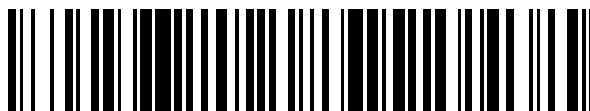


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 030**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81	(2006.01)
C07K 5/083	(2006.01)
C07K 5/11	(2006.01)
C07K 14/78	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61K 8/64	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2013 PCT/FR2013/000033**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13114013**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2013 E 13712827 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2809342**

54 Título: **Péptido bifuncional**

30 Prioridad:

01.02.2012 FR 1250932

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.08.2017

73 Titular/es:

REGENTIS INTERNATIONAL (33.3%)
51 Rue Cognacq-Jay IFR 53 Pôle Santé
51100 Reims, FR;
UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
(33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)

72 Inventor/es:

HORNEBECK, WILLIAM;
ATTIA, JOAN;
LORIMIER, SANDRINE y
ANTONICELLI, FRANK

74 Agente/Representante:

GÓMEZ CALVO, Marina

ES 2 631 030 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

Péptido bifuncional

[0001] La presente invención se refiere a un péptido que se aplicará especialmente en los ámbitos cosméticos y farmacéuticos.

5 **[0002]** La presente invención se aplicará principalmente en el ámbito de la reparación o de la regeneración del tejido dérmico afectado especialmente por el envejecimiento de la piel.

[0003] El envejecimiento de la piel se debe a un desequilibrio más o menos importante de los mecanismos de control de la síntesis y de la degradación de los componentes de la matriz extracelular de la dermis, constituyendo esta última la capa más interna de la piel. Así, durante el envejecimiento de la piel, se observa, dentro de la matriz extracelular de la dermis, por una parte, una disminución de la síntesis de ciertas macromoléculas, especialmente el colágeno y la elastina, y por otra parte, un aumento de la expresión de ciertas enzimas como las metaloproteinasas de matriz o MMP. Estas últimas presentan especialmente una actividad colagenolítica y elastolítica, y contribuyen, por tanto, a la degradación de las macromoléculas de la matriz de la dermis. En consecuencia, la dermis pierde su tono, la piel se distiende, lo que da lugar a la aparición de arrugas. Igualmente, este fenómeno puede verse intensificado por factores externos, como una exposición a radiación ultravioleta, a la polución, al estrés, o incluso al tabaco.

[0004] Tradicionalmente, en el estado de la técnica se conocen estrategias destinadas a ralentizar la aparición de arrugas. Estas estrategias consisten especialmente en:

- una descamación, o dermoabrasión, que corresponde a un tratamiento agresivo de la piel con el fin de reducir del espesor de esta última;
- las inyecciones antiarrugas de ácido hialurónico o de toxina botulínica que presentan respectivamente un efecto de relleno de las arrugas y una parálisis muscular focalizada que atenúan temporalmente las arrugas; no obstante, estas técnicas son costosas y muestran efectos únicamente a corto plazo;
- la aplicación de tratamientos superficiales, tales como productos hidratantes, cremas antiarrugas o alisadoras, que ralentizan la aparición de las arrugas, pero sin corregir las que ya se han formado;
- terapias basadas en células madre autólogas, que todavía están poco desarrolladas.

[0005] Desde hace algunos años, los laboratorios han puesto en práctica otras estrategias con el fin de luchar contra los efectos del envejecimiento de la piel.

30 **[0006]** En concreto, en la solicitud de patente europea EP 1 275 372 se propone la utilización de compuestos químicos, como los derivados N-acilaminoamidas. Más concretamente, este documento describe una composición en la que se incorpora, además del derivado N-acilaminoamida mencionado, una proteína inhibidora de las metaloproteinasas, estando implicadas estas últimas en la degradación del colágeno.

[0007] No obstante, dicha solución no es óptima, en concreto porque necesita, por una parte, una combinación de varios compuestos y, por otra parte, porque no permite actuar de forma positiva sobre la síntesis del colágeno.

[0008] Igualmente, se ha desarrollado la utilización de ciertos derivados peptídicos para prevenir especialmente los síntomas del envejecimiento de la piel.

40 **[0009]** En consecuencia, en el documento de la patente FR 285489, se conocen por ejemplo composiciones cosméticas que contienen derivados peptídicos, procedentes estos últimos de la proteína elastina. Más concretamente, el derivado peptídico puede presentar la secuencia siguiente R1-(AA)_n-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-OR₂, donde

- R1 corresponde a H o a una cadena alquílica que comprende entre 2 y 22 carbonos,
- (AA)_n corresponde a una cadena peptídica en la que AA consiste en un aminoácido cualquiera o un derivado de aminoácido y o n está comprendido entre 0 y 3,
- R2 corresponde a H o a una cadena alquílica que comprende entre 1 y 24 carbonos.

[0010] Una composición cosmética que incorpora tal derivado peptídico permite principalmente un efecto reafirmante y reestructurante.

50 **[0011]** Sin embargo, tal derivado peptídico o una composición que incorpore ese derivado no permite inhibir la actividad y/o la expresión de las proteinasas MMP que están implicadas en la degradación de los colágenos, constituyendo estos últimos las principales proteínas de la matriz extracelular de los tejidos del organismo, y en concreto de la dermis. El colágeno permite principalmente conferir a los tejidos su resistencia a las fuerzas de tensión. Así, el péptido descrito en el documento mencionado anteriormente no permite evitar la degradación de esta proteína esencial para preservar el tono dérmico.

[0012] También se conoce, por el documento de patente WO 2006053688, una combinación que incorpora varios péptidos y se utiliza en el tratamiento antiarrugas. En concreto, los péptidos de esta combinación intervienen a varios niveles del proceso de la síntesis del colágeno y/o de la fibronectina, principalmente estimulando esta síntesis.

5 **[0013]** El documento de patente DE 10 2004 055 541 describe una composición que contiene una combinación de péptidos con el objetivo de estimular la liberación del factor de crecimiento TGF- β , pudiendo inducir este último la síntesis de colágeno.

10 **[0014]** No obstante, los péptidos descritos en estos documentos de patentes presentan los mismos inconvenientes que los citados con anterioridad, especialmente el hecho de que la secuencia aquí propuesta no permite disminuir la expresión de las enzimas responsables de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, y en concreto del colágeno.

[0015] La invención ofrece la posibilidad de paliar los diversos inconvenientes del estado de la técnica proponiendo un péptido bifuncional que presenta a la vez la propiedad de estimular la síntesis de los colágenos y la de inhibir las proteinasas que entran en la cascada de degradación de estos últimos.

15 **[0016]** A estos efectos, la presente invención se refiere a un péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz, presentando dicho péptido una secuencia que contiene tres partes peptídicas A, B y C,

– correspondiendo la primera parte peptídica A a un hexapéptido repetido al menos tres veces, siendo capaz dicha parte A de unirse a una proteína receptora que enlaza la elastina para estimular la síntesis de colágeno,

20 – correspondiendo la segunda parte peptídica B a un tetrapéptido capaz de actuar como inhibidor competitivo de la proteasa uroquinasa y de ser escindido por dicha proteasa, y

– correspondiendo la tercera parte peptídica C a un tripéptido que ocupa al menos un sitio activo de las metaloproteinasas de matriz para permitir una inhibición de dichas proteinasas.

25 **[0017]** La primera parte peptídica A que estimula la síntesis de colágeno presenta la secuencia X1-Gly-X2-X3-Pro-Gly, estando repetida esta secuencia al menos tres veces, donde:

– X1 corresponde a un aminoácido cualquiera,

– X2 corresponde a un aminoácido elegido entre Val, Thr, Gln, Ala, Leu,

– X3 corresponde a un aminoácido elegido entre Ala, Leu, Ile.

30 **[0018]** De forma ventajosa, la primera parte peptídica A de dicho péptido presenta la secuencia Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly.

[0019] La segunda parte peptídica B, escindible por una proteasa, presenta la secuencia Arg-Y1-Arg-Y2, donde Y1 e Y2 corresponden cada uno a un aminoácido elegido entre Ser, Tyr, Gly, Ala, Arg, Val, Leu.

[0020] Preferiblemente, la segunda parte peptídica B de dicho péptido presenta la secuencia la Arg-Val-Arg-Leu.

