunitario innato del huésped LL-37 en fragmentos proinflamatorios (Yamasaki y col., 2007). Con la psoriasis, las proteasas de calicreína responsables de la descamación de células superficiales escapan de la regulación y provocan un aumento en la descamación que conduce a formación de escamas, lo que sucede por el desprendimiento excesivo de piel. Estas condiciones conducen a inflamación y otros síntomas clínicos significativos. En un nivel subclínico estos procesos pueden conducir a piel seca, piel enrojecida, una degradación de la función de barrera (que conduce a una pérdida de humedad cutánea), una degradación de la matriz extracelular y envejecimiento cutáneo prematuro. Por lo tanto, el uso de principios activos capaces de ralentizar este proceso inhibiendo las proteasas de la piel es significativamente valioso.

Se usan principios activos peptídicos en productos cosméticos y de cuidado de la piel para proporcionar bioactividad capaz de mejorar la apariencia, sensación y estética de la piel. Dichos péptidos bioactivos también pueden usarse para fines terapéuticos, tal como en el tratamiento de heridas o quemaduras. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la piel expresa proteasas capaces de degradar proteínas y péptidos, impidiendo de este modo la capacidad de ciertos péptidos para ejercer sus efectos saludables. Este efecto negativo de proteasas que residen en el SC es además de los efectos negativos de los mismos con respecto a la inflamación y renovación de células cutáneas. Estos problemas se superan por este aspecto de la presente invención, que se refiere en parte a formulaciones que comprenden tanto un péptido bioactivo como un inhibidor de proteasa. Dicha combinación proporciona a formulaciones de cuidado de la piel tres características deseables: (i) el componente peptídico

proporciona una bioactividad específica (por ejemplo, antiinflamación, estimulación/proliferación/migración celular, etc.); (ii) el componente inhibidor de proteasa protege el componente peptídico de la degradación, dando como resultado efectos peptídicos saludables prolongados; y (iii) el componente inhibidor de proteasa reduce los efectos negativos generales de proteasas para la piel, tales como rojez y formación de escamas. Esta última característica (iii) en parte implica la protección de péptidos bioactivos que son endógenos del sitio de aplicación de la formulación; por lo tanto, el inhibidor de proteasa potencia las actividades tanto del péptido aplicado por vía ectópica como de los péptidos que se expresan de forma natural por la piel.

La presente invención proporciona una estrategia innovadora para potenciar la actividad de péptidos en preparaciones terapéuticas y cosméticas. Dicha potenciación funcional del péptido se obtiene combinando un péptido de interés con inhibidores de proteasa apropiados. No solamente el inhibidor de proteasa actúa para prolongar la actividad terapéutica aumentando la semivida peptídica, sino que el inhibidor también evita la producción de fragmentos proinflamatorios de proteínas de piel nativa. Dicha combinación de péptido e inhibidor de proteasa proporciona por lo tanto una formulación del cuidado de la piel con un nivel de eficacia triple. Mientras que cada componente, el péptido y el inhibidor de proteasa, suministra su propio efecto saludable, su combinación actúa de forma sinérgica para hacer a la formulación mucho más potente que una formulación que tenga solamente uno de estos componentes.

La presente invención también proporciona un beneficio de coste sustancial. Un péptido usado en combinación con un inhibidor de proteasa apropiado mostrará una mayor semivida. Por lo tanto, no es necesario que dicho péptido se proporcione a los niveles mayores requeridos cuando el péptido se usa en ausencia de inhibidor de proteasa. El coste de inhibidores de proteasa para preparar la formulación peptídica bioactiva de la presente invención es significativamente menor que el coste de producir las cantidades mayores de péptido que serían necesarias para conseguir el nivel de actividad de la formulación.

Se conocen bien en la técnica péptidos bioactivos; los que pueden incorporarse en este aspecto de la invención son preferentemente de menos de 200 restos de aminoácidos de longitud, menos de 100 restos de aminoácidos de longitud, menos de 50 restos de aminoácidos de longitud, menos de 45 restos de aminoácidos de longitud, menos de 40 restos de aminoácidos de longitud, menos de 35 restos de aminoácidos de longitud, menos de 30 restos de aminoácidos de longitud, menos de 25 restos de aminoácidos de longitud, menos de 20 restos de aminoácidos de longitud, menos de 15 restos de aminoácidos de longitud, o menos de 10 restos de aminoácidos de longitud. Otros péptidos bioactivos que pueden usarse en la presente invención son preferentemente de al menos 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácidos de longitud.

Los ejemplos no limitantes de péptidos bioactivos que pueden incorporarse en diversas realizaciones de la invención objeto son numerosos y se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.255.282 (véase Figuras 3A/B y las reivindicaciones en la misma), patente de Estados Unidos n.º 6.303.568 (véase Tabla 1 en la misma), patente de Estados Unidos n.º 5.962.410 (véase Tabla 1 en la misma), patente de Estados Unidos n.º 7.875.744 (véase Tabla 1 y las reivindicaciones en la misma), patente de Estados Unidos n.º 7.407.940 (véase Tabla 1 y las reivindicaciones en la misma), publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 20070299015 (n.º de serie de solicitud 11/811.876) (véase Tablas 1, 5 y las reivindicaciones en la misma), n.º de serie de solicitud 12/005.653 (véase Tabla 1 y las reivindicaciones en la misma), patente de Estados Unidos n.º 6.288.212 (véase Tabla 1 y la única reivindicación en la misma), patente de Estados Unidos n.º 6.337.317 (véase reivindicaciones en la misma), patente de Estados Unidos n.º 6.172.185 (véase Tabla 1 y las reivindicaciones en la misma), y solicitud n.º de serie 61/000.815 (véase Tabla 1 y las reivindicaciones en la misma). Los tetrapéptidos desvelados en la presente solicitud (Tabla 1 y SEQ ID NO: 14-15) también pueden incorporarse en este aspecto de la invención. Uno o más péptidos bioactivos pueden usarse en la invención. Aunque la invención se refiere principalmente a la incorporación de péptidos que tengan una actividad inherente, que puede depender o no del ambiente en el que se coloca el péptido (es decir, el péptido está solamente activo cuando se coloca en un contexto particular), también pueden usarse en la invención péptidos que no tienen (o no se sabe que tengan) ninguna actividad particular.

