

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 804**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)
A61K 8/64	(2006.01)
C07K 14/52	(2006.01)
A61Q 7/02	(2006.01)
A61Q 19/02	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01)
A61K 38/07	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2014 PCT/US2014/037978**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14200651**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2014 E 14730697 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 3007716**

54 Título: **Tetrapéptidos derivados de quimiocinas humanas C-X-C útiles para el tratamiento de diversas afecciones de la piel**

30 Prioridad:

14.06.2013 US 201361835424 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZHANG, LIJUAN y
CARMICHAEL, ROBIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 631 804 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 derivados de quimiocinas humanas C-X-C útiles para el tratamiento de diversas afecciones de la piel

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 61/835.424, presentada el 14 de junio de 2013.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se refiere a tetrapéptidos que presentan actividad biológica, cosmética y terapéutica. En particular, la invención se refiere a tetrapéptidos que derivan de una región conservada de diversas quimiocinas C-X-C. Estos péptidos han mostrado actividad para promover la migración de las células, la angiogénesis, para neutralizar el componente celular bacteriano, tales como las señales proinflamatorias inducidas por LTA, y para estimular la renovación en la epidermis normal. La invención también se refiere a métodos para usar estos péptidos
15 para promover la reparación de heridas y tratar diversas afecciones en la piel y otras superficies del cuerpo, tales como la cavidad oral.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 20 Los queratinocitos y las células endoteliales dérmicas son la principal fuente de factores solubles útiles para regular la cicatrización de las heridas y las úlceras en la piel. Las anomalías debidas a una disminución en actividades como la producción de los factores de crecimiento, la respuesta angiogénica, la función de los macrófagos, la acumulación del colágeno, la función de barrera de la epidermis y la migración y la proliferación de los queratinocitos y de los fibroblastos pueden contribuir a una reparación de heridas defectuosa. En los entornos clínicos para tratar
25 heridas se han usado factores de crecimiento y citocinas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas (Rees *et al*, 1999) y GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos-macróforos) que se ha demostrado que ejercen efectos beneficiosos en la cicatrización de heridas en pacientes que padecen diversas heridas y úlceras cutáneas crónicas de diversa etiología, incluyendo úlceras en las piernas relacionadas con hidroxurea (Stagno *et al*, 1999), úlceras venosas en las piernas (Da Costa *et al*, 1999), úlceras
30 relacionadas con la hemoglobinopatía (Voskaridou *et al*, 1999), y heridas resultantes de una amputación (Gaches *et al*, 1998). Por otro lado, la administración intradérmica de GM-CSF en pacientes leproso con lesiones en la piel conduce a una mayor cicatrización de heridas y un aumento del número y de las capas de queratinocitos (Kaplan *et al*, 1992; Braunstein *et al*, 1994).
- 35 Tanto los factores de crecimiento como las citocinas son proteínas. Las dificultades con el uso de terapias proteicas para tratar heridas epidérmicas están a menudo relacionadas con el gran tamaño de las proteínas implicadas. La estructura compleja y el coste de fabricación de proteínas naturales son prohibitivos para un uso clínico amplio. La estabilidad y la compatibilidad de tales proteínas naturales en la formulación son también una preocupación importante. La mala penetración debido al gran tamaño de las proteínas naturales para alcanzar la capa diana de la
40 piel reduce a menudo la eficacia y explica los efectos beneficiosos fallidos de la terapia de proteínas. Para superar estos problemas, los péptidos cortos que llevan la actividad de proteínas grandes deben cumplir la necesidad de una producción menos costosa y rentable, y un manejo y manipulación sencillos. Además, los péptidos bioactivos cortos son mejor absorbidos y retenidos por el tejido de la herida debido a una menor susceptibilidad a la proteasa. La ventaja de las características de absorción de péptidos bioactivos cortos también los convierte en una opción viable
45 para usos más allá del cuidado de heridas agudas y crónicas, tal como para el tratamiento de los problemas de piel asociados con el envejecimiento y la exposición al sol.

- Las quimiocinas están estructuralmente relacionadas y representan una gran superfamilia de proteínas de 8 a 150 kD que poseen diversas actividades biológicas. Por lo general, se secretan tras la estimulación celular para controlar
50 el tráfico de leucocitos durante la homeostasis, así como durante la inflamación, y son necesarias para la unión entre la inmunidad innata y adaptativa. Junto con las moléculas de adhesión, tales como las integrinas y las selectinas, las quimiocinas y sus receptores actúan principalmente como parte de una compleja red molecular que facilita el movimiento selectivo de tipos celulares específicos dentro y fuera del microambiente tisular diana (Key *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2003). Las quimiocinas median selectivamente el reclutamiento regional específico de neutrófilos,
55 macróforos y linfocitos. Además de ser factores quimiotácticos, las quimiocinas también desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis, la angiogénesis/angioestasis, la diferenciación y activación celular, la cicatrización de heridas, el crecimiento y metástasis tumoral, la localización de linfocitos y el desarrollo de tejido linfóide, e influencia del balance general de tipo 1/tipo 2 de la respuesta inmune (Behm *et al.*, 2012; Gillitzer *et al.*, 2001; Raman *et al.*, 2011; Romagnani *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2000).

60

Definidas por un motivo de tetracisteína, las quimiocinas se subdividen en cuatro familias distintas de acuerdo con las configuraciones de los residuos de cisteína en su extremo amino. Existen dos subfamilias grandes, la subfamilia CCL (CCL1 a CCL28) y la subfamilia CXCL (CXCL1 a CXCL16), así como dos subfamilias pequeñas, subfamilia XCL (XCL1 a XCL2) y subfamilia CX3CL1 (Bacon et al., 2003). La subfamilia CXC de quimiocinas desempeña un papel importante en diversos procesos, incluyendo inflamación, cicatrización de heridas, regulación del crecimiento, angiogénesis y tumorigénesis (Keeley et al., 2008; 2011). Muchas quimiocinas interactúan con los restos de glicosaminoglicano (GAG) de proteoglicanos en las células endoteliales y la matriz extracelular (Handel et al., 2005). La heparina, que sirve como compuesto modelo para el sulfato de heparina, es la clase más ubicua de GAG que se expresa en prácticamente todas las células del cuerpo. Todas las quimiocinas interactúan con la heparina GAG.

En los estudios se observó que las quimiocinas C-X-C mostraban algunas similitudes de secuencia en sus secuencias aminoacídicas primarias aunque altamente conservadas en las estructuras secundarias. El examen de las secuencias aminoacídicas primarias de nueve quimiocinas C-X-C humanas revela una región altamente conservada situada en la porción C-terminal que está implicada en la unión GAG usando el número de acceso NCBI de cada quimiocina mostrada a continuación en "Descripción detallada de la invención, 1^{er} párrafo". Se generan tetrapéptidos a partir de la región de unión a GAG y se ensaya la bioactividad. Para mayor sorpresa, los tetrapéptidos mostraron diversas bioactividades incluyendo promover la migración de queratinocitos, inducir la angiogénesis en las células endoteliales de la vena umbilical humana, neutralizar las citocinas proinflamatorias inducidas por LTA, y la modulación del crecimiento celular y la producción del factor de crecimiento. Los tetrapéptidos son útiles como productos farmacéuticos y cosméticos para mejorar diversas afecciones de la piel.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a péptidos bioactivos cortos que son útiles para promover la cicatrización de heridas en mamíferos. Las heridas dirigidas preferentemente por los péptidos aislados son aquellas que afectan a la piel y a las superficies mucosas asociadas. Aunque no se limiten a ningún mecanismo particular, los péptidos de la invención son capaces de efectuar la cicatrización de heridas estimulando la migración celular y la angiogénesis. Los péptidos de la invención son útiles tanto en formas *in vitro* como *in vivo*, y son capaces de inducir las actividades anteriormente mencionadas en queratinocitos.

Una realización de la presente invención se dirige hacia los tetrapéptidos aislados de la fórmula (I o V)-X₁-K-X₂, donde X₁ puede seleccionarse de E, Q y K; y X₂ puede seleccionarse de M, F, I, W, V y L. Los péptidos aislados pueden contener formas enantioméricas L o D de aminoácidos, o una combinación de las mismas. De acuerdo con otra realización de la invención, los péptidos aislados pueden conjugarse con una proteína portadora, o modificarse a través de amidación C-terminal o acilación N-terminal con ácidos grasos (es decir, lipidación). Estas adiciones mejoran la bioactividad de los péptidos cuando se aplican a la piel y heridas de la misma.

De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, los péptidos aislados contienen una lisina en la posición 3. Las realizaciones específicas de los péptidos aislados comprenden las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, cada una de las cuales muestran actividades estimuladoras hacia la migración celular y el efecto de la reparación de heridas.

Los tetrapéptidos derivados mostrados a continuación encajan en la fórmula (I o V)-X₁-K-X₂, donde X₁ puede seleccionarse de E, Q y K; y X₂ puede seleccionarse de M, F, I, W, V y L.