35 **[0021]** La tercera parte C, que permite una inhibición de las metaloproteinasas de matriz, presenta la secuencia Z1-Ile-Z2, donde:

– Z1 corresponde a un aminoácido elegido entre Gly, Ile, Leu y

– Z2 corresponde a un aminoácido elegido entre Leu, Phe, Ala, Ile, Val.

[0022] De forma ventajosa, la tercera parte peptídica C de dicho péptido presenta la secuencia Gly-Ile-Leu.

40 **[0023]** Según un ejemplo de realización preferible, el péptido según la invención presenta la siguiente secuencia S1, correspondiente a la secuencia SEQ ID n°1:

S1: N-(Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly) $_n$ -Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu-OH

donde N y OH corresponden respectivamente a los extremos N-terminal y C-terminal de dicho péptido y donde $n=3$

45 **[0024]** No obstante, la secuencia del péptido bifuncional según la invención puede corresponder igualmente a una de las secuencias SEQ ID n°2 a SEQ ID n°26.

[0025] Preferiblemente, el péptido bifuncional según la invención se obtiene mediante síntesis química. Además, de forma ventajosa el péptido puede conservarse en forma liofilizada.

[0026] De forma ventajosa, el péptido bifuncional según la invención puede utilizarse para el tratamiento de las enfermedades de cicatrización crónicas, especialmente el tratamiento de las escaras o de las úlceras.

[0027] Igualmente, el péptido bifuncional según la invención puede utilizarse para la reparación y/o la regeneración del tejido dérmico, especialmente para el tratamiento del envejecimiento de la piel.

[0028] La invención se refiere igualmente a una composición cosmética y/o farmacéutica que incorpora el péptido bifuncional según la invención.

5 **[0029]** Preferiblemente, la composición cosmética comprende la concentración de péptido bifuncional en una cantidad entre 10 µg/mL y 1 mg/mL, y de forma preferible casi igual a 100 µg/mL.

[0030] El péptido bifuncional según la presente invención presenta numerosas ventajas. Por una parte, permite una estimulación de la síntesis de proteínas de colágeno, y especialmente de los colágenos de tipo I y de tipo III. El aumento de la producción de este último tipo de colágeno es especialmente interesante; en efecto, este tipo de colágeno se denomina colágeno de tipo "fetal", puesto que es sintetizado principalmente por el feto y durante la infancia. Este tipo de colágeno permite una cicatrización especialmente óptima de los tejidos, llamada cicatrización "perfecta". Por otra parte, dicho péptido permite disminuir la colagenólisis por las proteasas. Asimismo, la estimulación de la síntesis de colágeno y la inhibición de las metaloproteinasas se obtienen de forma simultánea gracias a las partes peptídicas A y C respectivamente del péptido bifuncional, que contiene además una parte peptídica B que enlaza las otras dos partes y es capaz de ser escindida por la uroquinasa. Por tanto, el péptido según la invención puede presentar una secuencia corta, del orden de 25 aminoácidos, lo que facilita su síntesis por vía química.

[0031] Otras características y ventajas de la invención surgirán de la siguiente descripción detallada de los modos de realización no limitativos de la invención, en referencia a las figuras adjuntas en las que:

- 20 – la figura 1 es una representación esquemática del mecanismo de acción del péptido según la invención.
- la figura 2 corresponde a una representación esquemática de la cascada enzimática del sistema plasminógeno/plasmina.
- las figuras 3A y 3B corresponden a histogramas que ilustran respectivamente la síntesis de colágeno de tipo I y de tipo III por fibroblastos tratados por el péptido según la invención en una concentración de 100 µg/ml o por
- 25 fragmentos de este mismo péptido.
- la figura 4 muestra en forma de histogramas la expresión génica de los genes COL1A1 y COL3A1 que codifican respectivamente los colágenos de tipo I y III en cultivos de fibroblastos dérmicos tratados por el péptido según la invención o por fragmentos del este mismo péptido.
- la figura 5 ilustra, en función de la edad de los pacientes (35, 42 y 53 años), el efecto del péptido bifuncional
- 30 según la invención sobre la expresión proteica de los colágenos de tipo I y III por los fibroblastos dérmicos procedentes respectivamente de estos pacientes.
- las figuras 6A y 6B ilustran el efecto del péptido bifuncional sobre la actividad de la uroquinasa con respecto a un sustrato sintético.
- la figura 7A y 7B ilustran el efecto del péptido bifuncional sobre la actividad de la MMP-1 con respecto a un
- 35 sustrato sintético.
- las figuras 8A y 8B representan el perfil de elución del péptido según la invención respectivamente sin tratamiento y con tratamiento mediante la uroquinasa.

[0032] A título preliminar e informativo, la presente descripción utiliza el código internacional de tres letras para designar los aminoácidos. Así, Ala corresponde a la alanina (A), Cys a la cisteína (C), Asp al ácido aspártico (D), Glu al ácido glutamínico (E), Phe a la fenilalanina (F), Gly a la glicina (G), His a la histidina (H), Ile a la isoleucina (I), Lys a la lisina (K), Leu a la leucina (L), Met a la metionina (M), Asn a la asparagina (N), Pro a la prolina (P), Gln a la glutamina (Q), Arg a la arginina (R), Ser a la serina (S), Thr a la treonina (T), Val a la valina (V), Trp al triptófano (W) y Tyr a la tirosina (Y).

[0033] El envejecimiento de la piel y la consiguiente aparición de arrugas se caracterizan, a nivel celular y molecular, por una disminución de la expresión de los genes responsables de la síntesis de las macromoléculas que entran en la composición de la matriz extracelular, como los colágenos o la elastina. Además, el descenso de la producción de estas proteínas de matriz viene acompañado generalmente de una sobreexpresión de las enzimas que son responsables de la degradación de dichas proteínas de matriz; en consecuencia, estas enzimas, las metaloproteinasas de matriz o MMP, son en parte la causa del descenso de tono a nivel de la dermis, de la distensión de la piel y, con el tiempo, de la aparición de arrugas.

[0034] Las proteínas de colágeno son las proteínas preponderantes en la constitución de la matriz extracelular de los tejidos del organismo. En concreto, los colágenos están presentes en un 90 % a nivel de la dermis, constituyendo esta última el soporte sólido de la piel y desempeñando una función a la par nutritiva, termoreguladora y de defensa contra los microorganismos patógenos. La dermis está constituida principalmente por células denominadas fibroblastos, que participan en la síntesis especialmente de los colágenos, así como en la organización de la matriz extracelular.

[0035] Así, la estructura de la matriz extracelular está constituida por colágeno, pero igualmente de elastina, de glicoproteínas estructurales y de proteoglicanos. Más concretamente, la matriz dérmica contiene fibrillas de colágeno de tipo I y III, y un núcleo de colágeno de tipo V.

5 **[0036]** Estos últimos son susceptibles de ser degradados por proteínas denominadas MMP, cuya familia tiene no menos de 26 miembros. Más concretamente, estas proteínas corresponden a endopeptidasas, es decir, que rompen los enlaces peptídicos en el interior de la proteína.

10 **[0037]** Los trabajos realizados por científicos (Voorhes *et al.*, Hornebeck *et al.*, 2009) han permitido evidenciar que la senescencia de las células dérmicas, los fibroblastos, se caracteriza por un aumento de la expresión de estas endopeptidasas, especialmente en lo que se refiere a la MMP-1. Esta última pertenece al grupo de las colagenasas intersticiales, y es responsable de la escisión de las proteínas de colágeno de tipo I y III. La MMP-1 se considera la principal colagenasa implicada en el envejecimiento de la piel, ya sea cronológico o fotoinducido.

15 **[0038]** Así, la disminución de las proteínas de matriz dérmicas, y especialmente los colágenos, asociada a un aumento de las enzimas de degradación, especialmente las MMP-1, son elementos importantes que intervienen en el envejecimiento de la piel, que se traduce en una disminución del tono de la piel y una aparición de arrugas visibles.

[0039] Entonces, en el marco de un procedimiento inventivo, los inventores han desarrollado un péptido que presenta varias funciones y que permite a la vez actuar al nivel de los procesos de síntesis de las moléculas de colágeno, así como a diferentes niveles de cascadas de degradación de estas mismas moléculas.

20 **[0040]** Así, de forma especialmente ventajosa, el péptido bifuncional según la presente invención presenta la particularidad de favorecer el restablecimiento de un equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis) y catabólicos (degradación) de la matriz extracelular especialmente dérmica.