Otros Ejemplos no limitantes de péptidos bioactivos que pueden incorporarse en diversas realizaciones de la invención objeto se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2: Ciertos péptidos comercializados actualmente para su inclusión como principios activos en productos para el cuidado de la piel.^a

COMPañÍA ^b	NOMBRE	ACTIVIDAD	PRODUCTOS EN PREMEZCLA	FUENTE
Atrium	Tripéptido-2	Estimulación de ECM mediante inhibición de MMP-1	ECM-protect®	No desvelada
Atrium	Tripéptido-1	Estimulación de ECM mediante factor de crecimiento	Kollaren®	HGF

(continuación)

COMPAÑÍA ^b	NOMBRE	ACTIVIDAD	PRODUCTOS EN PREMEZCLA	FUENTE
Atrium	Acetil tetrapéptido-2	Reducción de pérdida de factores tímicos	Thymulen®4	Timopoyetina
Atrium	Acetil péptido-1	Aumento de melanina mediante regulación de MSH	Melitane®	Agonista de MSH
Atrium	Nonapéptido-1	Inhibición de la activación de tirosinasa	Melanostatine®	Antagonista de MSH
Grant Indust.	Palmitoil hexapéptido-6	Reparación dérmica	Matrix Rebuilder™	Inmunidad innata
Grant Indust.	Oligopéptido-10	Protección dérmica	InvisaSkin-64™	Inmunidad innata
Lipotec	Tripéptido-1	Inhibe la glucosilación del colágeno	Aldenine®, Trylagen™	Suero humano
Lipotec	Tripéptido-10 citrulina	Fibrilogénesis del colágeno	Decorinyl, Trylagen™	Decorina
Lipotec	Acetil tetrapéptido-5	Reducción de edema por inhibición de ACE	Eyeseryl®	No desvelada
Lipotec	Pentapéptido-3	Tipo botox mediante encefalinas miméticas	Leuphasyll®	No desvelada
Lipotec	Acetil hexapéptido-3 (u -8)	Tipo botox mediante inhibición de SNARE	Argireline®	SNAP-25
Lipotec	Acetil octatapéptido-1	Tipo botox mediante inhibición de SNARE	SNAP-8	SNAP-25
Lipotec	Hexapéptido-10	Aumenta la proliferación celular y la laminina V	Serilesine®	Laminina
Pentapharm	Palmitoil Tripéptido-5	Síntesis de colágeno mediante TGF-beta	Syn®-coll	Trombospondina 1
Pentapharm	Dipéptido diaminobutiroil benzilamida diacetato	Tipo botox mediante receptor de acetilcolina	Syn®-ake	Waglerina 1
Pentapharm	Oligopéptido-20	Inhibidor de MMP mediante TIMP	Pepha®-timp	TIMP-2
Pentapharm	Pentapéptido-3	Tipo botox mediante receptor de acetilcolina	Vialox®	No desvelada
Procyte	GHK de cobre / AHK	Curación de heridas	Ejemplo de marca Neova	Suero humano
Sederma	Dipéptido-2	Drenaje linfático mediante inhibición de ACE	Eyeliss™	Colza
Sederma	Palmitoil Oligopéptido	Síntesis de colágeno mediante señalización	Eyeliss™, Matrixyl™ 3000	Suero humano

(continuación)

COMPañÍA ^b	NOMBRE	ACTIVIDAD	PRODUCTOS EN PREMEZCLA	FUENTE
Sederma	Palmitoil Tetrapéptido-7 (formalmente -3)	Elasticidad mediante reducción de IL6	Matrixyl 3000™, Rigin™	IgG / matriquina
Sederma	Palmitoil pentapéptido-3	Estimulación de colágeno mediante señalización	Matrixyl™	Procolágeno
Sederma	Palmitoil Oligopéptido	Actividad de tipo ácido retinoico	Biopéptido-CL™	Colágeno
Sederma	Palmitoil Oligopéptido	Aumenta el colágeno y HA	Biopéptido-EL™	Elastina

^a Abreviaturas usadas en la Tabla: ACE, enzima convertidora de angiotensina 1; ECM, matriz extracelular; HA, ácido hialurónico; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; MMP, metaloproteinasas de matriz; MSH, hormona estimulante de melanocitos; SNARE, receptor de unión a NSF soluble (NSF, factor sensible a N-etilmaleimida); TGF-β, factor de crecimiento transformante-β; TIMP, inhibidor tisular de MMP.

^b Localización del fabricante: Atrium Biotechnologies (Quebec City, Canadá), Grant Industries (Elmwood, NJ), Lipotec (Barcelona, España), Pentapharm (Basilea, Suiza), Procyte (Photomedix, Montgomeryville, PA), Sederma (Le Perray en Yvelines, Francia).

Objetivo del estudio

5 El uso de inhibidores de proteasa en productos cosméticos y de cuidado de la piel terapéuticos en combinación con péptidos bioactivos para generar múltiples beneficios no se ha explorado. Por lo tanto, los presentes inventores pretenden determinar si los inhibidores de proteasa podrían proteger péptidos bioactivos, derivados tanto sintéticamente como de forma innata, de la degradación proteolítica. Dichos inhibidores de proteasa serían candidatos para su uso en formulaciones de cuidado cutáneo que contienen péptidos.

Materiales de ensayo y metodología

10 Los siguientes inhibidores de proteasa se caracterizaron por la capacidad para bloquear la degradación de péptidos bioactivos en ciertas condiciones proteolíticas: aprotinina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), ácido tranexámico (Sigma-Aldrich), benzamidina (Sigma-Aldrich), Fmoc-lys(Boc) (Chem-Impex, Chicago, IL), Fmoc-arg (Pmc) (Chem-Impex), benzil-arg-nitroanilida (Sigma-Aldrich) y benzil-arg-naftilamida (Sigma-Aldrich).

15 Los siguientes péptidos se usaron como péptidos de principios bioactivos del cuidado de la piel representativos y péptidos cutáneos innatos: oligopéptido-10 (HB64) (Peptisyntha, Torrance, CA), cuya secuencia es FAKALKALKALKAL-NH₂ (SEQ ID NO: 17) (refiérase a la patente de Estados Unidos n.º 7.381.704); hexapéptido-21 (HB168) (Neo-MPS, San Diego, CA), cuya secuencia es FALLKL-NH₂ (SEQ ID NO: 18) (refiérase a la patente de Estados Unidos n.º 7.381.704); HB1345 (Peptisyntha), cuya secuencia es decanoil-KFKWPW-NH₂ (SEQ ID NO: 19) (refiérase a la patente de Estados Unidos n.º 7.407.940); y LL-37 (LLGDFFRKSKEKIG-KEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES, SEQ ID NO: 20), que se desvela en Johansson y col. (1998). Aunque los péptidos HB64, HB168 y HB1345 tienen un origen sintético, LL-37 se caracterizó originalmente para expresarse de forma innata por células humanas.