SEQ ID NO.	HB NO.	Secuencia
1	HB2233	IEKM
2	HB2267	VEKF
3	HB2270	IEKI
4	HB2271	IQKI
5	HB2272	IKKW
6	HB2273	IKKV
7	HB2274	IKKL

Otra realización de la presente invención se traza hacia composiciones terapéuticas o cosméticas que contienen un vehículo farmacéuticamente o cosméticamente aceptable y uno o más de los péptidos mencionados anteriormente. Las composiciones mencionadas anteriormente son útiles para la fabricación de medicamentos o composiciones cosméticas para su uso en la aplicación para curar heridas de piel de mamíferos. El péptido en tales composiciones varía preferiblemente en una concentración de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, o de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las formas preferidas de la composición son aerosoles,

emulsiones, líquidos, soluciones, lociones, cremas, pastas, ungüentos, polvos, geles y espumas.

Además, los péptidos de la presente invención, y composiciones que los contienen, pueden proporcionar características útiles para su inclusión en el cuidado general de la piel y formulaciones cosméticas, tales como diversos cosméticos para la piel, cremas para la piel, lociones, filtros solares y lociones o cremas terapéuticas tales como formulaciones anti-acné para el cuidado tras un procedimiento por láser.

La presente invención también se refiere a métodos para usar las composiciones mencionadas anteriormente para curar heridas en mamíferos. Típicamente, el método de tratamiento implica administrar una cantidad eficaz de composiciones que contienen péptidos a heridas y/o afecciones inflamatorias, especialmente aquellas de la piel (epidermis) y tejidos mucosales asociados, durante una cantidad de tiempo eficaz. Dichas heridas incluyen heridas quirúrgicas, abrasiones, ampollas, quemaduras, laceraciones, úlceras, moretones, erupciones cutáneas, cicatrices, estrías y daños en la piel debido a efectos intrínsecos y extrínsecos del envejecimiento y la exposición ambiental, incluyendo arrugas, flacidez de la piel y foto-daño. Las afecciones inflamatorias de la piel incluyen psoriasis, dermatitis atópica y rosácea e inflamación derivada de la depilación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las quimiocinas modulan la cicatrización de heridas, las actividades inflamatorias/antiinflamatorias y angiogénicas/angiostáticas. Éstas ejercen su función uniéndose a la clase de receptores acoplados a proteína G (GPCR) en los leucocitos y los glicosaminoglicanos de la superficie celular (GAG) en los tejidos diana. La unión de quimiocinas a GAG está mediada a través de fuerzas iónicas generadas por las interacciones de cadenas cargadas negativamente en GAG con grupos de residuos básicos en las quimiocinas (Handel et al., 2005). *In vivo*, la situación es más complicada, y se ha propuesto que las quimiocinas trabajan produciendo gradientes inmovilizados o haptáticos, que dirigen la migración de las células a los sitios de inflamación (Proudfoot, 2006). Las interacciones GAG-quimiocina pueden desempeñar un papel fundamental en el establecimiento de gradientes a lo largo de la matriz extracelular y pueden facilitar la unión de las quimiocinas a sus receptores acoplados a proteína G. Los GAG o proteoglicanos de sulfato de heparina (HS) también pueden comportarse como correceptores de quimiocinas funcionales para señalización, dando lugar a la formación de un complejo ternario de GAG/quimiocina y receptor de quimiocina (Handel et al., 2005). Los estudios sobre quimiocinas específicas han mapeado los sitios de unión de los GAG a las quimiocinas. En un examen detallado de la secuencia aminoacídica primaria del sitio de unión a GAG conservado de nueve proteínas precursoras de quimiocinas C-X-C humanas, incluyendo precursor de GRO-alfa (CXCL-1), precursor de quimiocina 2 (CXCL-2), precursor de quimiocina 3 (CXCL-3), precursor de quimiocina 4 (CXCL-4), precursor de quimiocina 5 (CXCL-5), precursor de quimiocina 6 (CXCL-6), precursor de IL-8 (CXCL8), precursor de quimiocina 9 (CXCL-9), precursor de quimiocina 11 (CXCL-11), se encontró una región de tetrapéptido conservada que es de particular interés. El tramo de tetrapéptido conservado definido en este estudio se localiza dentro de una región de unión a GAG parcial. A continuación se muestra una ilustración esquemática de la alineación de las secuencias C-terminales de precursores de quimiocinas C-X-C humanas seleccionadas y destacada del tetrapéptido corto conservado. La alineación se genera utilizando el programa COBALT para la alineación de múltiples secuencias de proteínas en el sitio web del NCBI (ncbi.nlm.nih.gov). Sólo se muestra la porción C-terminal de cada quimiocina en la alineación y los números son el comienzo y el final de los residuos en las secuencias. A. Precursor GRO-alfa (número de acceso NCBI P09341.1); B. precursor de quimiocina 2 (número de acceso NCBI NP_002080.1); C. precursor de quimiocina 3 (número de acceso NCBI NP_002081.2); D. precursor de quimiocina 4 (número de acceso NCBI P80162.4); E. precursor de quimiocina 5 (número de acceso NCBI NP_002985.1); F. precursor de quimiocina 6 (número de acceso NCBI NP_002984.1); G. precursor de IL-8 (número de acceso NCBI); H. precursor de quimiocina 9 (número de acceso NCBI NP_002407.1); I. precursor de quimiocina 11 (número de acceso NCBI EAX05774.1).

	Residuo de inicio	Residuo final
	74 VIATLKNGR-KACLNPASPIVKKI IEKML NSD-KSN	107
B.	74 VIATLKNGQ-KACLNPASPMVKKI IEKML KNG-KSN	107
C.	74 VIATLKNGK-KACLNPASPMVQKI IEKIL NKG-STN	107
D.	72 LIATLKNGR-KICLDLQAPLYKKI IKKLL ES----	101
E.	80 VVASLKNGK-EICLDPEAPFLKKV IQKIL DGGnKEN	114
F.	80 VVASLKNGK-QVCLDPEAPFLKKV IQKIL DSGnKKN	114
G.	66 IIVKLS DGR-ELCLDPKENWVQRV VEKFL KRA—ENS	99
H.	63 I IATLKNGV-QTCLNPDSADV KEIKKWE KQVsQKK	125
I.	62 VIITLKENgQRCLNPKSKQARLI IKKVER KNf---	94
	* * * * * * * * * * * * * * * *	

Consenso	I-K-	
----------	------	--

Se muestra en la alineación un motivo tetrapéptido corto que está altamente conservado entre las quimiocinas CXC. * indica un sitio de unión a GAG parcial de quimiocinas. Los tetrapéptidos muestran una cadena principal conservada de I-K-. Excepto IL-8 que tiene una valina (V), todos los demás tienen una isoleucina (I) en la posición 1 y una lisina (K) en la posición 3 del motivo tetrapéptido. Por lo tanto, se puede usar la fórmula (I o V)-X₁-K-X₂ para representar los tetrapéptidos generados y mostrados en la Tabla 1. Cabe señalar que la región de unión a GAG de las quimiocinas también está implicada en la formación de dímeros ya que la mayoría de las quimiocinas CXC existen de forma reversible como monómeros y dímeros, y por lo tanto, el perfil de reclutamiento se verá influenciado no sólo por la constante de equilibrio monómero-dímero, sino también por las interacciones de unión de monómero y dímero a los receptores de neutrófilos y a GAG sobre la superficie celular y el espacio intersticial en el tejido diana (Gangavarapu et al., 2012).

Los tetrapéptidos derivados mostrados a continuación encajan en la fórmula I(V)-X₁-K-X₂, donde X₁ puede seleccionarse de E, Q y K; y X₂ puede seleccionarse de M, F, I, W, V y L.

15

SEQ ID NO.	HB NO.	Secuencia
1	HB2233	IEKM
2	HB2267	VEKF
3	HB2270	IEKI
4	HB2271	IQKI
5	HB2272	IKKW
6	HB2273	IKKV
7	HB2274	IKKL
8	HB2268	KMG

Las quimiocinas C-X-C se conocen bien por su actividad quimiotáctica hacia muchos tipos de células. Para evaluar si los tetrapéptidos recién obtenidos poseen la actividad para estimular la migración de queratinocitos, se sometieron las SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 a un ensayo de herida por raspado de queratinocitos, un ensayo aceptado para evaluar la capacidad de compuesto activo para inducir la migración celular y el cierre de la herida in vitro. El experimento se realizó en el medio de crecimiento de queratinocitos exento de suero en ausencia de complemento con el fin de restringir la proliferación celular. El área de herida se examinó mediante microscopía de contraste de fase en los momentos indicados. Como se muestra en la Tabla 1, los tetrapéptidos inducen significativamente el cierre de la herida por raspado. A 20 µg/ml, el porcentaje de cierre de la herida inducido por las SEQ IDs 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 varía del 165 % al 240 % en comparación con el de PBS tratado que se tomó como del 100 % (Tabla 1). Un péptido generado aleatoriamente de SEQ ID NO 8 no induce la migración celular y el cierre de la herida por raspado. Para confirmar que los péptidos no son tóxicos para los queratinocitos a las concentraciones ensayadas para el cierre de la herida por raspado, todos los péptidos se sometieron a la prueba de citotoxicidad MTT. Ninguno de los péptidos era citotóxico para los queratinocitos normales de la piel in vitro después de 24 horas de incubación a concentraciones de hasta 500 µg/ml. En conclusión, el tratamiento con los tetrapéptidos SEQ ID NOs 1-7, indujo significativamente la migración de células normales de queratinocitos epidérmicos humanos en el área de raspado como se indica por el porcentaje de cierre del área herida después de 7 h de tratamiento en comparación con las células de control tratadas con PBS.