[0041] De forma especialmente preferible, el péptido según la invención es bifuncional y contiene una secuencia que puede dividirse en tres partes:

- 25
- una primera parte peptídica, denominada parte A, que presenta de forma ventajosa la capacidad de aumentar la síntesis de colágeno;
 - una segunda parte peptídica, denominada parte B, que presenta de forma preferible una secuencia reconocida por una proteasa, la uroquinasa, pudiendo ser escindida dicha parte peptídica B por esta proteasa;
 - una tercera parte peptídica, denominada parte C, siendo capaz esta última de inhibir las MMP.

30 **[0042]** En consecuencia, el péptido según la presente invención permite, por una parte, estimular la síntesis de colágeno y, por otra parte, reducir la degradación de dicho colágeno mediante la inhibición de la uroquinasa y las proteasas MMP, especialmente la MMP-1.

[0043] Más concretamente, la parte peptídica A, que permite un aumento de la síntesis de colágeno, consiste en un hexapéptido, es decir, una sucesión de 6 residuos de aminoácidos. De forma ventajosa, este hexapéptido se repite al menos 3 veces en el péptido bifuncional según la presente invención.

35 **[0044]** Preferiblemente, la parte peptídica A del péptido bifuncional presenta la secuencia siguiente X1-Gly-X2-X3-Pro-Gly, donde X1, X2 y X3 corresponden a aminoácidos. Como se ha indicado anteriormente, esta secuencia hexapeptídica X1-Gly-X2-X3-Pro-Gly se repite al menos tres veces en el péptido según la invención. En efecto, ciertos trabajos han mostrado que una repetición de tres veces de dicha secuencia conllevaba resultados diferentes, incluso más interesantes, en términos de actividad de la secuencia (Alix 2001).

40 **[0045]** Según un modo de realización interesante, el residuo X1 de la parte peptídica A corresponde a cualquiera de los aminoácidos. El residuo X2, por su parte corresponde de forma ventajosa a un aminoácido elegido entre Val, Thr, Gln, Ala y Leu. Finalmente, el residuo X3 corresponde preferiblemente a un aminoácido elegido entre Ala, Leu et Ile.

45 **[0046]** De forma aún más preferible, X1 y X2 corresponden a Val y X3 a Ala. Así, el hexapéptido que corresponde a la parte A del péptido bifuncional presenta preferiblemente la secuencia Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly.

[0047] Tal secuencia, repetida al menos tres veces y asociada con las partes peptídicas B y C, permite una estimulación significativa de la expresión proteica de los colágenos, especialmente en lo que respecta al colágeno de tipo III, como se ilustra y se explica en las figuras 3A y 3B adjuntas y en el ejemplo 1 a continuación.

50 **[0048]** El péptido según la invención permite igualmente un aumento de la expresión génica de los genes COL1A1 y COL3A1, como se ilustra en la figura 4, codificando respectivamente el colágeno de tipo I y el colágeno de tipo III. La acción del péptido bifuncional sobre la síntesis del colágeno tipo III es especialmente interesante; en efecto, se sabe que este último es el colágeno mayoritario a nivel fetal y su producción disminuye progresivamente durante la infancia hasta alcanzar un nivel de producción muy débil en el adulto. A título de ejemplo, el colágeno tipo III es 6 veces menos abundante en el adulto que el colágeno de tipo I (Melissopoulos,

1998; Herbage, 1997). El colágeno de tipo III es sintetizado mayoritariamente por los miofibroblastos en el transcurso de la cicatrización con el fin de reemplazar los tejidos dañados. A nivel fetal, el colágeno tipo III permite una cicatrización llamada "perfecta" (Lorena *et al.*, 2002; Ferguson & O'Kane, 2004).

5 **[0049]** La secuencia Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly del péptido bifuncional según la invención ha sido conceptualizado a partir de los péptidos de elastina o elastokinas (*élastokines*, según el término francés) que se derivan de la degradación de las fibras elásticas. Tal secuencia adopta una conformación en giro β de tipo VIII debido a la presencia de los residuos prolina y glicina en dicha secuencia X1-Gly-X2-X3-Pro-Gly (Floquet *et al.*, 2004). Este motivo estructural es reconocido por una proteína receptora de elastina, tradicionalmente citada según su denominación en inglés *elastin binding protein* y abreviada como EBP. Esta última está inmovilizada en la superficie celular en asociación con otras dos subunidades: una proteína protectora o catepsina A (PPCA) y una neuraminidasa (Neu-1), que están enlazadas a la membrana celular. La ocupación de la proteína receptora EBP por la parte peptídica A del péptido bifuncional, representado en la figura 1, conlleva una activación del conjunto molecular, lo que conduce principalmente a la síntesis de colágeno de tipo I y de tipo III.

15 **[0050]** Tal activación del conjunto molecular también puede actuar sobre la quimiotaxia, la proliferación, la adhesión y la supervivencia de los fibroblastos e igualmente sobre la angiogénesis, siendo esencial esta última en el proceso de revascularización de las heridas crónicas, como las escaras o las úlceras.

[0051] En lo que respecta a la parte peptídica B, esta consiste preferiblemente en un tetrapéptido, es decir, una secuencia que contiene 4 aminoácidos.

20 **[0052]** Más concretamente, este tetrapéptido representa un brazo que puede interactuar, como sustrato o inhibidor competitivo, con una serín proteasa, la uroquinasa. Así, esto permite liberar las otras dos partes peptídicas A y C, en las proximidades de la célula.

[0053] La uroquinasa escinde preferiblemente una secuencia que presenta dos aminoácidos Arg. En consecuencia, la parte peptídica B presenta de forma ventajosa la secuencia Arg-Y1-Arg-Y2, donde Y1 y Y2 corresponden a aminoácidos.

25 **[0054]** Según un ejemplo de realización concreto, Y1 y Y2 corresponden cada uno a un aminoácido elegido entre Ser, Tyr, Gly, Ala, Arg, Val y Leu. Estos aminoácidos, asociados a un sitio escindible Arg, son escindidos preferiblemente por la proteasa uroquinasa.

[0055] De forma aún más preferible, la parte peptídica B del péptido bifuncional según la invención contiene la secuencia Arg-Val-Arg-Leu.

30 **[0056]** La proteasa uroquinasa es uno de los activadores del sistema plasminógeno-plasmina. El plasminógeno es el sustrato fisiológico de la uroquinasa, que va a permitir activarla en forma de plasmina. Esta activación desencadena una cascada proteolítica que da lugar especialmente a la activación de las MMP-1 y de las MMP-3. La cascada enzimática del sistema plasminógeno/plasmina desencadenada por la proteasa uroquinasa está representada en la figura 2 adjunta.

35 **[0057]** Así, la actividad uroquinasa sobre el plasminógeno es responsable indirectamente de la degradación del colágeno, y especialmente del colágeno de tipo I y de tipo III. Por tanto, la presencia de la parte peptídica B en el péptido bifuncional según la invención actuará como sustrato o inhibidor competitivo de la uroquinasa. En consecuencia, esta última escindirá los sitios Arg presentes en la parte peptídica B y estará menos disponible para provocar la inhibición del plasminógeno en plasmina; entonces, la degradación de las moléculas de colágeno será reducida. El efecto del péptido según la invención sobre la actividad de la uroquinasa se ilustra concretamente en las figuras 6A y 6B.

40 **[0058]** En lo que respecta a la parte peptídica C del péptido bifuncional, esta consiste de forma ventajosa en un tripéptido, es decir, una secuencia que contiene 3 aminoácidos.

45 **[0059]** De forma preferible, la parte peptídica C presenta la secuencia Z1-Ile-Z2, donde Z1 y Z2 corresponden cada uno a un residuo de aminoácido.

[0060] Según un ejemplo de realización interesante, Z1 es un aminoácido elegido entre Gly, Ile y Leu mientras que Z2 se elige entre Leu, Phe, Ala, Ile, Val.

50 **[0061]** De forma aún más preferible, Z1 corresponde a Gly y Z2 corresponde a Leu. Así, la parte peptídica C del péptido bifuncional presenta de forma ventajosa la secuencia Gly-Ile-Leu. El tripéptido Gly-Ile-Leu es, en efecto, susceptible de ocupar una parte del sitio activo de la MMP-1 y actuar como inhibidor competitivo de la enzima.