25 Las siguientes proteasas se emplearon en la reducción de la presente invención a la práctica: quimotripsina (Sigma-Aldrich), que escinde cadenas de aminoácidos en el lado carboxilo de tirosina, triptófano y fenilalanina; tripsina (Sigma-Aldrich), que escinde cadenas de aminoácidos en el lado carboxilo de lisina y arginina, excepto cuando una se sigue de prolina; elastasa (Sigma-Aldrich), que es una serina proteasa que escinde cadenas de aminoácidos en el lado carboxilo de aminoácidos pequeños, hidrófobos, tales como glicinas, alanina, y valina; calicreína (Sigma-Aldrich), que es una serina proteasa; plasmina (Sigma-Aldrich), que es una serina proteasa; y uroquinasa, que es una serina proteasa.

Procedimientos para medir la degradación peptídica

30 Se usaron péptidos de origen sintético y LL-37 en los experimentos de procesamiento de proteasa a una concentración de 1-2 mg/ml en concentración de tampón final de MOPS 0,5 M pH 8,5/NaCl 0,5 M. Se usaron proteasas a una concentración de 0,020-0,050 mg/ml.

Los experimentos se procesaron por pares, uno con inhibidor de proteasa y uno sin un inhibidor de proteasa. Se recogieron espectros de cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM) en puntos temporales de aproximadamente 1 minuto, 1 hora, 4 horas y 24 horas desde el momento de la adición de proteasa al péptido (tiempo cero). Se recogieron espectros de CL/EM usando un gradiente de fase inversa convencional que comienza en acetonitrilo al 5 % y se eleva hasta acetonitrilo al 65 % en 25 minutos. Se supervisaron iones parentales peptídicos con trazas de XIC (recuento iónico extraído), mientras que se observaron fragmentos peptídicos con trazas de TIC (recuento iónico total), como se analiza posteriormente.

Las proteasas empleadas en el estudio se disolvieron inicialmente en una solución de NaCl 1 M, mientras que los péptidos se disolvieron en tampón MOPS 1 M a pH 8,5. Las soluciones se equilibraron a 37 °C y después se mezclaron a una relación de 1:1 para comenzar cada experimento. También se usaron concentraciones de tampón menores (MOPS 0,1 M pH 8,5 y NaCl 0,2 M). Se ensayaron inhibidores de proteasa a varias concentraciones diferentes (bajas y altas desde 0,02 mg/ml a 40 mg/ml) frente a una proteasa dada.

Ciertos procedimientos de espectrometría de masas usados en este estudio se analizan posteriormente con respecto a fines de instrucción para describir cómo los datos de la Tabla 3 (posterior) se generaron e interpretaron. Se obtuvieron tres resultados de datos diferentes usando espectrometría de masas en la supervisión del procedimiento de la invención:

A. Traza de TIC (recuento iónico total), que es una lectura de todos los pesos moleculares (todas las moléculas) que pasan a través de la columna/espectrómetro de masas en un periodo de tiempo específico.

B. Traza de XIC (recuento iónico extraído), que es una lectura que representa la extracción de un peso molecular específico de la traza de TIC.

C. Un espectro de masas, que representa una serie de entidades moleculares dentro del pico seleccionado de la traza de TIC o XIC.

Ya que estos procedimientos se conocen bien en la técnica, el siguiente análisis se limitará a describir los resultados observados en los experimentos de espectrometría de masas (es decir, datos no mostrados).

Resultados

Los siguientes Ejemplos demuestran cómo los diferentes resultados de espectrometría de masas descritos anteriormente pueden usarse para supervisar la degradación mediada por proteasa, e inhibición de la misma, de péptidos de inmunidad sintéticos (por ejemplo, HB64) e innatos (por ejemplo, LL-37). El espectrómetro de masas usado en estos estudios tiene un límite de detección por debajo del que el peso molecular específico de una molécula no puede identificarse a partir de la traza de TIC. En estas situaciones por debajo de detección, se supuso que el péptido ensayado estaba completamente degradado.

Se obtuvieron trazas de TIC para seguir la degradación/digestión de oligopéptido-10 (HB64) por la proteasa tripsina durante un periodo de tiempo de 23 horas. Específicamente, se midió la degradación peptídica por CL/EM en tiempo cero, 1 hora y 23 horas. Resultó evidente que el pico parental (que representa el péptido de longitud completa, no degradado) en las trazas de TIC se redujo a lo largo del tiempo y los picos para diversos productos de degradación aumentaron en intensidad a lo largo del tiempo. Un producto de digestión primario de esta proteólisis mediada por tripsina es el tetrapéptido ALLK (SEQ ID NO: 21).

Resulta interesante que las trazas de TIC mostraron que en un experimento repetido que incluía el inhibidor de proteasa aprotinina, el péptido parental estaba protegido contra degradación por la proteasa. Este resultado es coherente con la expectativa de que un péptido bioactivo conservaría su estructura, y por lo tanto su función, durante un periodo de tiempo más largo cuando se aplica a la piel en combinación con un inhibidor de proteasa. La presente invención sería por lo tanto más eficaz en comparación con formulaciones cutáneas que contuvieran un péptido bioactivo solo a la misma concentración. Además, incluso si el péptido bioactivo seleccionado no pudiera ser objeto de degradación proteolítica por razones de longitud y/o secuencia, la inclusión de un inhibidor de proteasa evitaría la degradación de péptidos saludables que se expresan de forma natural en el sitio de aplicación de formulación (es decir, se protegerían péptidos endógenos beneficiosos).

Una traza de TIC del péptido LL-37 que se había expuesto a plasmina durante solamente 1 minuto sirvió para proporcionar una lectura de tiempo cero. La presencia de péptidos de LL-37 intactos se detectó a aproximadamente el tiempo de retención de 16 minutos como se confirmó por una lectura de espectro de masas; tres picos distintos a 899,5, 1123,4 y 1497,6 uma (unidades de masa atómica) representaron diferentes formas de carga, respectivamente, del mismo péptido (LL-37).