La angiogénesis, la formación de nuevos capilares a partir de la red vascular preexistente, es una etapa esencial de la reparación de la herida. Los péptidos generados en la presente invención, SEQ ID NOs 1-7, también estimulan la formación de tubos capilares. El ensayo de angiogénesis in vitro utiliza células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC) para medir una serie de eventos que conducen a la formación de nuevos tubos capilares. Tras la inducción, la HUVEC experimenta migración para alinearse entonces brotando de células individuales. El evento de brotación conduce a la formación de nuevos tubos capilares que se desarrollan adicionalmente para formar polígonos cerrados. Finalmente se desarrolla una estructura tipo malla compleja. El péptido de catelicidina humano, LL-37, es un ejemplo bien estudiado para promover la angiogénesis. Se utiliza como control positivo en la evaluación. El brote de nuevos tubos capilares se hace visible justo después de 3 h de tratamiento con LL-37 (Tabla 2). Después de 5 horas de tratamiento con LL-37, se forman los polígonos cerrados. En comparación con LL-37, las SEQ ID NOs. 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, indujeron cambios similares en HUVEC dando lugar a nueva formación de tubos capilares y estructuras poligonales complejas a las 3 y 5 h de tratamiento (Tabla 2). Por el contrario, el péptido SEQ ID NO 8 (KMG) generado aleatoriamente y PBS no inducen tal cambio en el momento en que se observó la actividad angiogénica para LL-37 y los péptidos de la invención (Tabla 2).

El componente de la pared celular Gram-positivo peptidoglicano (PGN) es bien conocido para estimular la expresión de citocinas proinflamatorias. El ácido lipoteicoico (LTA) es la molécula clave en PGN que causa un aumento dependiente de la concentración y el tiempo en las señales proinflamatorias incluyendo la sintasa de óxido nítrico (iNOS), la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la IL-1 beta, el TNF-Alfa y la regulación por aumento de IL-6 (Lin et al., 2010).

5 Por lo tanto, se trató LTA con los péptidos de la invención y luego se evaluó la actividad estimuladora de IL-6 tras el contacto con queratinocitos de piel humana. Como se muestra en la Tabla 3, el pretratamiento de LTA con SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 reduce significativamente el nivel de expresión de IL-6 estimulado por LTA en cultivo de queratinocitos de piel humana, sugiriendo que los péptidos pueden neutralizar el efecto tóxico de LTA libres. Es muy probable que los residuos cargados positivamente de los tetrapéptidos se unan al LTA cargado negativamente, 10 bloqueando así la interacción de LTA con sus receptores. Esto es significativo ya que los componentes de la pared celular bacteriana han estado implicados en afecciones inflamatorias de la piel tales como acné, rosácea, dermatitis atópica, etc.

La modulación de la proliferación celular es otro paso importante en la reparación de heridas. Se ha ensayado el 15 péptido de la invención para determinar la actividad proliferativa en queratinocitos de piel humana. En comparación con la actividad quimiotáctica medida en el ensayo de rascado, la angiogénesis y el bloqueo de LTA indujeron la expresión de IL-6, y los péptidos de la invención mostraron varias actividades moderadas sobre la modulación de la proliferación de queratinocitos. SEQ ID NO 1 (HB2233) mostró actividad inhibitoria sobre la proliferación de queratinocitos, se observó también dicha actividad inhibitoria para la SEQ ID NO 3 (HB2270). La SEQ ID NO 6 20 parece estimular la proliferación de queratinocitos, pero tal actividad es sólo marginal. La actividad inhibitoria sobre la proliferación de queratinocitos induce a ensayar la expresión de TGF- β 1, ya que este factor de crecimiento es bien conocido por inhibir la proliferación celular. Como se muestra en la Tabla 4, tanto la SEQ ID NO 1 como la 3 indujeron un nivel moderado de expresión de TGF- β 1 en queratinocitos de cultivo.

25 SOR-300-FT, desarrollado por MatTek Corporation (Ashland MA), es un tejido de psoriasis in vitro altamente diferenciado compuesto por queratinocitos normales y humanos y fibroblastos psoriáticos. Morfológicamente, el tejido es de espesor uniforme y expresa niveles aumentados de células hiperproliferadas, así como marcadores proinflamatorios tales como psoriasina, elafina, beta-defensina-2 humana y LL-37, etc. (Ayehunie et al., 2012). La afección proinflamatoria del tejido induce a ensayar los péptidos de la invención para ver si modulan la respuesta 30 inflamatoria. Debido al alto coste del modelo de tejido, se seleccionó un péptido representativo SEQ ID NO 1, HB2233, como ensayo de concepto utilizando el modelo de tejido SOR-300-FT. Los tejidos de SOR-300-FT se trataron con HB2233 por duplicado a 200 μ g/ml. Se estudian 12 marcadores génicos asociados con la afección de psoriasis. El estudio se realizó en paralelo con calcipotriol. El análisis por qPCR reveló que después de 72 h de tratamiento, la SEQ ID NO 1 (HB2233) reduce significativamente el nivel de expresión de LL-37 (3,7 veces) que se 35 sobreexpresa en la piel de psoriasis inflamada (Tabla 5). El fármaco psoriasis calcipotriol reduce significativamente HBD-2 (9 veces) y la psoriasina (2,3 veces). Tanto HB2233 como calcipotriol reducen la expresión de Ki67 que es responsable de la hiperproliferación y la maduración temprana de queratinocitos en la piel con psoriasis. Además, la SEQ ID NO 1 (HB2233) también reduce la expresión de CXCL1 (GRO alfa) y CXCL5 (ENA-78), ambas de las cuales se aumentan significativamente en la piel con psoriasis en comparación con la piel sana normal (Ayehunie S., 2012), 40 sin embargo, el calcipotriol no parece afectar al nivel de ambos genes. Esto sugiere claramente que HB2233 podría ser un nuevo fármaco terapéutico que funciona a través de un mecanismo diferente al del fármaco actual calcipotriol para el tratamiento de afecciones inflamatorias de la piel tales como psoriasis.

Para comprender mejor cómo el mismo péptido afecta a los tejidos normales de piel sana, se puso la SEQ ID NO:1, 45 HB2233, en un estudio de perfiles genéticos realizado por Sunny Biodiscovery (Santa Paula, CA) usando sustitutos de piel humana normal EPIDERM™, MatTek Corporation (Ashland, MA). Los sustitutos de piel se equilibraron durante una noche antes del tratamiento con péptido o control de agua en duplicados durante 24 horas. Al final del tratamiento, el ARN se extrajo y se sometió a análisis por matriz de PCR. Como se muestra en la Tabla 6, la SEQ ID NO 1, HB2233, estimula los genes que están implicados en la síntesis de ECM (colágeno e integrinas). Como era de 50 esperar, modula las quimiocinas (CXCL11 y MAPK3, etc.) y los factores de crecimiento (TGF- β 1 y VEGF, etc.). El estudio de perfiles genéticos apoya la actividad observada in vitro de que los péptidos de la invención modulan la proliferación celular, la angiogénesis y las actividades de cicatrización de heridas.

Todos los péptidos incluidos en la presente invención se sintetizaron usando química de fase sólida Fmoc (9- 55 fluorenilmetoxicarbonilo) estándar. Los péptidos se pueden preparar como secuencias amidadas o de ácidos libres usando aminoácidos estándar. La amidación del extremo carboxilo puede hacer que los péptidos de la invención sean menos susceptibles a la degradación de proteasas y aumenten su solubilidad en comparación con la forma de ácido libre, proporcionando por lo tanto una potencia terapéutica aumentada. Los péptidos pueden comprender enantiómeros de L- o D-aminoácidos, que contienen residuos de una forma enantiomérica o una combinación de 60 ambas formas. Los péptidos pueden modificarse tanto en el extremo N como en el extremo C. Por ejemplo, se

analiza que la lipidación o acetilación del N-terminal puede mejorar la penetración peptídica a través de la piel sin alterar la función bioactiva del péptido (Samah, 2011). Por lo tanto, los péptidos también pueden estar lipidados, lo que puede proporcionar una penetración cutánea mejorada. Los ejemplos de ácidos grasos saturados o insaturados que pueden utilizarse para proporcionar el componente lipídico C12-18 de los compuestos de la invención incluyen 5 ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido oleico y ácido linoleico. El extremo carboxi de los péptidos puede ser modificado con ácido (-COOH) o amidado (por ejemplo, -CONH₂, -CONHR o -CONR₂). La amidación del extremo carboxilo puede hacer que los péptidos de la invención sean menos susceptibles a la degradación de proteasas y aumenten su polaridad en comparación con las formas de 10 ácido libre, proporcionando por lo tanto una potencia terapéutica aumentada. Además, los grupos funcionales peptídicos que pueden modificarse típicamente incluyen anillos de hidroxilo, amino, guanidinio, carboxilo, amida, fenol, imidazol o sulfhidrilo.