55 **[0062]** En efecto, estos aminoácidos presentan un interés particular, dado que son susceptibles de ocupar tres de los huecos de la MMP de tipo I, los huecos P'1, P'2 y P'3. En consecuencia, el sitio activo de la colagenasa de tipo I ya no podrá quelar los iones Zn^{2+} , siendo esenciales estos últimos para la actividad de dicha colagenasa. Entonces, la degradación de las moléculas de colágeno por las MMP-1 disminuye gracias al péptido bifuncional según la invención. Esto se ilustra de forma concreta en las figuras 7A y 7B adjuntas.

[0063] Así, según un modo de realización preferible, que permite obtener resultados interesantes en términos de síntesis de colágeno y de inhibición de las MMP, especialmente de la MMP-1, el péptido bifuncional según la presente invención presenta la secuencia siguiente, denominada secuencia S1, y correspondiente a la SEQ ID n°1:

5 S1: N-(Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly)*n*-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu-OH

[0064] Preferiblemente, la secuencia Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly se repite 3 veces; en otras palabras, de forma ventajosa *n* es igual a 3. No obstante, la secuencia también puede repetirse un número superior a 3.

10 **[0065]** El péptido según la invención también puede presentar, por ejemplo, las secuencias identificadas SEQ ID n°2 a SEQ ID n°26. No obstante, esta lista de secuencias no es exhaustiva y, por tanto, no es limitativa de la invención.

15 **[0066]** Especialmente, los aminoácidos de las secuencias SEQ ID n°1 a 26 pueden, por ejemplo, ser sustituidos por aminoácidos que sean químicamente equivalentes, es decir, que presenten características fisicoquímicas equivalentes; las sustituciones entre aminoácidos equivalentes se realizan, por ejemplo, entre los aminoácidos apolares alifáticos Ala, Val, Ile, Leu, o entre los aminoácidos polares que portan un grupo hidroxilo Ser y Thr, entre los aminoácidos Asn y Gln, entre los aminoácidos que portan dos funciones ácido Asp y Glu, etc. Esta información está registrada en la base de datos de proteasas, MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

[0067] El péptido bifuncional según la presente invención se obtiene preferiblemente mediante síntesis química.

[0068] De forma ventajosa, la técnica del fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc)/ter-butil (tBu) es la que se pone en práctica para obtener la elongación de las cadenas peptídicas, en resinas Fmoc-Leu-Wang PS.

20 **[0069]** No obstante, tal modo de realización no es limitativo de la invención y la síntesis química del péptido bifuncional puede obtenerse mediante cualquier otra técnica adaptada a estos efectos y conocida por el experto en la materia.

[0070] De forma ventajosa, el péptido según la invención está liofilizado con el fin de asegurar una conservación óptima del mismo.

25 **[0071]** El péptido bifuncional según la presente invención es especialmente interesante para su utilización en la fabricación de composiciones cosméticas destinadas a favorecer la reparación y/o la regeneración del tejido dérmico. En efecto, debido a su acción sobre la producción de colágeno, dicho péptido permite especialmente una limitación de la aparición de arrugas.

30 **[0072]** Además, los inventores han demostrado que los efectos del péptido bifuncional según la invención sobre la producción de colágeno parecían depender de la edad de los pacientes. En efecto, los resultados mostrados en el ejemplo 3 más abajo, en relación con la figura 5, muestran que la expresión del colágeno de tipo I, y sobre todo, la expresión de colágeno de tipo III, es más importante en los pacientes de mayor edad. Por ello, tales resultados confirman el interés de dicho péptido para su utilización en el marco de las composiciones cosméticas destinadas a combatir el envejecimiento de la piel.

35 **[0073]** Sin embargo, tal modo de realización no es limitativo de la invención. Por ejemplo, el péptido bifuncional según la invención también puede servir para la preparación de composiciones farmacéuticas.

40 **[0074]** En efecto, se demuestra que una ruptura del equilibrio entre la síntesis de proteínas de matriz, como el colágeno, y la degradación de estas mismas proteínas, puede provocar la aparición de heridas crónicas, también llamadas enfermedades de cicatrización crónicas, como las escaras, las úlceras o incluso las grandes quemaduras. Estas enfermedades se caracterizan concretamente por una sobreexpresión de las proteinasas de matriz MMPs y están asociadas en general a patologías como la diabetes o las enfermedades vasculares.

[0075] Estas enfermedades de cicatrización crónicas aumentan constantemente en los países desarrollados, especialmente a causa del envejecimiento de la población. Por tanto, el tratamiento y la atención de estas enfermedades representan un coste significativo.

45 **[0076]** A nivel celular, se ha demostrado que se liberaba una gran cantidad de proteasas, y especialmente de metaloproteinasa de tipo MMP-1, en las proximidades de estas heridas crónicas de tipo escara. Algunos estudios han permitido demostrar también que la actividad de la colagenasa de tipo I, o MMP-1, aumentaba considerablemente en el exudado de heridas crónicas. Tal aumento es responsable de la degradación de las moléculas de colágeno de tipo I y de tipo III que se encuentran presentes en las proximidades de dicha herida (Barone *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2006).

50 **[0077]** En lo que respecta de forma más concreta a las úlceras, también se ha demostrado que se encontraban grandes cantidades de proteasas en las proximidades de estas heridas. En concreto, algunos estudios han permitido identificar un índice de MMP-1 65 veces más elevado que el normal, provocando estas MMPs una

degradación excesiva y prolongada de las proteínas de la matriz extracelular y también de los factores de crecimiento, lo que conlleva un retraso en la cicatrización (Fischer *et al.*, 2009).

[0078] Finalmente, se ha demostrado que la concentración de uroquinasa, activador del sistema plasminógeno/plasmina como se puede apreciar en la figura 2, y responsable de forma indirecta de la activación de ciertas MMP, aumentaba fuertemente en especial en las úlceras de las piernas, así como al nivel de las escaras (Werckroth *et al.*, 2004).

[0079] Así, parece que el péptido según la invención, que permite a la vez una disminución de la actividad de las proteasas MMP y un aumento de la síntesis de las proteínas de matriz, contribuiría a facilitar un tratamiento de estas heridas crónicas y permitiría sustituir los tratamientos médicos actuales, que son pesados, costosos y poco eficaces.

[0080] Según un modo de realización concreto, el péptido bifuncional según la invención está integrado en un apósito destinado a colocarse sobre la zona del cuerpo afectada por una herida crónica.

[0081] No obstante, tal modo de realización no es en ningún caso limitativo de la invención y puede incorporar fácilmente el péptido bifuncional según la invención en una preparación como una crema, un ungüento, un gel, pudiendo aplicarse sobre la herida que se ha de tratar.

[0082] Según un ejemplo de realización, el péptido bifuncional se utiliza preferiblemente en una concentración aproximadamente entre 10 µg/ml y 1 mg/ml. En efecto, no se ha constatado ninguna toxicidad del péptido según la invención en los fibroblastos dérmicos tratados con concentraciones del péptido de hasta 1 mg/ml. Además, algunos estudios realizados para investigar los genes de toxicidad mediante el enfoque estadístico SAM (Significance Analysis of Microarrays) han demostrado que la muerte celular, la desorganización del tejido conjuntivo y la invasión tumoral solamente son inducidos a partir de una fuerte concentración de péptido bifuncional, superior a 1 mg/ml.

[0083] De forma aún más preferible, la concentración preconizada para la utilización del péptido, especialmente en las composiciones farmacéuticas y/o cosméticas, es casi igual a 100 µg/ml.

[0084] Con la lectura de los ejemplos siguientes, que se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo, surgirán otras ventajas y características de la invención.

Ejemplo 1: Efecto del péptido bifuncional sobre la síntesis de colágeno - análisis proteico

[0085] Los fibroblastos dérmicos se aíslan a partir de biopsias de piel del abdomen obtenidas durante el transcurso de operaciones quirúrgicas practicadas en pacientes sanos con edades entre los 35 y los 75 años.

[0086] Después de haber retirado la epidermis, los fibroblastos se recuperan mediante digestión enzimática y después se cultivan a 37 °C en un medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y con un 1 % de penicilina/estreptomicina.