Después de 1 hora de incubación con plasmina, el peso molecular del péptido parental LL-37 era indetectable y aparecieron picos de traza de TIC con un tiempo de retención menor (11 minutos a 13 minutos). Estos picos representan productos de degradación de LL-37 con pesos moleculares tan bajos como 450. Se determinó que la secuencia exacta de uno de los productos de degradación de LL-37 que se detectó era RIVQRIKDFLRNLVPRTES (SEQ ID NO: 22) basándose en una coincidencia única en peso molecular con esta parte de LL-37. Se observaron tres formas de carga diferentes de SEQ ID NO: 22, al igual que se había observado con LL-37 de longitud completa.

Se repitió el experimento anterior con LL-37 y plasmina, pero esta vez incluyendo el inhibidor de proteasa ácido tranexámico en la reacción. Se obtuvo una traza de TIC de esta reacción después de un periodo de incubación de 1 hora. Se tomó un espectro de masas en el tiempo de retención de aproximadamente 16,5 minutos. Como resultó evidente tanto en la traza de TIC como en el espectro de masas, se produjeron productos de degradación de LL-37; de forma importante sin embargo, el péptido parental, intacto, completo, aún era detectable a niveles apreciables como tres picos espectrales de masas, con diferencias de carga proporcionadas. Este resultado es coherente con los resultados del análisis anterior usando un conjunto de inhibidor/proteasa/péptido diferente. Por lo tanto, se esperaba que este aspecto de la presente invención fuera aplicable a diversas combinaciones de péptidos bioactivos e inhibidores de proteasa; esta expectativa se corrobora adicionalmente con las pruebas presentadas a continuación en la Tabla 3.

En otro experimento, la degradación de oligopéptido-10 (HB64) después de una exposición de 4 horas a plasmina se supervisó con trazas de TIC y XIC. A partir de este análisis, fue evidente que la plasmina se dirige a y degrada HB64. La traza de XIC (a 799,5 uma) mostró que, aunque la mayoría del péptido HB64 estaba degradado, algo del péptido parental aún podría detectarse. Cuando esta reacción incluía ácido tranexámico, fue evidente a partir de las trazas de TIC y XIC que el péptido HB64 estaba protegido de proteólisis mediada por plasmina. De hecho, la cantidad de péptido parental en la reacción como se determina por una traza de XIC fue cinco veces mayor en comparación con cuando el péptido se incubó con plasmina solamente.

Se realizó una serie de experimentos empleando la metodología anteriormente descrita para determinar la utilidad de la invención con respecto a una serie más amplia de proteasas, péptidos e inhibidores de proteasa. Los datos de este trabajo se resumen en la Tabla 3. Si, en cualquier punto temporal específico, no hubo ningún péptido parental detectable (es decir, la ausencia de péptido no degradado), entonces ese punto temporal estaba documentado como el tiempo requerido para degradación peptídica.

Tabla 3: Los efectos protectores de diversos inhibidores de proteasa frente a diversos péptidos bioactivos.

Proteasa	Conc. µg/ml	Péptido ^a	PM	Inhibidor de proteasa	Conc. mg/ml	Supervivencia	N.º de Expt.
Tripsina	25	HB64	1598	ninguno		<1 h	4
Tripsina	25	HB64	1598	aprotinina	0,02	>24 h	5
Tripsina	25	HB168	702	ninguno		<1 h	6
Tripsina	25	HB168	702	aprotinina	0,02	>24 h	7
Tripsina	25	HB1345	1044	ninguno		<1 h	8
Tripsina	25	HB1345	1044	aprotinina	0,02	>24 h	9
Tripsina	25	HB64	1598	ninguno		<1 h	10
Tripsina	25	HB64	1598	ácido ursólico	0,02	<1 h	11
Tripsina	25	HB64	1598	ninguno		<1 h	12
Tripsina	25	HB64	1598	ácido tranexámico	0,02	<1 h	13
Tripsina	25	HB64	1598	Fmoc-Lys(Boc)	0,02	<1 h	14
Tripsina	25	HB64	1598	Fmoc-Arg(Pmc)	0,02	<1 h	15
Tripsina	25	HB64	1598	benzamidina	0,02	<1 h	16
Tripsina	25	HB64	1598	benzamidina	0,80	>24 h	17
Tripsina	25	HB64	1598	ácido tranexámico	0,80	<1 h	18
Tripsina	25	HB64	1598	benzoil-Arg-nitroanilida	0,80	<1 h	19
Tripsina	25	HB64	1598	benzoil-Arg-naftilamida	0,80	>24 h	20
Tripsina	25	HB64	1598	ácido ursólico	0,80	<24 h	21
Elastasa	25	HB64	1598	ninguno		<1 h	22

(continuación)

Proteasa	Conc. µg/ml	Péptido ^a	PM	Inhibidor de proteasa	Conc. mg/ml	Supervivencia	N.º de Expt.
Elastasa	25	HB64	1598	aprotinina	0,02	<1 h	23
Elastasa	25	HB64	1598	ácido tranexámico	0,80	<1 h	24
Plasmina	25	HB64	1598	ninguno		<4 h	25
Plasmina	25	HB64	1598	ácido tranexámico	0,80	<24 h	26
Calicreína	25	HB64	1598	ninguno		<24 h	27
Calicreína	25	HB64	1598	ácido tranexámico	0,80	<24 h	28
Plasmina	25	HB64	1598	ácido tranexámico	0,80	<6 h	29
Plasmina	25	HB64	1598	ninguno		<6 h	30
Plasmina	50	HB64	1598	ácido tranexámico	10	<6 h	31
Plasmina	46	HB64	1598	ninguno		<4 h	32
Tripsina	22	HB64	1598	ácido tranexámico	10	<1 h	33
Quimotripsina	25	HB64	1598	ninguno		<1 h	34
Quimotripsina	25	HB64	1598	aprotinina	0,02	<24 h	35
Plasmina	22	LL-37	4493	ácido tranexámico	9	<4 h	36
Plasmina	22	LL-37	4493	ninguno		<1 h	37
Plasmina	22	LL-37	4493	ninguno		<45 min	38
Quimotripsina	22	LL-37	4493	ninguno		<1 h	39
Quimotripsina	22	LL-37	4493	ácido tranexámico	9	<1 h	40
Calicreína	22	LL-37	4493	ninguno		<4 h	41
Calicreína	22	LL-37	4493	ácido tranexámico	9	<4 h	42
Plasmina	20	HB64	1598	ninguno		ND	43
Plasmina	20	HB64	1598	ácido tranexámico	40	ND	44
Plasmina	20	HB64	1598	ninguno		<4 h	45
Plasmina	22	HB64	1598	ácido tranexámico	40	<24 h	46
Calicreína	22	LL-37	4493	ninguno		<4 h	47
Calicreína	22	LL-37	4493	aprotinina	0,02	<24 h	48
Calicreína	22	LL-37	4493	ninguno		<1 h	49
Calicreína	22	LL-37	4493	ácido tranexámico	40	<2 h	50
Uroquinasa	22	LL-37	4493	ninguno		<24 h	51
Uroquinasa	22	LL-37	4493	aprotinina	0,02	>24 h	52
Uroquinasa	22	LL-37	4493	ninguno		<24 h	53
Uroquinasa	22	LL-37	4493	ácido tranexámico	40	>24 h	54

