

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 437**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2014** **PCT/US2014/012378**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014** **WO14126681**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2014** **E 14703220 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2956155**

54 Título: **Péptidos bioactivos cortos para promover la cicatrización de heridas**

30 Prioridad:

14.02.2013 US 201361764913 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.09.2017

73 Titular/es:

HELIX BIOMEDIX, INC. (100.0%)
22121 17th Avenue SE, No 112
Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

ZHANG, LIJUAN y
CARMICHAEL, ROBIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 633 437 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos bioactivos cortos para promover la cicatrización de heridas

Campo de la invención

La invención se refiere a péptidos que tienen actividad biológica, cosmética y terapéutica. Particularmente, un péptido aislado, en el que la secuencia del péptido consiste en la SEQ ID NO: 4 (EKMGRN), la SEQ ID NO: 5 (MGRN) o la SEQ ID NO: 2 (KMGRN), en el que el péptido está en forma de un ácido libre, amidado en el extremo carboxilo terminal o lipidado en el extremo amino terminal. La divulgación se refiere a péptidos cortos que tienen de cuatro a seis restos de aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 (EKMGRN) que estimula la proliferación y la migración de las células de queratinocitos. La divulgación se refiere además a un péptido que tiene una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 4 (EKMGRN), la SEQ ID NO: 5 (MGRN) o la SEQ ID NO: 2 (KMGRN) para su uso en el tratamiento de una herida del tejido cutáneo o mucoso de un mamífero. La divulgación se refiere igualmente a procedimientos de uso de estos péptidos para promover la reparación de heridas y para tratar diversas lesiones que afectan a la piel y a otras superficies corporales relacionadas, tales como la cavidad oral.

Antecedentes de la invención

La piel es el órgano más grande del cuerpo y la interfaz entre el entorno y nuestra biología interna. Se compone de dos capas primarias: la epidermis, que es la capa más externa de la piel; y la dermis, que se encuentra justo debajo de la epidermis. Los queratinocitos son las células principales, constituyendo el 95 % de la epidermis. Los queratinocitos suprabasales se diferencian en una capa córnea química y físicamente resistente rodeada por proteínas y lípidos, incluyendo ceramidas, colesterol y ácidos grasos. La eliminación natural o forzada de las capas superiores de este epitelio cornificado estimulará el recambio de las células subyacentes para reemplazar las células dañadas o perdidas. Esta capa cornificada proporciona las funciones de protección y de barrera de agua entre el cuerpo y el entorno. La función primaria de los queratinocitos es la formación de una barrera para proteger el cuerpo contra riesgos químicos, físicos y mecánicos, la invasión por microorganismos, el calor, la radiación UV y la pérdida de agua (Proksch y col., 2008). Los queratinocitos son también un constituyente fundamental de los tejidos mucosos que son continuos con la epidermis (Presland y Dale, 2000).

Una herida se define como una rotura en la integridad epitelial de la piel. La cicatrización normal implica una serie compleja y dinámica pero perfectamente orquestada de eventos que incluyen inflamación, formación de tejido nuevo y remodelado tisular. La cicatrización comienza en el momento en que el tejido se lesiona y requiere una coordinación precisa de la epitelización y la reparación dérmica, cuyo proceso de epitelización depende en última instancia de las capacidades de migración, proliferación, y diferenciación de queratinocitos (Singer y Clark, 1999). Durante la epitelización, los queratinocitos situados en el perímetro de la herida migran y proliferan para formar una capa única sobre la herida. La proliferación y diferenciación adicionales de los queratinocitos establecen una capa epidérmica que comprende las capas estratificadas normales. Asimismo, los queratinocitos con fibroblastos dérmicos normales conducen a la regulación positiva del ARNm para el colágeno de tipo I y III, al aumento de la proliferación de fibroblastos, a la acumulación de matriz extracelular y al remodelado para completar la cicatrización mediante la restauración de la estructura y la función del tejido (Bergers G y Coussens LM, 2000). De este modo, la capacidad de proliferación y migración de queratinocitos es esencial para realizar estos procesos en la superficie de la piel. Con el conocimiento de que ciertos factores de crecimiento se involucran naturalmente durante la cicatrización, el trabajo se ha dirigido hacia el desarrollo de procedimientos basados en factores de crecimiento para el tratamiento de heridas (Mustoe y col., 1994; Steed, 1995). No obstante, la mayoría de los intentos que emplean una estrategia de este tipo no han podido lograr resultados clínicamente significativos, debido, en parte, a las dificultades asociadas con el uso de proteínas terapéuticas, tales como el gran tamaño de las proteínas implicadas. El uso de terapias con factores de crecimiento también experimenta la complejidad y los elevados costos asociados con la preparación de grandes proteínas. Los péptidos de defensa del huésped (PDHs), también conocidos como péptidos antimicrobianos, se han implicado como reguladores de la cicatrización cutánea. Debido a su pequeño tamaño, estos péptidos activos cortos han suscitado el interés para el desarrollo de productos terapéuticos (Zhang y Falla, 2006).