[0087] Después, los fibroblastos se tratan con el péptido que presenta la secuencia S1 o con distintos fragmentos de esta secuencia, en una concentración de 100 µg/ml. Los distintos fragmentos probados son los siguientes:

- péptido 1 (pept 1): péptido que presenta la secuencia S1
- péptido 2 (pept 2): secuencia N-(Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly)₃-Arg-Val-Arg-Leu-OH
- péptido 3 (pept 3): N-(Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly)₃-OH
- péptido 4 (pept 4): N-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu-OH
- péptido 5 (pept 5): N-Gly-Ile-Leu-OH

[0088] La expresión proteica del colágeno de tipo I y del colágeno de tipo III se ha mostrado mediante Western Blot y se ha cuantificado mediante ImageJ. Los resultados se presentan respectivamente en las figuras 3A y 3B adjuntas. El control (Ctrl) corresponde a la expresión de colágeno de tipo I y III a nivel de las células no tratadas con los péptidos. Los experimentos se han realizado por triplicado.

[0089] Los resultados visibles en la figura 3A muestran que el péptido según la invención (pept 1), así como los fragmentos (pept 2 y pept 3) que incorporan la secuencia Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly que corresponde a la parte A del péptido según la invención estimulan un 30 % la expresión proteica del colágeno de tipo I. Los fragmentos peptídicos (pept 4 y pept 5) que no contienen la parte A del péptido según la invención no permiten la estimulación de la síntesis de colágeno de tipo I; al contrario, la proporción de colágeno sintetizado cuando los fibroblastos están en contacto con pept 4 y pept 5 parece más débil. Entonces, la secuencia Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly es responsable de la estimulación de la síntesis de colágeno de tipo I.

[0090] La figura 3B muestra que el péptido según la invención que presenta la secuencia S1 permite un aumento de la síntesis de colágeno de tipo III; en efecto, como puede apreciarse en el histograma, la producción

de colágeno de tipo III es más del doble cuando los fibroblastos se tratan con el péptido que presenta la secuencia S1.

[0091] También es interesante señalar que un tratamiento de los fibroblastos con el péptido que presenta la secuencia S1 (pept 1) permite un aumento de la síntesis de colágeno de tipo III del 36 % en comparación con los fibroblastos tratados con el péptido que presenta únicamente la secuencia (Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly)₃ (pept 3). Por tanto, las otras partes del péptido según la invención también desempeñan una función en el aumento de la síntesis de colágeno de tipo III.

[0092] Así pues, el péptido según la invención es especialmente interesante; en efecto, además de permitir un aumento de la síntesis de colágeno de tipo I, favorece también la producción de colágeno de tipo III.

Ejemplo 2: Efecto del péptido bifuncional sobre la síntesis de colágeno - análisis de la expresión génica

[0093] La expresión génica de los colágenos de tipo I y III en los cultivos de fibroblastos también se ha probado en presencia de distintos péptidos (pept 1 a pept 5) en una concentración de 100 µg/ml.

[0094] Después de 24 horas de tratamiento con los distintos péptidos, los ARNs se han extraído de los cultivos con la ayuda de un kit RNeasy® (QIAGEN), y después se retrotranscriben en ADN complementarios (ADNc) con la ayuda del kit RT² First Strand Kit de SABiosciences™.

[0095] Después, se efectúan análisis PCR en tiempo real con la ayuda del termociclador Mx3000p de Stratagene en placa de 96 pocillos. Cada muestra se analiza por triplicado. Los ADNc sirven de matrices en una mezcla de reacción que contiene los reactivos RT² SYBR® Green/ ROX™ qPCR Master Mix (SABiosciences™) y los cebadores directos e inversos específicos del gen que se ha de amplificar. La lectura de la fluorescencia se efectúa al fin de cada ciclo y se analiza mediante el programa MxPro (Stratagene). La expresión relativa de los genes de interés COL1A1 y COL3A1 que codifican respectivamente el colágeno de tipo I y de tipo III se obtiene normalizando la cantidad de productos de amplificación del gen estudiado por la cantidad de ADN amplificado a partir de un gen "doméstico", en este caso, el ARN del gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). A partir del número de ciclos que corresponden a una amplificación que posee una eficacia del 100 %, se calcula la cantidad relativa de ADNc con la ayuda del método de 2^{-ΔΔCT} (Livak & Schmittgen, 2001).

[0096] Los resultados, que pueden apreciarse en la figura 4, confirman los obtenidos durante el estudio de la expresión proteica. El péptido bifuncional según la invención, así como los fragmentos peptídicos pept 2 y pept 3 que comprenden la secuencia (Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly)₃, estimulan la expresión génica de los colágenos de tipo I y III. Se constata igualmente un aumento de la síntesis de colágeno de tipo III cuando los fibroblastos se tratan con el péptido que presenta la secuencia S1 (pept 1) en comparación con las células puestas en presencia del péptido 3 que contiene la secuencia (Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly)₃ solamente.

[0097] Los péptidos derivados pept 4 y pept 5 que contienen la secuencia Gly-Ile-Leu no tienen ningún efecto sobre la expresión de los genes que codifican los colágenos de tipo I y III.

[0098] El control (Ctrl) corresponde a la expresión de los genes que codifican los dos tipos de colágeno cuando los fibroblastos no son tratados.

Ejemplo 3: Efecto del péptido bifuncional sobre la síntesis de colágeno - pruebas de la expresión proteica y génica en función de la edad de los pacientes

[0099] Algunos fibroblastos dérmicos procedentes de pacientes de mayor o menor edad (35, 42 y 53 años) se han cultivado y el péptido bifuncional según la invención que presenta la secuencia S1 se ha probado en lo que respecta a la expresión proteica y génica del colágeno de tipo I y de tipo III. Los resultados obtenidos en lo que se refiere a la expresión proteica de los dos tipos de colágeno pueden observarse en la figura 5. Parece que la acción del péptido según la invención sobre la síntesis de colágeno es más importante cuando los fibroblastos proceden de pacientes de mayor edad.

Ejemplo 4: Inhibición competitiva de la uroquinasa por el péptido bifuncional

[0100] Se ha evaluado la acción del péptido bifuncional según la invención sobre la uroquinasa, una enzima en la dirección 5' de la cascada de activación de la proteinasa MMP-1.

[0101] Se ha probado la actividad de la uroquinasa sobre su sustrato sintético, el D-Glu-Gly-Arg+NHPhNO₂ (S2444), en presencia y en ausencia del péptido según la invención en distintas concentraciones.

[0102] Los resultados se presentan en las figuras 6A y 6B adjuntas.

[0103] Se ha realizado una cinética de hidrólisis del sustrato S2444 (0,3 mM) mediante la uroquinasa (9,25*10⁻⁶ mM) en presencia del péptido bifuncional que presenta la secuencia S1 y concentrado a 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ M durante 1h. El testigo corresponde a la cinética en ausencia de péptido. La actividad enzimática se evalúa

mediante una medida de la absorbancia (DO) a 405 nm cada 5 minutos durante un período de 35 min. Los resultados pueden observarse en la figura 6A.

[0104] La figura 6B constituye una representación gráfica de la relación efecto/dosis entre la actividad de la uroquinasa y la concentración de péptido bifuncional utilizada a los 15 minutos. La raya de trazo discontinuo en la figura permite determinar el IC₅₀, es decir, la concentración de péptido necesario para disminuir un 50 % la actividad de la uroquinasa. El IC₅₀ corresponde a 0,83*10⁻⁵ M de péptido, esto es, una concentración másica de péptido de 19 µg/ml.

[0105] En consecuencia, parece que el péptido bifuncional según la invención se comporta como un inhibidor competitivo de la uroquinasa.

Ejemplo 5: Efecto del péptido bifuncional sobre la actividad de la proteasa MMP-1

[0106] Después, se ha evaluado directamente el efecto del péptido bifuncional según la invención sobre la actividad de la MMP-1, que es una enzima en la dirección 3' de la cascada activada por la uroquinasa.

[0107] El sustrato de la MMP-1 que se ha utilizado para probar su actividad en presencia del péptido es un sustrato sintético, el DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂.

[0108] Una concentración de 80 ng/µl de MMP-1 se ha puesto en presencia de 0,4 ng/µl de sustrato sintético, en presencia o no de péptido bifuncional concentrado a 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ M durante 1h. Los resultados se presentan en las figuras 7A y 7B.