(continuación)

Proteasa	Conc. µg/ml	Péptido ^a	PM	Inhibidor de proteasa	Conc. mg/ml	Supervivencia	N.º de Expt.
Calicreína	22	LL-37	4493	ninguno		<1 h	55
Calicreína	22	LL-37	4493	ácido tranexámico + ácido ursólico	20 cada uno	>24 h	56
Calicreína	22	LL-37	4493	DMSO 10 %		<1 h	57

^a Todos los péptidos se usaron a una concentración final de 1 mg/ml.

Sumario

Como se observa en este Ejemplo, algunas de las proteasas más importante en relación con la piel y la degradación peptídica son plasmina, calicreína y uroquinasa. Se ha mostrado que la presente invención actúa contra estas proteasas (por ejemplo, Tabla 3). Resulta importante que los inhibidores de proteasas ensayados tienen excelentes perfiles de seguridad. Por ejemplo, se emplean aprotinina y ácido tranexámico como farmacosistémicos para terapia de coagulación, mientras que se usa ácido ursólico como un cosmético e ingrediente herbal. El objetivo aquí fue identificar un agente (o agentes) capaz de proteger los péptidos innatos y sintéticos de la degradación proteolítica; dichos inhibidores serían útiles en combinación con péptidos bioactivos en productos de cuidados de la piel. Dada la actividad inhibidora del ácido tranexámico frente a un amplio espectro de proteasas, unido a su bajo coste de fabricación, perfil de seguridad y solubilidad, el ácido tranexámico es un inhibidor de proteasa preferido para la práctica de este aspecto de la presente invención.

REFERENCIAS

- Bernard D y col. (2003), Analysis of proteins with caseinolytic activity in a human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cysteine protease and identified the co-called "stratum corneum thiol protease" as cathepsin L2, *J. Invest. Dermatol.* 120:592-600.
- Borgono CA y col. (2007), A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation, *J. Biol. Chem.* 282: 3640-3652.
- Brattsand M y Egelrud T (1999), Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation, *J. Biol. Chem.* 274:30033-30040.
- Hansson L y col. (1994), Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase, *J. Biol. Chem.* 269:19420-19426.
- Horikoshi T y col. (1998), Isoforms of cathepsin D and human epidermal differentiation, *Biochimie* 80:605-612.
- Johansson J y col. (1998), Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37, *J. Biol. Chem.* 273:3718-3724.
- Pampalakis y Sotiropoulou (2007), Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer, *Biochim. Biophys. Acta.* 1776:22-31.
- Voegeli R y col. (2007), Profiling of serine protease activities in human stratum corneum and detection of a stratum corneum tryptase-like enzyme, *Int. J. Cosmet. Sci.* 29:191-200.
- Yamasaki K y col. (2007), Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea, *Nat. Med.* 13:975-980.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Péptidos protectores para cuidado cutáneo

<130> 11181.0039.00PC00

<150> 61/000.815
<151> 29-10-2007

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

15 <400> 1

Pro Gln Glu Lys
1

20 <210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

30 <400> 2

Pro Gln Glu Ile
1

35 <210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

<220>
<221> MOD_RES

45 <222> (4)..(4)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

<400> 3

Pro Gln Glu Met
1

50 <210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

60 <220>
<221> MOD_RES

ES 2 567 706 T3

<222> (4)..(4)

<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

<400> 4

5

Pro Thr Glu Asp
1

<210> 5

<211> 4

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

20

<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

<400> 5

Pro Gly Glu Asp
1

25

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Sintética

<220>

<221> MOD_RES

35

<222> (4)..(4)

<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

<400> 6

Pro Leu Glu Val
1

40

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

50

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

55

<400> 7

Pro Gln Glu Asn
1

5 <210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

15 <400> 8

Pro Val Glu Ser
1

20 <210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

30 <400> 9

Pro Glu Glu Ser
1

35 <210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

<220>
<221> MOD_RES
45 <222> (4)..(4)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

<400> 10

Pro Val Glu Thr
1

50 <210> 11
<211> 4
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

60 <220>

ES 2 567 706 T3

<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

5 <400> 11

Pro Glu Glu Thr
1

10 <210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> PPEN

<400> 12

Pro Pro Glu Asn
1

25 <210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino

40 <400> 13

Pro Thr Glu Asn
1

45 <210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintética

<400> 14

Pro Gln Glu Lys
1

55 <210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 567 706 T3

Phe Ala Leu Leu Lys Leu
1 5

5 <210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo decanoílo

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> El resto de aminoácido se modifica para contener un grupo amino
<400> 19

Lys Phe Lys Trp Pro Trp
1 5

25 <210> 20
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética
<400> 20

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 Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser
35