Los péptidos también pueden conjugarse con moléculas portadoras solubles o insolubles para modificar sus propiedades de solubilidad según sea necesario y para aumentar las concentraciones locales de péptidos en tejidos 15 diana. Los ejemplos de moléculas portadoras solubles incluyen, pero no se limitan a, polímeros de polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona; los ejemplos de polímeros insolubles incluyen, pero no se limitan a, silicatos, poliestireno y celulosa. Los péptidos pueden ser microencapsulados usando tecnología de liposomas o mediante nanotecnología para mejorar su estabilidad y para liberación controlada. En general con respecto al protocolo anterior, los péptidos se pueden producir usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica tales como los 20 descritos en Merrifield (*JAm Chem Soc.* 85:2149, 1963); Carpino et al. (*J Org Chem.* 51:3732, 1986); Merrifield et al. (*Anal Chem.* 38:1905, 1966); or Kent et al. [*High Yield Chemical Synthesis Of Biologically Active Peptides On An Automated Peptide Synthesizer Of Novel Design*, IN: PEPTIDES 1984 (Ragnarsson, ed.) Almquist y Wiksell Int., Stockholm (Suecia), págs. 185-188], cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

25 La presente invención está dirigida a métodos de utilización de los péptidos descritos anteriormente, tales como en formulaciones o como agentes terapéuticos. Estos métodos pueden implicar el uso de un único péptido o múltiples péptidos en combinación. En ciertos casos, la composición de la invención se puede disponer dentro de dispositivos colocados sobre, dentro o debajo de la piel. Dichos dispositivos incluyen parches transdérmicos, implantes e 30 inyecciones que liberan las sustancias de tal manera que entran en contacto con la piel o el folículo piloso mediante mecanismos de liberación pasivos o activos. Las composiciones utilizadas para administrar los péptidos en los métodos descritos en el presente documento pueden estar en forma de aerosol, emulsión, líquido, loción, solución, gel, microencapsulación, crema, pasta, ungüento, polvo, espuma u otra formulación farmacéuticamente aceptable. Además, los péptidos pueden administrarse utilizando formulaciones menos implicadas tales como agua 35 desionizada/destilada, PBS o soluciones salinas médicas estándar.

La formulación puede tener opcionalmente un atractivo cosmético, y/o contener otros agentes tales como retinoides, vitamina C u otros péptidos que pueden actuar como adyuvantes para la acción terapéutica de los péptidos de la invención. También se pueden añadir antibióticos a la formulación para evitar la infección, permitiendo así que se 40 produzcan procesos de cicatrización máximos.

La formulación puede contener inhibidores de proteasa. Un inhibidor de proteasa puede seleccionarse para dirigirse específicamente a proteasas que se espera que degraden el péptido bioactivo seleccionado; tal selección se 45 determinaría basándose en la longitud y/o secuencia del péptido bioactivo. Sin embargo, los inhibidores de proteasa no necesariamente deben seleccionarse de una manera específica; por ejemplo, en la presente invención, se puede emplear un cóctel de inhibidor de proteasa, que contiene dos o más inhibidores. En la invención se pueden incorporar los siguientes tipos de inhibidores de proteasa: inhibidores de serina proteasa, inhibidores de cisteína proteasa, inhibidores de aspartato proteasa, inhibidores de metaloproteinasas, inhibidores de tiol proteasas e 50 inhibidores de treonina proteasa. El inhibidor de proteasa utilizado en la invención puede ser un péptido o una proteína o productos químicos. Los ejemplos no limitantes de tales inhibidores son las serpinas, que incluyen alfa-1-antitripsina, inhibidor del complemento 1, antitrombina, alfa-1-antiquimotripsina, inhibidor del activador del plasminógeno 1 y neuroserpina, o productos químicos incluyendo, pero no limitado a, ácido ursólico y ácido tranexámico que pueden actuar como coadyuvante para la acción terapéutica de los péptidos de la invención.

55 Generalmente, una formulación farmacéuticamente aceptable incluirá cualquier vehículo adecuado para su uso en la piel humana. Tales vehículos farmacéuticamente y cosméticamente aceptables incluyen etanol, dimetilsulfóxido, glicerol, sílice, alúmina, almidón y vehículos y diluyentes equivalentes. La formulación puede tener opcionalmente un 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 se pueden añadir antibióticos a la 60 formulación para evitar la infección, permitiendo así que se produzcan procesos de cicatrización máximos. La

concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml o aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente el 10 %; sin embargo, la concentración final empleada puede variar fuera de estos intervalos, dependiendo de la naturaleza de la herida/afección tisular, la bioactividad del péptido de la invención y el uso de cualquier adyuvante o técnica para obtener una absorción mejorada de la composición. The CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Second Edition (1992) describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos no limitantes usados habitualmente en la industria del cuidado de la piel, que son adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención. Los ejemplos de estas clases de ingredientes incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos tales como fragancias, pigmentos, colorantes, aceites esenciales, sensaciones cutáneas, astringentes, etc. (por ejemplo, aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, lactato de metilo, destilado de avellana de bruja), agentes antiacné, agente antiaglomerante, agentes antiespumantes, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos (por ejemplo, butilcarbamato de yodopropilo), antioxidantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tamponantes, agentes de carga, agentes quelantes, aditivos químicos, biocidas cosméticos, desnaturalizantes, astringentes de fármacos, analgésicos externos, formadores de película o materiales, agentes opacificantes, ajustadores de pH, propulsores, agentes reductores, secuestrantes, blanqueadores de la piel y agentes aclaradores (por ejemplo, hidroquinona, ácido kójico, ácido ascórbico, ascorbil fosfato de magnesio, ascorbilglucosamina), agentes acondicionadores de la piel (por ejemplo, humectantes), agentes calmantes y/o cicatrizantes de la piel (por ejemplo, pantenol y sus derivados, aloe vera, ácido pantoténico y sus derivados, alantoína, bisabolol y glicirrizinato dipotásico), agentes para el tratamiento de la piel, espesantes, y vitaminas y derivados de los mismos.

La administración de los péptidos de la invención y las composiciones asociadas pueden hacerse a seres humanos y animales, incluyendo todos los mamíferos. La aplicación también se puede hacer en combinación con materiales típicos y/o experimentales tales como injertos de tejido, sustitutos de la piel, productos de cultivo tisular y apósitos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, gasas (tejidas y no tejidas, impregnadas, no adherentes, empaquetadas, desbridantes); vendajes y sistema de compresión; rellenos y limpiadores para heridas; capas de contacto; colágenos; membranas amnióticas; dermis acelular humana; matrices acelulares y productos de combinación; y diversos apósitos usados comúnmente.

Lista de apósitos usados comúnmente

30

Categorías de apósitos para heridas	Productos
Películas	BIOCLUSIVE™ (Johnson & Johnson Medical, Inc)
	OMIDERM™ (Omicron Scientific Ltd.),
	OPSITE® (Smith & Nephew United, Inc)
	Apósito transparente POLYSKIN®II (Kendall Healthcare)
	TEGADERM™ (3M Health Care)
Hidrogeles	INTRASITE™ (Smith & Nephew United, Inc),
	NU-GEL™ (Johnson & Johnson Medical, Inc.)
	VIGILON® (Bard Medical Division)
Hidrocoloides	COMFEEL® (Coloplast Sween Corp.)
	DUODERM® (ConvaTec)
	RESTORE™ (Hollister Incorporated)
Polisacáridos	Apósito de absorción BARD® (Bard Medical Division)
	DEBRISAN (Johnson & Johnson Medical, Inc.)
	Gránulos DUODERM® (ConvaTec)
Alginatos	KALTOSTAT® (ConvaTec)
	SORBSAN™ (Dow Hicham Pharmaceuticals Inc)
Apósitos de espuma	ALLEVYN® (Smith & Nephew United, Inc)
	LYOFOAM® (Acme United Corporation)
Laminados	BIOBRANE® (Dow Hickam Pharmaceuticals Inc)

En general, la composición puede administrarse por vía tópica, oral, transdérmica, sistémica o por cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica como útil para administrar los péptidos de la invención al tejido diana. Las composiciones también pueden aplicarse de una manera *in vitro* o *ex vivo*, ya sea a células o injertos de pacientes que crecen en cultivo, por ejemplo.

Las composiciones de la presente invención pueden contener uno o más agentes adicionales que ejercen actividad

de cuidado de la piel. Junto al componente peptídico bioactivo, la presente invención puede contener otros agentes activos tales como ácido hialurónico, niacinamida, fitantriol, farnesol, bisabolol, ácido salicílico, retinol, ácido retinoico, ácidos alfa-hidroxi, ácido ascórbico y ácido algarúnicico. Se espera que ciertos agentes activos adicionales actúen sinérgicamente con el componente peptídico bioactivo, o mejorarán la vida útil de la formulación.

5 Además, las abreviaturas para los aminoácidos siguen el uso convencional:

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	10
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Los detalles sobre las técnicas para la formulación y administración de productos farmacéuticos se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Aunque la administración tópica local es deseable, existen otros medios de administración, por ejemplo: administración oral, parenteral, en aerosol, intramuscular, subcutánea, transcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. La presente invención puede ser formulada en una serie de vehículos portadores, por ejemplo, en una pulverización; un aerosol; una emulsión de tipo agua y aceite; una emulsión de tipo aceite y agua; una crema para el rostro o crema corporal; una loción para el sol o una loción para después del sol; u otro vehículo de administración tópica. Además, los péptidos de la presente invención, y composiciones que los contienen, pueden proporcionar características útiles para su inclusión en el cuidado general de la piel y formulaciones cosméticas, tales como diversos cosméticos para la piel, cremas para la piel, lociones, filtros solares y lociones o cremas terapéuticas tales como formulaciones anti-acné.