[0109] Más concretamente, la figura 7A representa una cinética de hidrólisis del sustrato sintético de la MMP-1 en presencia o no (testigo) del péptido en distintas concentraciones. La actividad enzimática de la MMP-1 se evalúa mediante una medida de la absorbancia (DO) a 465 nm cada 5 minutos durante un período de 35 min.

[0110] La figura 7B es una representación gráfica de la relación dosis-efecto entre la actividad de la MMP-1 y la concentración de péptido bifuncional utilizada a los 15 min. La raya de trazo discontinuo en la figura permite determinar el IC₅₀, que aquí corresponde a 0,4*10⁻⁴ M, es decir, una concentración de péptido bifuncional igual a 91 µg/ml.

[0111] También se han probado los efectos del péptido según la invención sobre la actividad de la MMP-1 en presencia de su sustrato natural, esto es, las fibras de colágeno de la dermis humana.

[0112] Para ello, se ha activado previamente la MMP-1 mediante APMA (acetato 4-aminofenil mercúrico) a 20 mM durante 1 hora y 30 minutos a 37 °C. Después, la MMP-1 activada de esta manera se deposita sobre cortes de piel de 5 µ de grosor en presencia o no del péptido según la invención (100 µg/ml). Después de 3 h, los cortes de piel son inmunomarcados con el fin de revelar la presencia de colágeno de tipo I y III, y son observados en un microscopio confocal. Los resultados, no representados, muestran que, al nivel del corte que no se ha tratado con el péptido, los colágenos I y III han sido totalmente degradados por la MMP-1. Por el contrario, en presencia del péptido bifuncional, la acción de dicha MMP-1 se inhibe; en efecto, se detectan los colágenos I y III.

[0113] El péptido bifuncional según la invención inhibe la degradación de los colágenos mediante la inhibición *in situ* de la actividad de las MMP-1.

Ejemplo 6: Escisión del péptido bifuncional por la uroquinasa

[0114] A nivel pericelular, se observa un exceso de uroquinasa del orden de 10⁻⁴ M. Entonces, el péptido puede ser escindido por la uroquinasa, actuando esta última en concreto al nivel de los residuos arginina (Arg) de la parte B del péptido según la invención.

[0115] Se han realizado estudios mediante HPLC en columna Chromolith Jupiter C18 (50 x 4,6 mm) aplicando un gradiente lineal de 0,1 % de TFA acetonitrilo en 0,1 % de TFA agua, de 0 a 100 % durante 100 min. Los resultados muestran la presencia de un pico espectral a 11,75 min característico del péptido bifuncional (figura 8A). No obstante, tras la acción de un exceso de uroquinasa en el péptido bifuncional (0,45 mM), el pico espectral es diferente; en efecto, el nuevo pico se eluye a 20 min caracterizando así una escisión del péptido bifuncional por la uroquinasa (figura 8B).

[0116] Así, en condiciones de envejecimiento de la piel, en presencia de cantidades importantes de uroquinasa, se escinde el péptido bifuncional según la invención, liberando así la parte C-terminal de dicho péptido que incorpora la secuencia Gly-Ile-Leu.

Ejemplo 7: Efectos de la secuencia Gly-Ile-Leu sobre la actividad de la MMP-1

[0117] Los inventores han elegido la secuencia Gly-Ile-Leu por su capacidad de ocupar los huecos P'1, P'2 y P'3 de la colagenasa de tipo I, la MMP-1. Se ha probado la actividad de esta última en su sustrato sintético, el DNP-

Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂, en presencia o en ausencia del péptido 5 que presenta la secuencia Gly-Ile-Leu a concentración 10⁻⁵, 10⁻⁴ y 10⁻³ M.

5 [0118] Los resultados (no representados) muestran que el péptido 5 disminuye de forma dosis-dependiente la actividad de la MMP-1 sobre su sustrato sintético. Se ha medido el IC 50 del péptido Gly-Ile-Leu; es de 0,71*10⁻⁴ M, es decir, una concentración de péptido de 21,3 µg/ml.

[0119] Entonces, puede generarse la parte C terminal Gly-Ile-Leu del péptido bifuncional según la invención en caso de exceso de uroquinasa y provocar una inhibición de la actividad de la MMP-1. Estos datos confirman el interés del péptido para combatir el envejecimiento de la piel y/o la cicatrización de las heridas crónicas.

10 [0120] También se han realizado estudios con un modelo de estudio más completo: los modelos de piel *ex vivo*, que permiten imitar el envejecimiento de la piel, así como ciertas patologías asociadas. Los resultados obtenidos no están ilustrados, pero confirman los resultados obtenidos *in vitro*.

[0121] Por supuesto, la invención no se limita a los ejemplos ilustrados y descritos con anterioridad, que pueden presentar variantes y modificaciones sin que ello se aparte del marco de la invención.

BIBLIOGRAFÍA

15 [0122]

– Alix, A.J. A turning point in the knowledge of the structure-function-activity relations of elastin. *J Soc Biol* 2001; 195(2):181-93.

– Barone, E.J., *et al.*, Interleukin-1alpha and collagenase activity are elevated in chronic wounds. *Plast Reconstr Surg*, 1998 102(4): p. 1023-7; discussion 1028-9.

20 – Ferguson, M.W. y S. O'Kane, Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004 359(1445): p. 839-50.

– Fisher, G.J., *et al.*, Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am J Pathol*, 2009 174(1): p. 101-14.

25 – Floquet, N., Héry-Huynh, S., Dauchez, M., Derreumaux, P., Tamburro, A.M., Alix, A.J. Structural characterization of VGVAPG, an elastin-derived peptide. *Biopolymers*, 2004; 76(3):266-80. Review.

– Herbage, D. Collagènes et protéoglycannes du derme: données actuelles. en *Biologie de la peau*. 1997.

– Hornebeck, W., *Inflamm-âge et cascades protéolytiques*. Médecine et longévité. Vol. 1. 2009: Elsevier Masson. 38-43.

30 – Livak, K.J. y T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001 25(4): p. 402-8.

– Lorena, D., *et al.*, Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen*, 2002 10(2): p. 86-92.

– Méliopoulos A., L.C., *La peau. Médicales et internationales* ed. 1998.

– Shi, B., *et al.*, Effect of vacuum assisted closure on collagenase activity in human chronic wound. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 2006 22(6): p. 465-7.

35 – Voorhees, J. J., *et al.*, Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *J Invest Dermatol*, 2003; 120(5): p. 842-8.

– Weckroth, M., *et al.*, Epithelial tissue-type plasminogen activator expression, unlike that of urokinase, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-1, is increased in chronic venous ulcers. *Br J Dermatol*, 2004 151(6): p. 1189-96.

40

LISTA DE SECUENCIAS

[0123]

<110> REGENTIS INTERNATIONAL
 UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
 5 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> PÉPTIDO BIFUNCIONAL

<130> 9R59 BT FR 1

<160> 26

<210> 1
 10 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 1

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
 1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
 15 20 25

<210> 2
 <211> 25
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

25 <400> 2

Val-Gly-Thr-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Thr-Ala-Pro-Gly-Val-
 1 5 10

Gly-Thr-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
 15 20 25

<210> 3
 <211> 25
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 3

ES 2 631 030 T3

Val-Gly-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10

Gly-Gln-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
15 20 25

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 4

Val-Gly-Ala-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Ala-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10

Gly-Ala-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
15 20 25

10

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 5

Val-Gly-Leu-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Leu-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10

Gly-Leu-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
15 20 25

20

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 6

Val-Gly-Val-Leu-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Leu-Pro-Gly-Val-
1 5 10

Gly-Val-Leu-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
15 20 25

30

<210> 7

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 631 030 T3

<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 7

Val-Gly-Val-Ile-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ile-Pro-Gly-Val-
1 5 10
Gly-Val-Ile-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
15 20 25

5 <210> 8
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

10 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 8

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10
Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Ile-Ile-Leu
15 20 25

15 <210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

20 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 9

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10
Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Leu-Ile-Leu
15 20 25

25 <210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

30 <400> 10

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10
Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Val-Leu
15 20 25

ES 2 631 030 T3

<210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 11

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ala-Leu
15 20 25

10 <210> 12
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 12

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Gly-Leu
15 20 25

20 <210> 13
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 13

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Phe
15 20 25

30 <210> 14
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 14

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
 1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Ala
 15 20 25

<210> 15

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 15

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
 1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Ile
 15 20 25

10

<210> 16

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 16

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
 1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Val
 15 20 25