35 <210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <400> 21

Ala Leu Leu Lys
1

50 <210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido consiste en prolina-glutamina-glutamato-X (P-Q-E-X), en la que X es lisina (K) o isoleucina (I).
- 5 2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido está amidado, lipidado, conjugado con una molécula vehículo en el que la molécula vehículo es una molécula vehículo soluble seleccionada de polímeros de polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona; o una molécula vehículo insoluble seleccionada de silicatos, poliestireno y celulosa, o tiene un resto de aminoácido en la forma D enantiomérica.
3. El péptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos consiste en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.
- 10 4. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
5. Una composición que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que el péptido está presente en una concentración que varía de 0,1 µg/ml a 50 µg/ml.
- 15 7. La composición de la reivindicación 5, en la que la composición está en forma de un aerosol, emulsión, líquido, loción, crema, pasta, pomada, polvo o espuma.
8. La composición de la reivindicación 5, en la que el péptido es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
9. La composición de la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de inflamación en un mamífero mediante la administración a un sitio de inflamación de dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición durante una cantidad de tiempo eficaz.
- 20 10. La composición de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de inflamación en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 9; en la que dicha inflamación se localiza en la piel o tejido mucoso asociado de dicho mamífero.
11. La composición de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de inflamación en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha inflamación se localiza en la piel y se debe a exposición a radiación ultravioleta.
- 25 12. La composición de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de inflamación en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el péptido de la composición es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
13. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de interleucina (IL)-6 o metaloproteinasa de matriz (MMP)-1 por una célula, comprendiendo el procedimiento exponer la célula a un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula muestra expresión reducida de interleucina (IL)-6 o metaloproteinasa de matriz (MMP)-1 después de exposición al péptido.
- 30 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la expresión de la interleucina (IL)-6 o de la metaloproteinasa de matriz (MMP)-1 por la célula es resultado de la exposición de la célula a radiación ultravioleta.
- 35 15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la célula es una célula epitelial, un queratinocito o un fibroblasto.

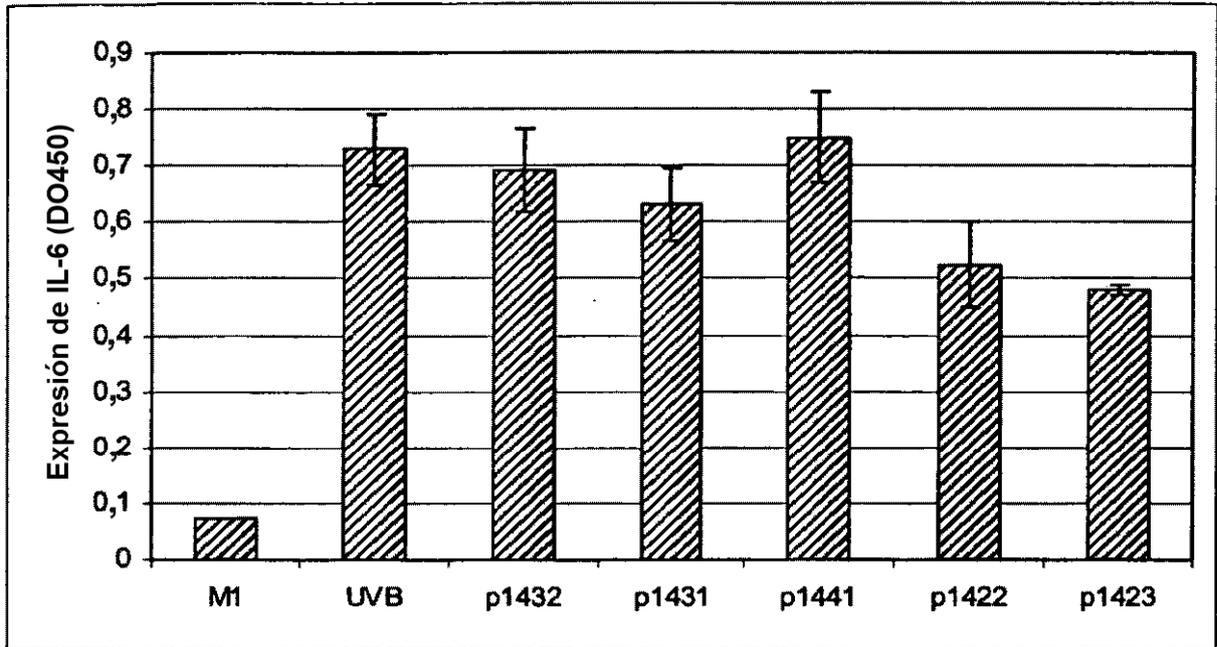


FIG. 1

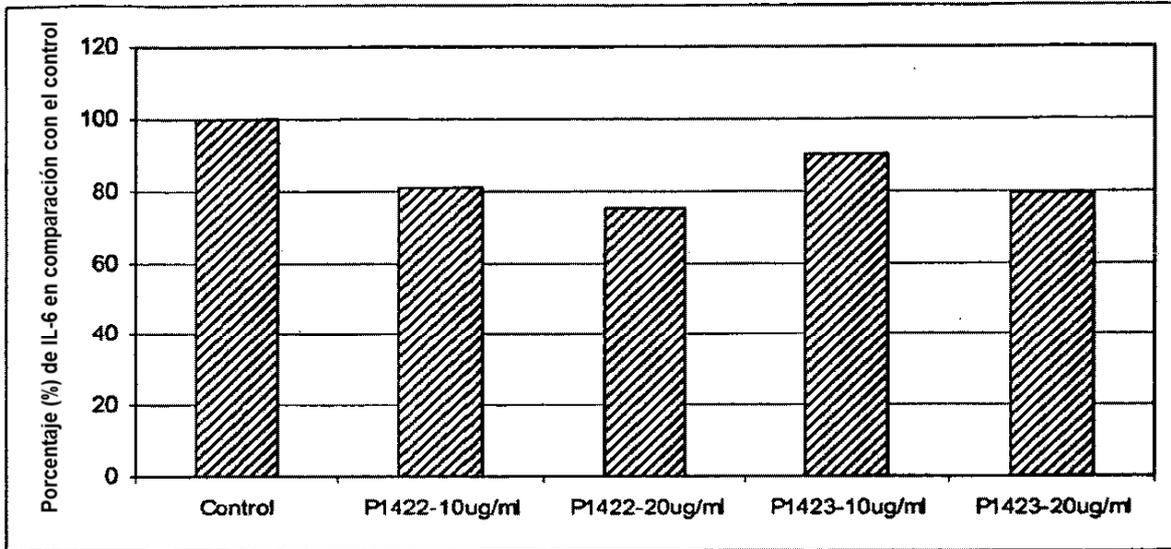
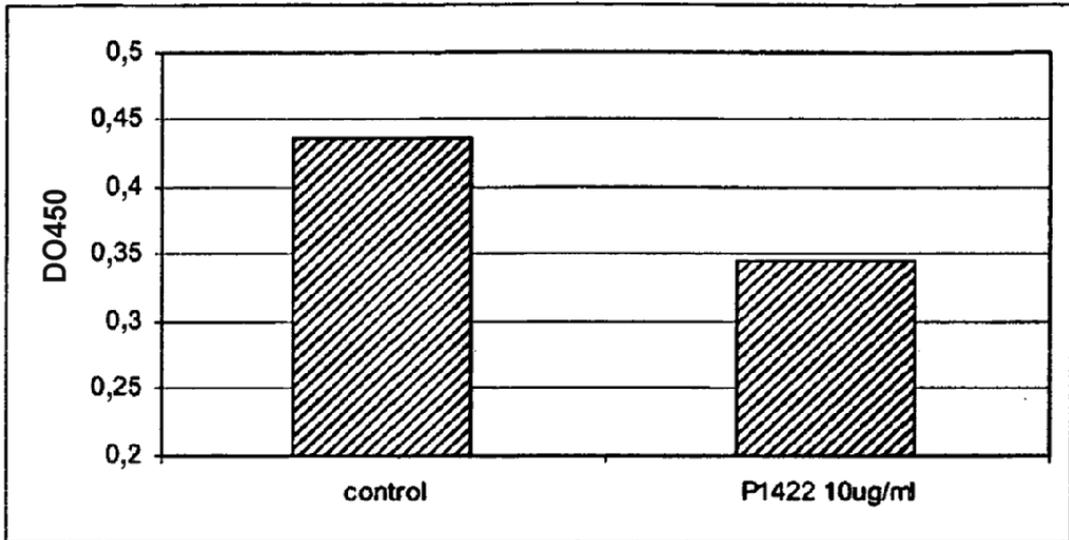