20 Áreas de aplicación

Los péptidos de la presente invención se pueden usar para tratar heridas de la piel. El daño del tejido de la piel y de las mucosas se produce cuando la capa epidérmica se rompe, tal como de una laceración, quemadura o ampolla. La lesión también puede implicar aplastamiento o moretones, lo que implica daño tisular sin fisura concurrente de la epidermis. Las infecciones de la piel, así como ciertas enfermedades crónicas tales como el cáncer y enfermedades autoinmunes también pueden afectar a las superficies epidérmicas. Las úlceras, tales como las que afectan a la diabetes o las asociadas con úlceras de presión, son otra forma de daño de la piel; estas heridas son a menudo bastante intratables, se inflaman, son propensas a la infección, y requieren un proceso de cicatrización de extensión. La persistencia de una úlcera u otro tipo de herida crónica se debe a un fracaso de los procesos celulares involucrados en la cicatrización y la nueva generación de vasos sanguíneos debido a la alteración de la capacidad de angiogénesis. La angiogénesis es el proceso de formación de una nueva red capilar (microvascular) en respuesta a la hipoxia u otros estímulos (Folkman et al., 1992). El proceso implica la secreción local de factores angiogénicos tanto del endotelio hipóxico como de pericitos de soporte que inducen la proliferación endotelial y el brote de neovasos. La angiogénesis insuficiente contribuye a la alteración de la cicatrización de heridas y úlceras cutáneas (Galiano et al., 2004). El fracaso en la cicatrización de heridas también puede ser el resultado de la incapacidad para epitelizar la lesión parcialmente debido al hecho de que los queratinocitos en el borde de la herida no emigran para cerrar o cubrir la llaga (Enoch y Price, 2004). La cicatrización de heridas cutáneas y mucosas está orquestada, en parte, por la activación de queratinocitos basales. Tras la activación, los queratinocitos situados en el perímetro de la herida migran para formar una única capa sobre la herida en un proceso denominado epitelización. Se ha

demostrado que los queratinocitos en el borde no cicatrizante de las heridas crónicas son hiperproliferativos pero no migratorios, y la falta de migración conduce a la incapacidad de epitelizar y desempeña un papel importante en la patogénesis de las úlceras crónicas (Harsha et al., 2008). La presente invención también se puede usar para tratar los daños asociados con queratinocitos en piel y tejidos mucosos. La expresión "tejidos mucosales asociados" se

5 refiere a cualquier tejido organizado de una manera similar a la piel y que contiene células epiteliales/queratinocitos incluyendo, pero sin limitación, las superficies de revestimiento interno asociadas a la boca, nariz, garganta, oreja, ano, genitales y la conjuntiva palpebral del ojo. Los ejemplos de heridas o lesiones que pueden afectar a estos tejidos y son susceptibles de tratamiento con los péptidos de la invención son abrasiones, ampollas, quemaduras, laceraciones, punciones, úlceras, moretones, erupciones cutáneas y cicatrices. El trauma posquirúrgico también se
10 puede tratar con los péptidos.

Otra forma de daño epidérmico es sutil y es resultado durante un largo período de tiempo, eventualmente comprometiendo la función de la piel, llamada piel envejecida. Hay dos procesos principales que inducen envejecimiento de la piel; intrínseco (envejecimiento cronológico) en la piel protegida por el sol y extrínseco (foto-
15 envejecimiento) en áreas expuestas al sol. El envejecimiento intrínseco refleja el origen genético y depende del tiempo. Sin embargo, el envejecimiento de la piel participa con uno o más de los siguientes: arrugas, líneas finas, hiperpigmentación, eritema, pérdida de luminosidad, suavidad, firmeza, claridad y uniformidad del tono de la piel y alteraciones en la apariencia de los poros. Bajo estos signos visibles se encuentran diversos cambios histológicos y citológicos inducidos por la exposición aguda o crónica de estímulos ambientales tales como ultravioleta (UV) y
20 contaminación además de la predisposición genética. Los problemas cosméticos tales como arrugas, sequedad, adelgazamiento, flacidez y mayor susceptibilidad a moretones son signos externos de daño epidérmico que, además del envejecimiento, también pueden ocurrir prematuramente debido a la exposición prolongada a agentes dañinos como rayos ultravioleta y contaminación. Por lo tanto, los péptidos descritos pueden usarse para los problemas asociados con el envejecimiento de la piel causados por estímulos tanto intrínsecos como extrínsecos, para prevenir
25 y reparar el daño, por lo tanto, para regenerar el tejido sano de la piel para revertir los efectos del envejecimiento. De una manera relacionada, los péptidos pueden aplicarse a un tejido que se ha dañado por exposición a diversos agentes externos tales como luz solar. La invención también se puede utilizar como un cosmético en estos aspectos para dar una apariencia y textura más jóvenes. Los péptidos cortos por sí solos inalterados, o a través de modificación química y/o administración especializada, pueden hacerse penetrar a través de la epidermis para
30 afectar procesos en contra de aquellos que causan adelgazamiento de la piel, arrugas, fragilidad y rugosidad/endurecimiento. Dado que los queratinocitos son el componente principal de las superficies epidérmicas y están disminuidos en la piel envejecida y dañada, se espera que la reposición de la misma por estimulación peptídica invierta el problema mencionado anteriormente.

35 La piel es relativamente elástica, pero hay límites a su capacidad de estiramiento. Las estrías son una forma de cicatrización en la piel con un tono de color apagado. Son causadas por el desgarramiento de la dermis, que con el tiempo puede disminuir, pero no desaparecerá por completo. Aparecen primero como líneas rojizas o moradas, pero tienden a desvanecerse gradualmente a un rango más ligero. Las estrías son a menudo el resultado del rápido estiramiento de la piel asociado a un rápido crecimiento o pérdida rápida de peso. Las estrías pueden aparecer en
40 cualquier sitio del cuerpo que no sufren estiramientos o distensión notable o excesiva. Los lugares más comunes son el abdomen, los senos, los brazos, las axilas, la espalda, los muslos, las caderas y las nalgas. Las estrías son a menudo causadas por los cambios hormonales de algunas etapas importantes de la vida como la pubertad y el embarazo, pero el tratamiento con corticosteroides, la obesidad, la cirugía estética y la reconstrucción corporal intensiva puede conducir a estrías. Bajo la acción de corticosteroides, el crecimiento tanto de queratinocitos como de
45 fibroblastos puede ser gravemente dañado y, por consiguiente, la síntesis de colágenos I y III, así como la síntesis de fibronectina también se reduce significativamente hasta más del 90 % en comparación con la piel normal (Rogalski et al., 2002). Se ha demostrado que la combinación de corticosteroides en dosis altas y la terapia antiangiogénica del factor de crecimiento endotelial puede agravar la condición de las estrías y debe evitarse (Wheeler et al., 2012). Reparar y restaurar la función de los queratinocitos en la sección dérmica/epidérmica podría
50 ser la clave para la corrección de las estrías. Los péptidos de la presente invención que promueven el cierre de heridas por raspado y estimulan la angiogénesis esencial para la cicatrización de heridas son, por lo tanto, ideales para el tratamiento de estrías.

Los queratinocitos producen y secretan péptidos antimicrobianos (AMP) que funcionan como antibióticos endógenos
55 y como moléculas de señalización dentro del sistema inmune innato cutáneo. Los AMP son el componente clave del sistema innato de defensa inmune huésped y proporcionan la primera línea de defensa y muerte de microorganismos patógenos. Además, también modulan y modifican las respuestas inflamatorias huésped mediante una diversidad de mecanismos. Sin embargo, la expresión anormal de estos péptidos se ha asociado a la patogénesis de enfermedades inflamatorias de la piel. Los estudios recientes implican que LL-37 puede desempeñar
60 un papel importante en la patogénesis de la psoriasis y la rosácea.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que afecta aproximadamente al 2 % de la población general (Lowe et al., 2007). La psoriasis se caracteriza por la acumulación de linfocitos T de tipo Th1 y neutrófilos, hiperproliferación y diferenciación de queratinocitos, y una mayor producción epidérmica de AMP. En las lesiones psoriásicas, muchos AMP están altamente expresados, tales como catelicidina (LL-37), β -defensinas, proteínas S100, quimiocinas, RNasa 7, lisozima, elafina, lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos, etc. En particular, la catelicidina LL-37 se sobreexpresa en la piel inflamada de la psoriasis, se une al auto-ADN extracelular liberado de las células moribundas y convierte el auto-ADN en un estímulo potente para las células dendríticas plasmocitoides (Dombrowski et al., 2012). Aunque existen controversia acerca del papel de LL-37 en la psoriasis, es evidente que este péptido induce la proliferación de queratinocitos y la producción de citocinas proinflamatorias en queratinocitos cultivados. Además de la psoriasis, LL-37 se ha visto recientemente implicado en el desarrollo de lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide (AR). LL-37 está altamente expresado en la piel de pacientes con lupus eritematoso sistémico (Sun et al., 2011). En la AR, los granulocitos neutrófilos alimentan la inflamación y dañan el tejido de la articulación liberando agentes citotóxicos, AMP, proteasas y otros mediadores inflamatorios. Se demostró en modelo animal que LL-37 está fuertemente aumentado en membranas sinoviales de RA y en articulaciones de ratas con artritis en comparación con articulaciones sanas (Hoffmann et al., 2012). La observación de que HB2233 disminuye significativamente la expresión de LL-37, así como varios factores diferentes altamente asociados con la inflamación sugiere que los péptidos de la invención podrían ser agentes terapéuticos potenciales para afecciones inflamatorias incluyendo, pero no limitándose a, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