20

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 17

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
 1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Ser-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
 15 20 25

30

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 631 030 T3

<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 18

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10
Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Tyr-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
15 20 25

5 <210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 19

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10
Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Gly-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
15 20 25

<210> 20
15 <211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 20

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10
Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Ala-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
15 20 25

<210> 21
25 <211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

30 <400> 21

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10
Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Arg-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu
15 20 25

ES 2 631 030 T3

- <210> 22
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

 <400> 22

 Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
 1 5 10

 Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Ser-Gly-Ile-Leu
 15 20 25

 10 <210> 23
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

 <400> 23

 Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
 1 5 10

 Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Tyr-Gly-Ile-Leu
 15 20 25

 20 <210> 24
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

 <400> 24

 Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
 1 5 10

 Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Ile-Leu
 15 20 25

 30 <210> 25
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

 35 <400> 25

ES 2 631 030 T3

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Ala-Gly-Ile-Leu
15 20 25

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz

<400> 26

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Val-
1 5 10

Gly-Val-Ala-Pro-Gly-Arg-Val-Arg-Arg-Gly-Ile-Leu
15 20 25

10

REIVINDICACIONES

1. Péptido bifuncional capaz de activar la síntesis de colágeno y de inhibir la producción de metaloproteinasas de matriz, **caracterizado por que** presenta una secuencia que contiene tres partes peptídicas A, B y C:
- 5 – correspondiendo la primera parte peptídica A a un hexapéptido repetido al menos tres veces, siendo capaz dicha parte A de unirse a una proteína receptora que enlaza la elastina para estimular la síntesis de colágeno, y presentando la secuencia X1-Gly-X2-X3-Pro-Gly, donde:
- o X1 corresponde a un aminoácido cualquiera,
 o X2 corresponde a un aminoácido elegido entre Val, Thr, Gln, Ala, Leu,
10 o X3 corresponde a un aminoácido elegido entre Ala, Leu, Ile,
- correspondiendo la segunda parte peptídica B a un tetrapéptido capaz de actuar como inhibidor competitivo de la proteasa uroquinasa y de ser escindido por dicha proteasa, y presentando la secuencia Arg-Y1-Arg-Y2, donde Y1 e Y2 corresponden cada uno a un aminoácido elegido entre Ser, Tyr, Gly, Ala, Arg, Val, Leu, y
- 15 – correspondiendo la tercera parte peptídica C a un tripéptido que ocupa al menos un sitio activo de las metaloproteinasas de matriz para permitir una inhibición de dichas proteinasas, y presentando la secuencia Z1-Ile-Z2, donde:
- o Z1 corresponde a un aminoácido elegido entre Gly, Ile, Leu y
 o Z2 corresponde a un aminoácido elegido entre Leu, Phe, Ala, Ile, Val.
- 20 2. El péptido bifuncional según la reivindicación 1 **caracterizado por que** la primera parte peptídica A de dicho péptido presenta la secuencia Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly.
3. El péptido bifuncional según la reivindicación 1 o 2 **caracterizado por que** la segunda parte peptídica B de dicho péptido presenta la secuencia Arg-Val-Arg-Leu.
- 25 4. El péptido bifuncional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por que** la tercera parte peptídica C de dicho péptido presenta la secuencia Gly-Ile-Leu.
5. El péptido bifuncional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado por que** presenta la siguiente secuencia S1, que corresponde a la secuencia SEQ ID n°1:
- 30 S1: N-(Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly)_n-Arg-Val-Arg-Leu-Gly-Ile-Leu-OH
- donde N y OH corresponden respectivamente a los extremos N-terminal y C-terminal de dicho péptido y donde n=3
- 35 6. El péptido bifuncional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado por que** corresponde a una de las secuencias SEQ ID n°2 a SEQ ID n°26.
7. El péptido bifuncional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado por que** se obtiene por síntesis química.
- 40 8. El péptido bifuncional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado por que** se conserva en forma liofilizada.
9. El péptido bifuncional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su utilización para el tratamiento de las enfermedades de cicatrización crónicas.
- 45 10. El péptido bifuncional para su utilización según la reivindicación 9 para el tratamiento de las escaras o de las úlceras.
11. El péptido bifuncional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su utilización para la reparación y/o la regeneración del tejido dérmico.
- 50 12. El péptido bifuncional para su utilización según la reivindicación 11 para el tratamiento del envejecimiento de la piel.
- 55 13. Composición cosmética y/o farmacéutica que incorpora el péptido bifuncional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

14. La composición cosmética y/o farmacéutica según la reivindicación 13 que comprende la concentración de péptido bifuncional en una cantidad entre 10 $\mu\text{g/mL}$ y 1 mg/mL , y de forma preferible casi igual a 100 $\mu\text{g/mL}$.