FIG. 2

A



B

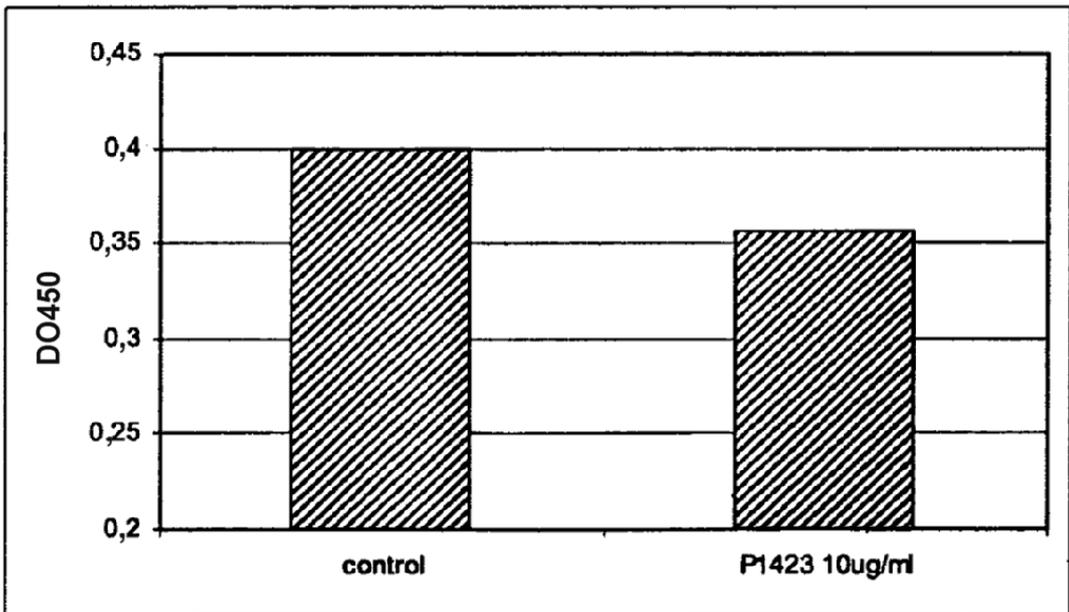
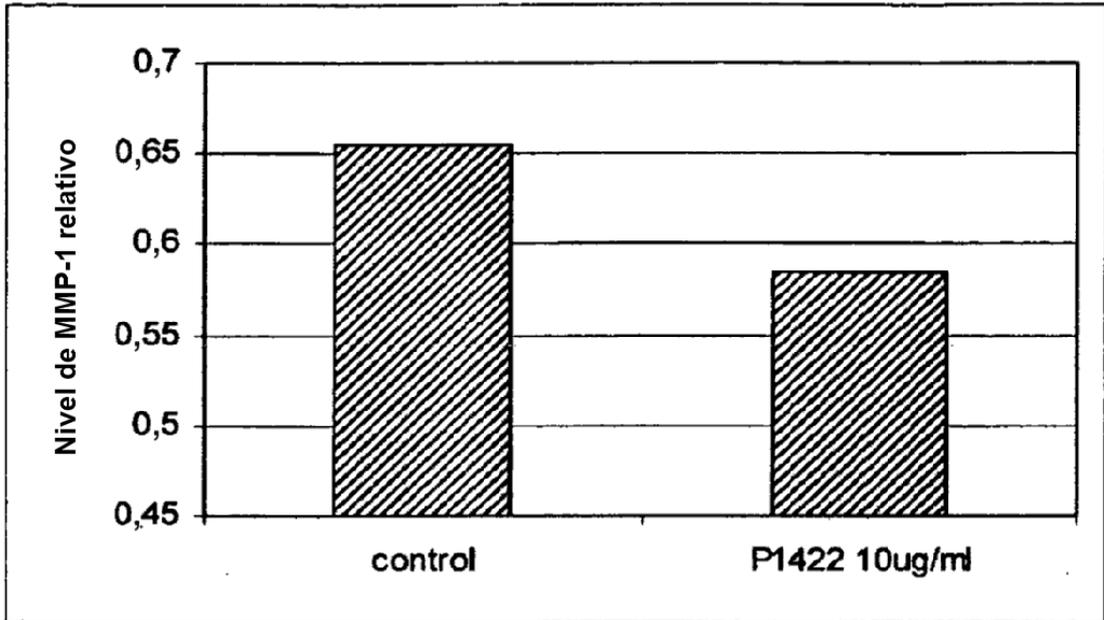