La rosácea es una de las dermatosis más comunes de los adultos. Los conceptos actuales sugieren que los factores desencadenantes clínicos conocidos tales como la radiación UV, el calor, el frío, el estrés, los alimentos picantes y los microbios modulan la señalización del receptor tipo Toll, inducen especies reactivas de oxígeno, así como potencian la producción de AMP y neuropéptidos (Kenshi et al. 2009, Yamasaki et al., 2009). El exceso de catelicidina en forma de LL-37 se notificó en la rosácea que parece ser resultado de la función anormal del reconocimiento del patrón inmune innato por TLR, y las proteasas que procesan hCAP18 (Yamasaki et al., 2007; 2011). Al igual que la psoriasis y el lupus eritematoso sistémico, se ha especulado que el exceso de LL-37 en la rosácea permite el reconocimiento de los ácidos auto-nucleicos tanto por las células dendríticas plasmocitoides como por los queratinocitos, lo que puede exacerbar la inflamación contribuyendo así a la enfermedad permitiendo la señalización autoinflamatoria (Gilliet et al., 2008; Ganguly et al., 2009). La reducción de LL-37 en tejidos de piel SOR-300-FT por los péptidos de la invención sostiene un tratamiento prometedor y potencialmente útil para mejorar la afección inflamatoria asociada a LL-37 en la rosácea.

Además de las condiciones inflamatorias de la piel, los niveles más altos de LL-37 también se asocian a varios tipos de tumor sólido agresivo. Se demostró que el LL-37 se sobreexpresa progresivamente en los tumores de próstata humanos a medida que aumenta la puntuación de Gleason y en la metástasis ósea (Jonathan et al., 2011). Se observó una observación clínica similar en carcinomas de cáncer de ovario (Coffelt et al., 2008), cáncer de mama (Heilborn et al., 2005) y cáncer de pulmón (von Haussen et al., 2008). Aunque LL-37 normalmente se escinde de su precursor, la proteína antimicrobiana de la catelicidina humana 18 (hCAP-18), por la proteasa 3 de neutrófilos para activarse, evidencia que las células cancerosas también producen una enzima para escindir proteolíticamente su hCAP-18 secretada independientemente de los neutrófilos (Sørensen et al., 2001). Esto puede explicar los niveles elevados de LL-37 en los cánceres. Aunque la participación de LL-37 en los cánceres aún no se ha aclarado, la propiedad de LL-37 para aumentar la proliferación, la angiogénesis, la protección de la apoptosis y la transición epitelio-mesenquimal, podrían servir como características del cáncer y pueden utilizarse por células transformadas/neoplásicas para promover el crecimiento tumoral y la metástasis. La reducción de LL-37 por el péptido de la invención tal como HB2233, puede proporcionar una manera eficaz de reducir el nivel de LL-37 evitando así la propagación de células cancerosas. El beneficio potencial puede mejorarse adicionalmente en combinación con fármacos contra el cáncer.

La infección con bacterias puede causar sepsis y conducir a choque séptico, caracterizado por hipotensión refractaria y, finalmente, fallo multiorgánico y muerte (Ulevitvh et al., 1995). La sepsis gram-positiva se ha reconocido como una afección clínica importante (Ulevitvh et al., 1995). Sus agentes causales son componentes de la pared celular de bacterias Gram-positivas, como peptidoglicano (PGN) y ácido lipoteicoico (LTA). Además del choque séptico, el LTA también es un agente causante de otras afecciones inflamatorias. La dermatitis atópica (AD) es una enfermedad inflamatoria crónica común de la piel. La patogénesis de AD no se entiende completamente y el nivel de expresión de la catelicidina (LL-37) y su asociación con la gravedad de la enfermedad del eccema ha sido controvertida. Los pacientes con AD son particularmente susceptibles a infecciones estafilocócicas de la piel, que se asocian con el empeoramiento de sus afecciones de la piel. Aunque los mecanismos por los cuales las bacterias estafilocócicas pueden empeorar la AD aún no están claros, la producción de citocinas después de la infección directa o la interacción con componentes bacterianos o restos de queratinocitos o células inmunes parece

desempeñar un papel importante (Bieber et al., 2008). Las infecciones por *S. aureus* se conocen como desencadenantes de la inflamación de la piel y pueden modular las respuestas inmunitarias debidas a la invasión directa por las bacterias o por productos bacterianos. Los estudios indican altos niveles de LTA de *S. aureus* en las lesiones cutáneas de AD (Travers et al., 2010). El fluido de lavado derivado de lesiones de AD se encuentra que induce la producción de IL-1 β , IL-6, IL-10, y el factor de necrosis tumoral α por DC derivado de médula ósea murina (Travers JB et al., 2010). Los péptidos de la presente invención muestran altos niveles de unión a LTA estafilocócico in vitro y tal actividad puede proporcionar un tratamiento prometedor para neutralizar el efecto tóxico de LTA o LPS de bacterias Gram-negativas liberadas durante la infección o tratamiento antibiótico para mejorar las afecciones asociadas a choque séptico y piel con AD.

10

El potencial de los péptidos de la invención para modular la expresión de CTGF- β (factor de crecimiento transformante beta) en los queratinocitos es particularmente interesante. CTGF- β es una citocina pleiotrópico/factor de crecimiento que regula la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la remodelación de la matriz, la adhesión, la invasión y la migración. Generalmente, TGF- β 1 puede producirse por muchos tipos de células diferentes. Se ha descubierto que todas las isoformas de CTGF- β estimulan la síntesis y la renovación de las proteínas de la matriz extracelular por los fibroblastos.

15

El folículo piloso es un componente integral de la piel, y cada cabello es un producto queratinizado del folículo. Cada folículo piloso sufre un ciclo de actividad: el cabello crece a una longitud máxima, después el crecimiento cesa y el cabello es derramado y reemplazado. Las fases del ciclo de crecimiento del cabello se han descrito como anágena, un largo período de crecimiento; catágena, el período de transición desde el crecimiento hasta el descanso de 2 a 4 semanas; telógena, un periodo de inactividad de 2-4 meses. Aunque la evidencia directa en seres humanos es insuficiente, los estudios en ratones sugieren que la inhibición de la proliferación de queratinocitos y la inducción de la producción de TGF- β 1 están directamente relacionadas con la regresión catágena (Foitzik et al., 2000). La observación in vitro de que los folículos capilares aislados, cultivados en órganos y anágenos humanos que se inhiben por el crecimiento por el TGF- β 1 se asemeja a las primeras etapas de una transformación tipo catágena en varios aspectos. La actividad de SEQ ID NO 1, HB2233, para inhibir el crecimiento de queratinocitos y la modulación de la expresión de TGF- β 1 puede sugerir que los péptidos de la invención tienen potencial como terapéuticamente útiles para la depilación del vello no deseado. Además, el aumento de CTGF- β también se ha relacionado con la inmadurez de los melanocitos por la reducción de MITF, así como genes melanogénicos que dan como resultado el pelo gris (Nishimura et al., 2010). Por lo tanto, los péptidos de la invención también tienen un gran potencial para aplicaciones tales como despigmentación de manchas oscuras o aclaramiento de la piel.

20

25

30

El papiloma cutáneo (ST), fibromas blandos, pólipos fibroepiteliales o acrocordones son términos alternativos para describir una afección cutánea benigna común, que consiste en un poco de piel que sobresale de la piel circundante. Histológicamente, el ST es una lesión polipoide con epidermis ligeramente acantótica superpuesta, un núcleo fibrovascular edematoso suelto que presenta inflamación crónica leve y una dermis nerviosa. Los papilomas cutáneos se consideran las lesiones fibrosas más comunes de la piel. Aunque se desconoce completamente la etiología exacta, se ha notificado una relación con la obesidad, la diabetes mellitus, la fricción, la acromegalia, el trasplante de órganos, el virus del papiloma humano y otras afecciones (Zaher et al., 2007). Los factores de crecimiento y las hormonas, así como sus receptores, se han visto implicados para desempeñar un papel significativo en la formación de etiquetas de piel (Safoury et al., 2010ab). El hecho de que los papilomas cutáneos sean causados por factores que estimulan la proliferación de queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos, compuestos tales como los péptidos de la invención, que suprimen la proliferación celular pueden ser potencialmente útiles para retardar la progresión e impedir la formación de papilomas cutáneos.