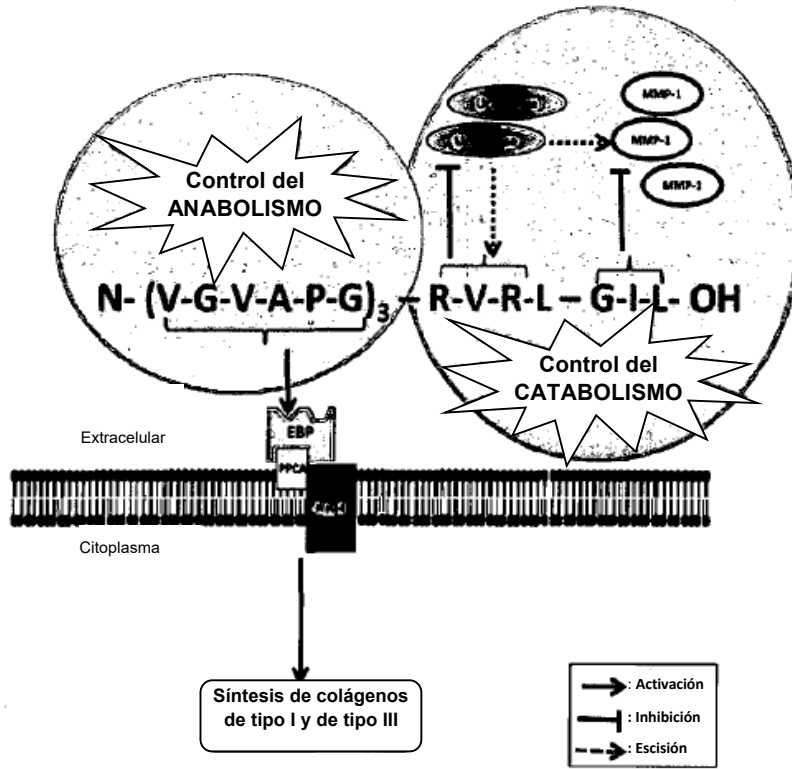


Fig. 1

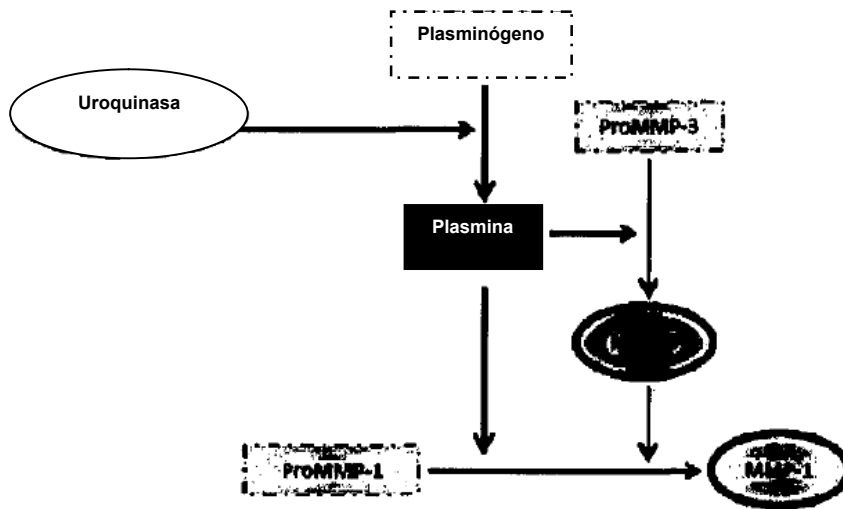


Fig. 2

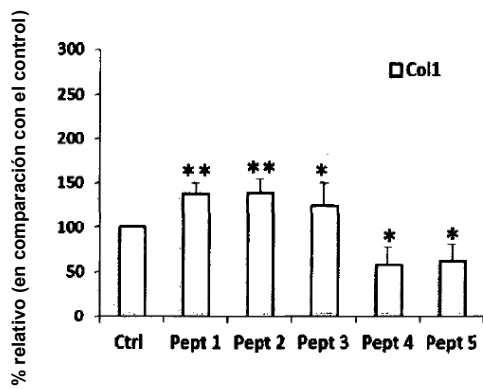


Fig. 3A

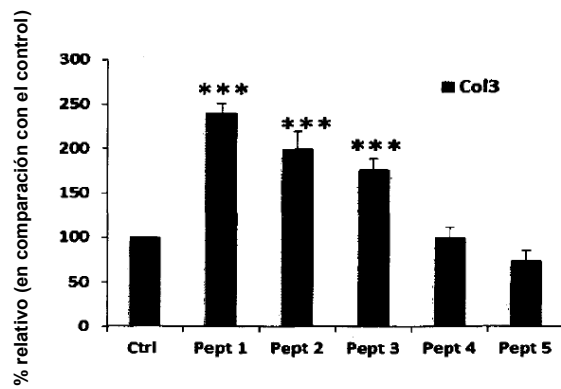


Fig. 3B

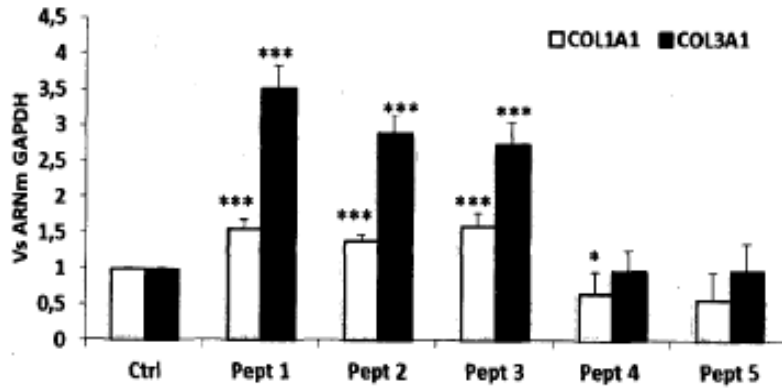


Fig. 4

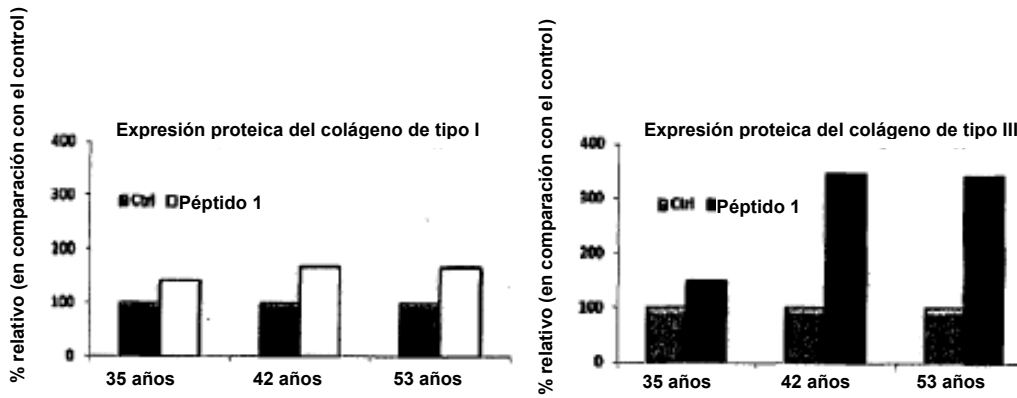


Fig. 5

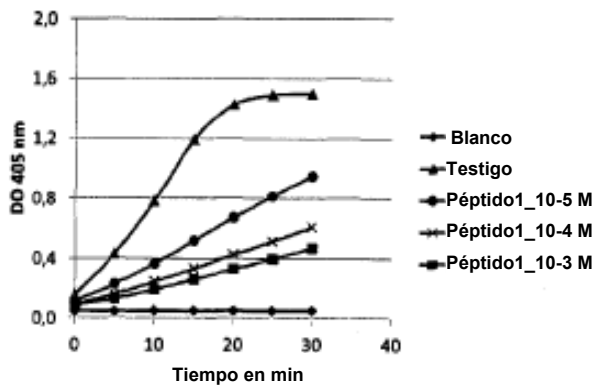


Fig.6A

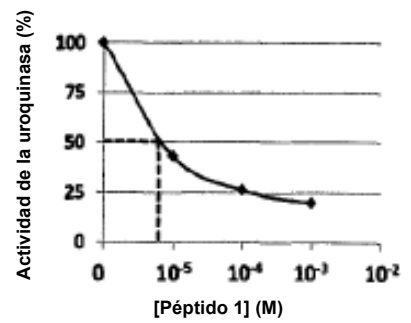


Fig.6B

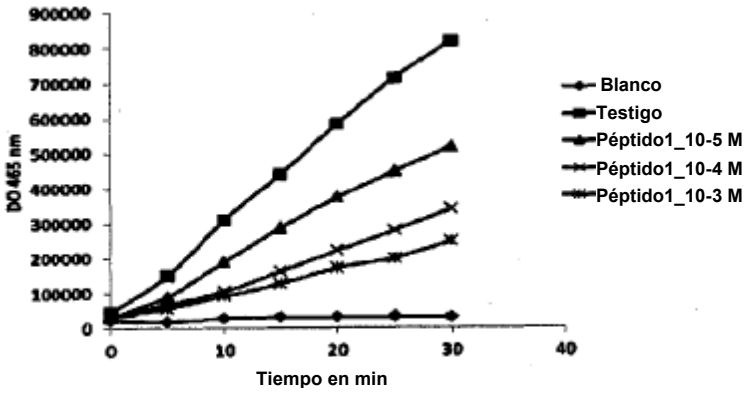


Fig.7A

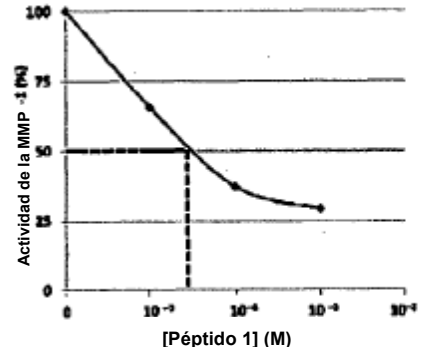


Fig.7B

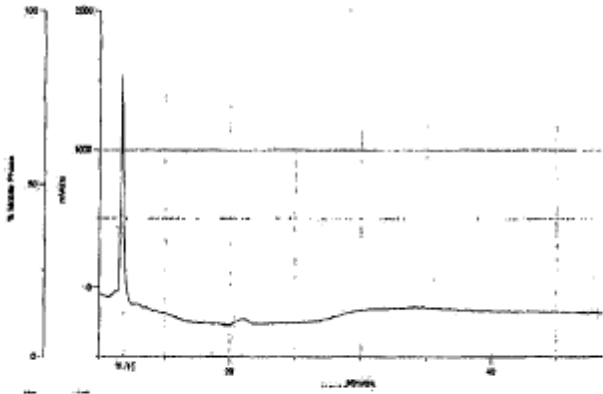


Fig.8A

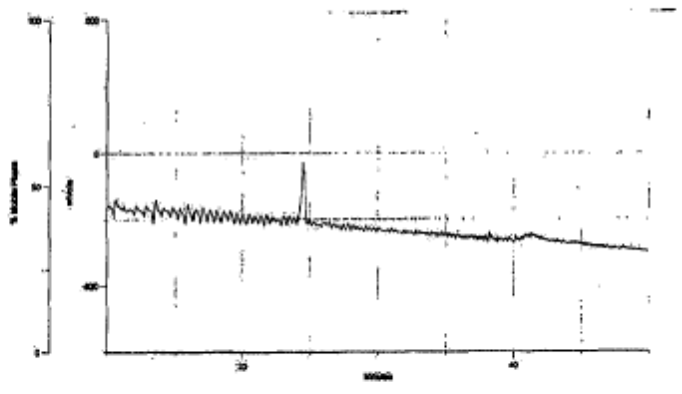


Fig. 8B