FIG. 3

A



B

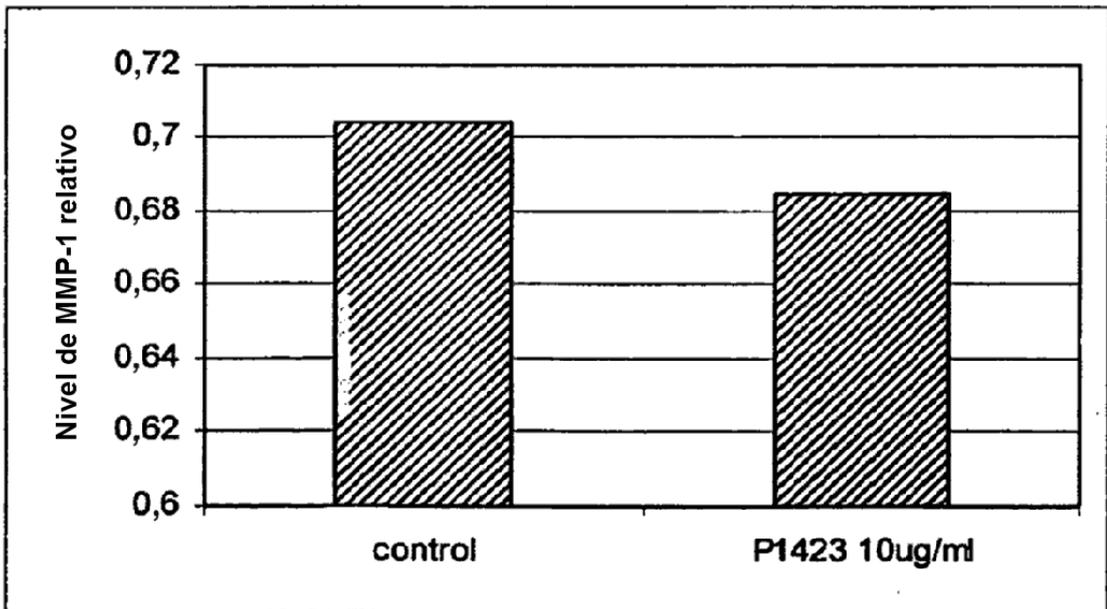
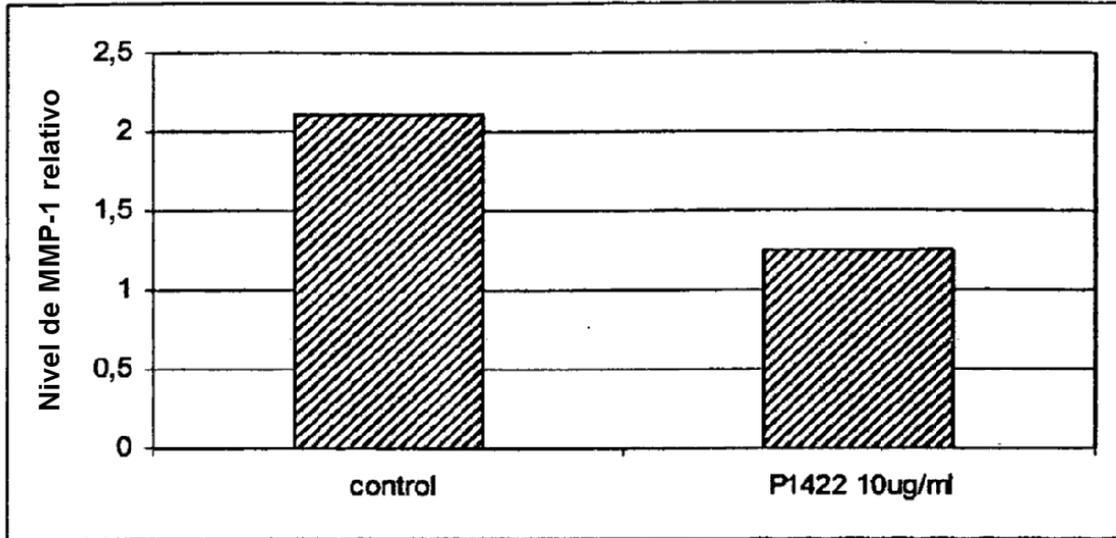


FIG. 4

A



B

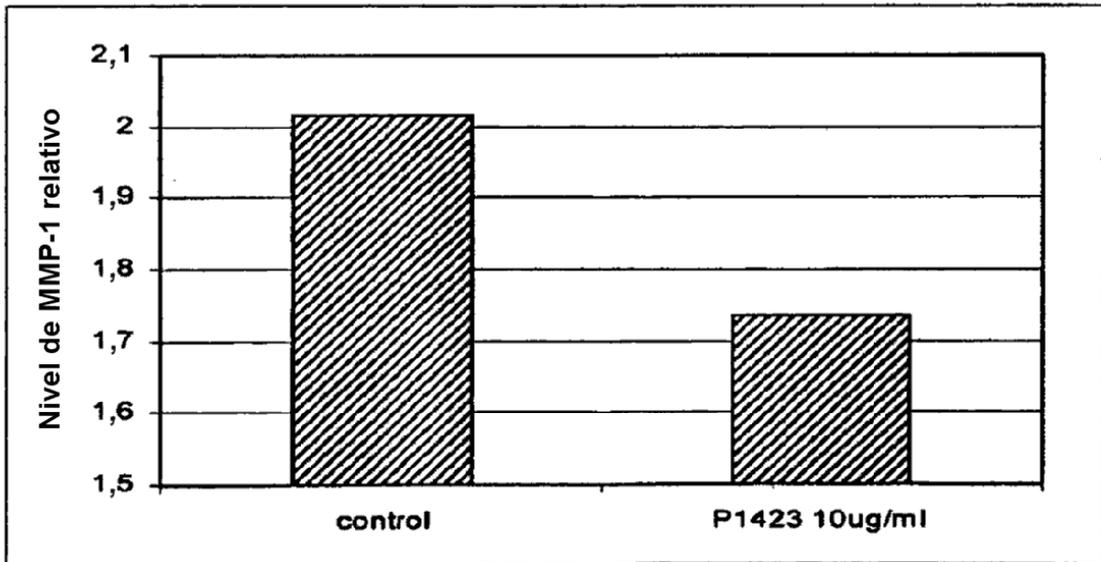


FIG. 5