35

40

45

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

EJEMPLOS

50

Ejemplo 1: Identificación de péptidos que estimulan la migración celular y el cierre de heridas por raspado

Los queratinocitos de piel humana (ATCC CRL-2404) se hicieron crecer en medio de crecimiento de queratinocitos libre de suero complementado con 5 ng/ml de factor de crecimiento epitelial recombinante humano (EGF) (Life Technologies, Grand Island, N.Y.). Las células se sembraron en placas de 12 pocillos y se dejaron alcanzar el 100 % de confluencia. La monocapa celular se privó de alimento durante 24 h, entonces se hizo una herida por raspado usando una punta de pipeta P200 (200 μ l). Las heridas por raspado se lavan y se fotografían en el momento 0. Se añadió péptido a una concentración final de 20 μ g/ml. Las células se mantienen en una incubadora a 37 $^{\circ}$ C, incubadora de CO₂ al 5 % con >90 % de humedad, excepto cuando se capturan imágenes durante un corto período a temperatura ambiente. El cierre de la herida por raspado se sigue después de 7-8 h de tratamiento y los resultados

60

se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Estimulación de la migración celular según se evalúa usando el cierre de heridas por raspado de queratinocitos. Después de 7 h de tratamiento, el porcentaje de área cerrada tratada con PBS se tomó como del 100 %, el cierre de herida tratado con péptido se calculó y se presentó como relativo al tratado con PBS.

SEQ ID NO	HB NO#	Secuencia (N-C)	Porcentaje del cierre de herida por raspado después de 7 h en comparación con el tiempo 0 (%)	Cierre de herida con respecto a PBS (%)	Citotoxicidad (µg/ml)
-	-	PBS	22,22	100	-
1	HB2233	IEKM	51,56	232*	>500
2	HB2267	VEKF	31,00	139	>500
3	HB2270	IEKI	45,67	206*	>500
4	HB2271	IQKI	50,59	228*	>500
5	HB2272	IKKW	51,22	230*	>500
6	HB2273	IKKV	36,67	165*	>500
7	HB2274	IKKL	38,29	172*	>500
8	HB2268	KMG	23,67	106	>500

*: significativo

Ejemplo 2: Citotoxicidad en queratinocitos de piel humana normal

10 Para asegurar que los péptidos no son citotóxicos para las células, se sembraron queratinocitos epidérmicos humanos normales a una placa de 96 pocillos. La placa se incubó a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % para permitir que las células crecieran hasta un >95 % de confluencia. Los péptidos se diluyen en soluciones madre a concentraciones de 50, 100, 200 y 500 µg/ml. Los medios de cultivo celular se reemplazan por medio fresco que contiene péptidos a diversas concentraciones y después se incuban a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 h. Al final del
 15 tratamiento, la viabilidad celular se midió usando el kit de ensayo MTT adquirido de ATCC (Manassas VA). Los resultados se muestran en la Tabla 1. A las concentraciones de 50 a 500 µg/ml, los péptidos no cambian la viabilidad celular según se mide usando el ensayo MTT.

Ejemplo 3: Identificación de péptidos que estimulan la angiogénesis

20 El ensayo de angiogénesis se realizó usando el kit de ensayo de angiogénesis in vitro adquirido en Millipore. En resumen, la capa de matriz se preparó con solución ECMATRIX® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (ATCC, Manassas, VA) en medio F12K completo (ATCC, Manassas, VA) complementado con 0,1 mg/ml de heparina (Sigma-Aldrich), 30 µg/ml de ECGS -
 25 Aldrich) y suero fetal bovino al 10 % (ATCC, Manassas, VA). Las células se recogieron y se suspendieron de nuevo en medios completos. El péptido se mezcló con células a aproximadamente 5 x 10³-1 x 10⁴ células por pocillo en una placa de 96 pocillos antes de sembrar células sobre la superficie de la solución polimerizada ECMATRIX™. La placa se incubó a 30 °C, de CO₂ al 5 % durante hasta 9-12 h. La formación del tubo se inspeccionó periódicamente bajo un microscopio de luz invertida y se tomaron imágenes a intervalos de 3 y 5 h y se asignó un valor numérico a
 30 cada patrón como se muestra a continuación.

Patrón	Valor
Células individuales, bien separadas	0
Las células comienzan a migrar y alinearse	1
Tubos capilares visibles, sin brotes	2
Brotos de nuevos tubos capilares visibles	3
Comienzo de la formación de los polígonos cerrados	4
Desarrollo de estructuras de tipo mallas complejas	5

Como se muestra en la Tabla 2. Las SEQ ID NOs 1-7 estimulan significativamente la formación de tubos capilares en células endoteliales de venas umbilicales humanas. Como se espera, LL-37 se utiliza como control positivo y
 35 también para estimular la angiogénesis. El PBS se usa como control negativo y las células comienzan a migrar y se alinean, pero no hay brotes ni se forman polígonos cerrados en 5 h.

Tabla 2. Resultados de la inducción de la formación de nuevos tubos capilares. Los valores ≥ 3 se consideran como inducción significativa de la angiogénesis

SEQ ID NO	HB NO	Secuencia	Promover la formación de tubos	
			3 h	5 h
-	-	PBS	1	2
1	HB2233	IEKM	3*	4*
2	HB2267	VEKF	3*	4*
3	HB2270	IEKI	3*	4*
4	HB2271	IQKI	3*	4*
5	HB2272	IKKW	3*	4*
6	HB2273	IKKV	3*	4*
7	HB2274	IKKL	3*	4*
8	HB2268	KMG	1	2
9	LL-37		3*	4*

*: significativo

5 Ejemplo 4: Identificación de péptidos para bloquear la expresión de IL-6 inducida por LTA

Estimulación de IL-6 inducida por LTA de *S. aureus* en queratinocitos epidérmicos humanos. Los queratinocitos humanos se cultivaron hasta una confluencia $>80\%$ en medios de cultivo de queratinocitos libres de suero. Se preincubaron LTA de *S. aureus* $10\ \mu\text{g/ml}$ con cada péptido ($50\ \mu\text{g/ml}$) a temperatura ambiente durante 30 minutos, después la mezcla se transfirió al cultivo de queratinocitos. Se permitió el tratamiento durante 24 h. Se eliminó el sobrenadante. Después de un breve centrifugado para eliminar posibles desechos celulares, el sobrenadante se sometió a ensayo de IL-6 usando un kit ELISA adquirido en CellSciences (Canton, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se muestra en la Tabla 3, las SEQ ID NOs 1-7 neutralizan o antagonizan claramente el efecto de LTA para estimular la expresión de IL-6 en queratinocitos de piel humana.

15 Tabla 3. Bloqueo de la expresión de IL-6 inducida por LTA en queratinocitos de piel humana

SEQ ID NO	HB NO#	Secuencia	Expresión de IL-6 (arbitraria)	Expresión porcentual (%) con respecto a IL-6 inducido por LTA	Reducción porcentual (%) de IL-6 en comparación con tratado con LTA
-	-	LTA en solitario	1,248	100	0
-	-	PBS (inicial)	0,618	-	-
1	HB2233	IEKM+LTA	0,558	44,71*	55,29*
2	HB2267	VEKF+LTA	0,68	54,49*	45,51*
3	HB2270	IEKI+LTA	0,776	62,18*	37,82*
4	HB2271	IQKI+LTA	0,575	46,07*	53,93*
5	HB2272	IKKW+LTA	0,527	42,22*	57,78*
6	HB2273	IKKV+LTA	0,394	31,57*	68,43*
7	HB2274	IKKL+LTA	0,321	25,72*	74,28*
8	HB2268	KMG+LTA	1,023	81,97	18,03

*: significativo

Ejemplo 5: Identificación de péptidos para modular la proliferación celular y la expresión de TGF- β en queratinocitos de piel humana.

20

Los queratinocitos de piel humana normal (ATCC CRL-2404) se hicieron crecer en medio de crecimiento de queratinocitos libre de suero complementado con $5\ \text{ng/ml}$ de factor de crecimiento epitelial recombinante humano (EGF) (Life Technologies, Grand Island, N.Y.). Las células se examinan microscópicamente a diario. A medida que el cultivo se vuelve confluyente al $50\text{-}75\%$, se aspira el medio en la placa y se añade tripsina al $0,25\%$ /EDTA.

25

Cuando las células se redondean y se desprenden, la tripsina se neutraliza por adición de medio de cultivo fresco. Las células son centrifugan entonces y el sedimento se suspende de nuevo en medio de cultivo fresco. Se utiliza un hemacitómetro para contar la suspensión celular y el número total de células se ajusta a aproximadamente $500\text{-}1000$ células por pocillo añadiendo $100\ \mu\text{l}$ de suspensión celular a cada pocillo. Típicamente, se usan los 60 pocillos centrales y los pocillos exteriores se rellenan con medio fresco para minimizar la evaporación. Cuando las células se

unen en cada pocillo después de 6-8 h de incubación, se añaden por triplicado 100 µl de medio fresco que contiene PBS o 2 x las concentraciones deseadas de péptido. La microplaca se incuba entonces a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 48-72 horas.

5 Al final de la incubación, las células se someten al ensayo de citotoxicidad celular CYTOSCAN™ SRB (GBiosciences, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se fijan antes de la tinción con sufurodamina B (SRB). Después de un lavado extensivo, el color se solubiliza usando tampón de solubilización. La absorbancia se midió a 565 nm con un lector de microplacas. Los resultados mostrados en la Tabla 5 son el valor medio del tratamiento por triplicado y los valores sobre ±10 % del control se consideran
10 significativos.

La estimulación de TGF-β se realizó por Sunny Biodiscovery Lab (Santa Paula, CA). En resumen, se cultivaron queratinocitos epidérmicos humanos neonatales normales en medio de crecimiento de queratinocitos cellnTec (Suiza). El medio no contenía TGF-β según el proveedor del medio. El día del experimento, el medio de crecimiento
15 se renovó y las células se trataron con 50 µg/ml de péptido por triplicado durante 72 h. Al final del tratamiento, el sobrenadante se eliminó, se activó y se cuantificó usando el kit LEGEND MAX™ TGF-β1 ELISA total (Biolegend, San Diego, CA).

Tabla 4. Actividad de los péptidos de la invención sobre la proliferación celular y la producción de TGF-β en
20 queratinocitos de piel humana

SEQ ID NO	HB NO	Secuencia	Proliferación porcentual (%) con respecto a PBS	Porcentaje (%) de inducción de CTGF-β con respecto a PBS
-	-	PBS	100	100
1	HB2233	IEKM	77,54*	125*
2	HB2267	VEKF	93,23	109
3	HB2270	IEKI	86,31*	114*
4	HB2271	IQKI	98,00	109
5	HB2272	IKKW	96,46	95,6
6	HB2273	IKKV	112	101
7	HB2274	IKKL	96,31	96

: efectos moderados

Ejemplo 6: Efecto del péptido representativo en la construcción de tejido de psoriasis humana SOR-300-FT.

25 Los tejidos SOR-300-FT™ se transfirieron a placas de 6 pocillos que contenían 0,9 ml de medio de ensayo precalentado y se equilibraron en condiciones de cultivo estándar (37 °C, CO₂ al 5 %) durante 1 hora. Después del equilibrio de 1 h, los tejidos se alimentaron de nuevo con medio fresco como se indica a continuación: 1) para el punto de tiempo de 24 h, los tejidos se alimentaron con 0,9 ml de medio y 2) para los puntos de tiempo >24 h, los tejidos se alimentaron con 5 ml de medio de cultivo colocando los insertos de cultivo celular sobre las arandelas
30 (Parte n.º EPI-WSHR, MatTek Corporation). A continuación, se aplicaron por vía tópica 50 µl de los artículos de ensayo a los tejidos psoriáticos (n = 3) y el artículo de ensayo se añadió al medio de cultivo a las 3 concentraciones elegidas por el Patrocinador. A las 24 y 48 horas: a) los tejidos se aclararon por vía tópica 3 veces con 300-400 µl de PBS, b) los insertos que contenían los tejidos se sujetaron firmemente con fórceps estériles y el artículo de ensayo se aclaró suavemente sumergiendo el inserto en PBS y se decantó el medio del inserto, y c) el artículo de ensayo
35 nuevo se volvió a aplicar al tejido inmediatamente después del aclarado y la decantación (50 µl por vía tópica). El análisis se realizó a t = 72 h (aplicaciones repetidas por triplicado). El cDNA se generó usando el Kit Qiagen RT2 de primera cadena (cat. n.º 330401). La expresión génica relativa se midió utilizando Qiagen RT2 SYBR Green qPCR Mastermix (cat n.º 330502) y cebadores Qiagen RT2. El análisis se realizó usando el software Bio-Rad CFX.

Tabla 5. Cambio en veces en los niveles de expresión génica después del tratamiento de HB2233 y calcipotriol en el
40 tejido SOR-300-FT

Marcadores génicos	Cambio en veces	
	HB2233	Calcipotriol
Calgranulina C	1,2	-1,3
LL-37	-3,7	5,1
GRO alfa	-1,1	1,3
ENA-78	-1,2	1,6

Elafina	1,1	-1,4
HBD-2	1,5	-9,0
IL-8	1,0	1,3
Ki-67	-1,3	-1,1
P63	1,2	-1,4
Psoriasina	1,3	-2,3
SLPI	-1,3	2,1
Transglutaminasa	1,2	1,5

Ejemplo 7: Análisis de perfil genético en sustitutos normales de piel humana.

Se analizaron los 84 genes que codificaban la matriz extracelular y las moléculas de adhesión usando matrices de PCR realizadas por Sunny Biodiscovery, Inc (Santa Paula, CA). En resumen, los sustitutos cutáneos EPIDERM™ (Cat. EPI-212) se obtuvieron en MatTek (Ashland, MA) y se manipularon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del equilibrio durante una noche, se cambió el medio y se aplicaron HB2233 (330 µg/ml) o controles de agua sobre el tejido de la piel por duplicado y se dejó el tratamiento durante 24 horas. Al final del tratamiento, los tejidos se recogieron y se conservaron en una solución de RNeasy (Qiagen, Crawfordsville, IN). El ARN se extrajo y se purificó con un kit mini RNeasy de Qiagen (Cat. n.º 95017-489, GE Healthcare, Piscataway, NJ). El ARN total purificado se evaluó a 260 nm y 280 nm con un espectrofotómetro de matriz de diodos Agilent HP-8452A. La concentración de ARN se igualó a través de las muestras y la expresión de los genes de interés se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real con el sistema de detección BioRad iCycler iQ utilizando matrices de PCR PAHS-121A, con un kit de síntesis de 1ª cadena. Mezcla maestra SYBR verde y condiciones de realización de PCR de Qiagen. El método de eficiencia $\Delta\Delta CT$ se utilizó para la cuantificación de los resultados, después de la normalización de la expresión génica a 5 genes constitutivos realizada con el software de análisis de datos de matriz de PCR RT2 Profiler. Se consideró que los genes se expresaban diferencialmente si el nivel de expresión era razonablemente alto (menos de 30 ciclos para detectar) y la modulación era de 1,5 o más en cada serie duplicada.

Tabla 6. Perfil de expresión génica seleccionado en tejido cutáneo EPIDERM™ tratado con HB2233 frente al control tratado con agua, representado como cambio en veces

Símbolo del gen	Descripción	Cambio en veces
PROTEÍNAS ESTRUCTURALES		
ACTA2	Actina- α -12	2,57
COL1A1	Colágeno α -1 de tipo 1	2,08
ITGA1	Integrina α -1	2,08
ITGA3	Integrina α -3	1,82
ITG5	Integrina α -5	2,08
ITGB5	Integrina β -5	2,95
FACTORES DE CRECIMIENTO		
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo	3,63
TGFB1	Factor de crecimiento transformante β -1	3,16
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular	3,89
HBEGF	Factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina	2,75
FGF2	FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS	1,69
WISP1	Proteína 1 de la ruta de señalización inducible por WNT1	2,95
WNT5A	Miembro 5 A de la familia del sitio de integración de MMTV de tipo Wingless	2,95
QUIMIOCINAS Y ACTIVADORES TISULARES		
CXCL1	Ligando de quimiocina (C-X-C) 1	2,08
CXCL11	Ligando de quimiocina (C-X-C) 11	9,58
MAPK3	Proteína cinasa 3 activada por mitógeno	4,17
PLAT	Activador del plasminógeno tisular	3,63
PLAUR	Receptor de urocinasa del activador de plasminógeno	2,23

REIVINDICACIONES

1. Un tetrapéptido aislado que presenta actividad de reparación y regeneración de heridas que consiste en la secuencia peptídica (I o V)-X1-K-X2, donde X1 es E, Q o K, y X2 es M, F, I, W, V o L.
5
2. El tetrapéptido de la reivindicación 1 que es SEQ ID NO:1 (IEKM), SEQ ID NO:2 (VEKF), SEQ ID NO:3 (IEKI), SEQ ID NO:4 (IQKI), SEQ ID NO:5 (IKKW), SEQ ID NO:6 (IKKV), o SEQ ID NO:7 (IKKL).
3. El tetrapéptido de la reivindicación 1, que comprende cualquiera o ambos enantiómeros de L- y D-
10 aminoácidos o está conjugado con una molécula portadora, amidada o lipídada.
4. El tetrapéptido de la reivindicación 1 que está en forma de ácido libre.
5. Una composición que comprende al menos un tetrapéptido de acuerdo con una cualquiera de las
15 reivindicaciones 1-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. La composición de la reivindicación 5, donde el tetrapéptido está presente en una concentración que
varía de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, o aproximadamente 0,1 µg/ml a
aproximadamente 20 mg/ml.
20
7. La composición de la reivindicación 5, donde la composición está en forma de aerosol, emulsión,
líquido, loción, solución, gel, microencapsulación, crema, pasta, ungüento, polvo o espuma o se incorpora en un
dispositivo adaptado para su aplicación sobre la superficie de la piel o debajo del tejido cutáneo.
- 25 8. Una composición para su uso en la cicatrización de una herida o tratamiento de una afección
inflamatoria de la piel en un mamífero cuando se aplica en una cantidad terapéuticamente eficaz durante una
cantidad eficaz de tiempo, donde dicho medicamento comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y al
menos un tetrapéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 30 9. La composición para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 8, donde la herida o
afección inflamatoria afecta a la piel o el tejido mucoso asociado de dicho mamífero.
10. La composición para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 9, donde la herida se debe
a una abrasión, ampolla, quemadura, laceración, úlcera, moretón, erupción cutánea, distensiones de estrías, cicatriz,
35 estría o los efectos del envejecimiento o la exposición ambiental, o la afección inflamatoria se debe a psoriasis,
dermatitis atópica y rosácea, o su uso para la eliminación del vello o la eliminación de papilomas cutáneos.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso en el tratamiento de
cuidado de la piel.
40
12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso en un producto cosmético.