Los PDH son ubicuos en la naturaleza y forman componentes centrales del sistema inmunitario innato de las eucariotas. Son esenciales para la defensa innata del huésped como efectores de eliminación de patógenos, así como de modulación de comportamientos de la célula huésped para promover la regeneración y la reparación de tejidos. La reparación normal de heridas implica una orquestación precisa de la inflamación, la epitelización, la granulación y el remodelado del tejido. Los péptidos de defensa del huésped han demostrado que influyen en todos estos comportamientos. La catelicidina PR-39 posee una función antiinflamatoria al inhibir la actividad de oxidasa de neutrófilos, e induce sindecanos, proteoglicanos de sulfato de heparina importantes en la reparación de heridas (Gallo y col., 1994; Shi J., Ross, CR y col., 1996). Se demostró también que otro miembro de los péptidos de defensa del huésped de la familia de catelicidina, LL-37, influye en la reepitelización de heridas de la piel humana en un cultivo de órganos (Heilborn JD, y col., 2003). La defensina de neutrófilos humana promueve la expresión del colágeno de tipo I, mientras se inhibe la expresión de la colagenasa intersticial (Oono T., y col., 2002). Además, la catelicidina LL-37 humana y la β -defensina-3 humana, que son extremadamente diversas, promueven actividades que incluyen la estimulación de la migración de células epiteliales, la promoción de la angiogénesis y la supresión de

las respuestas pro-inflamatorias (Steinstraesser y col., 2008, 2009). Atraen neutrófilos, monocitos, mastocitos, y linfocitos T, y también inducen la producción de quimioatrayentes de neutrófilos y monocitos en muchos tipos de células. Recientemente, los PDH también se han implicado como reguladores de la reparación de heridas cutáneas mediante la modulación de la inflamación, la angiogénesis, la deposición y el remodelado de tejido extracelular. Se ha demostrado que la influencia de los PDH en la reparación de heridas no depende de la función antimicrobiana y proporciona una innovadora aplicación clínica potencial para los PDH. Se ha notificado previamente que un péptido de defensa del huésped no antimicrobiano HB107 (MPKEKVFLKIEKMGRNIRN) derivado de cecropina B conservaba la capacidad para ayudar en la reparación de heridas en un modelo murino y el beneficio observado con HB107 fue indistinguible de la herida tratada con un factor de crecimiento rhPDGF (Lee, y col., 2004). El documento WO 2008/085484 desvela fragmentos peptídicos HB107 y su uso en el tratamiento de una herida de la piel. El análisis histológico de las heridas tratadas con HB107 sugiere que la hiperplasia epidérmica aumentó en las heridas tratadas con HB107, una indicación de que HB107 puede influir en la proliferación o migración de queratinocitos (Lee PH., y col., 2004). Un nuevo grupo de variantes sintéticas de PDHs, denominado reguladores de defensa innatos (RDI), que proporcionan una protección de amplio espectro contra las infecciones sistémicas por bacterias resistentes a múltiples fármacos, se ha descrito recientemente (Easton DM., y col., 2009). Por ejemplo, IDR-1 e IDR 1002 confieren protección contra las exposiciones microbianas mediante la mejora de las defensas inmunitarias innatas del huésped mientras que suprime las respuestas inflamatorias excesivas potencialmente dañinas (Easton y col., 2009; Nijnik A., y col., 2010).

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a péptidos bioactivos cortos que son útiles para promover la cicatrización en mamíferos. Las heridas preferentemente orientadas selectivamente por péptidos aislados son las que afectan a la piel y a las superficies mucosas asociadas. Aunque no se limitan a un mecanismo particular alguno, los péptidos de la invención son capaces de afectar a la cicatrización mediante la estimulación de la proliferación y migración celular. Los péptidos de la invención son útiles tanto de modo *in vitro* como *in vivo*, y son capaces de inducir las actividades anteriormente mencionadas en los queratinocitos.

En la presente invención se proporciona un péptido aislado, en el que la secuencia del péptido consiste en la SEQ ID NO: 4 (EKMG), la SEQ ID NO: 5 (MGRN) o la SEQ ID NO: 2 (KMGRN), en el que el péptido está en forma de un ácido libre, amidado en el extremo carboxilo terminal o lipidado en el extremo amino terminal. La divulgación se refiere a un péptido que tiene una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 4 (EKMG), la SEQ ID NO: 5 (MGRN) o la SEQ ID NO: 2 (KMGRN) para su uso en el tratamiento de una herida de un tejido cutáneo o mucoso de un mamífero. La presente divulgación se refiere a péptidos aislados que contienen cuatro a seis restos de aminoácidos contiguos situados entre las posiciones 11 y 16 de HB107 (MPKEKVFLKIEKMGRNIRN), a saber, EKMGRN (SEQ ID NO: 1). Los péptidos aislados de la presente invención pueden contener formas enantioméricas L o D de aminoácidos, o una combinación de las mismas. De acuerdo con otro aspecto de la invención, los péptidos aislados pueden conjugarse con una proteína portadora, o modificarse por medio de la amidación C-terminal o acetilación N-terminal con ácidos grasos (es decir, lipidación). Estas adiciones potencian la bioactividad de los péptidos cuando se aplican a la piel y a las heridas de las mismas.

De acuerdo con ciertos aspectos de la presente invención, todos los péptidos aislados contienen una metionina. Los ejemplos de péptidos aislados de la presente divulgación comprenden la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5, factores que muestran actividades estimuladoras hacia la proliferación y la migración celular y afectan a la reparación de heridas.

SEQ ID NO.	N.º HB	Secuencia
1	HB2265	EKMGRN
2	HB2262	KMGRN
3	HB2263	EKMGR
4	HB2234	EKMG
5	HB2235	MGRN

La presente divulgación se refiere a la fabricación de un medicamento para composiciones terapéuticas o cosméticas que contienen un portador farmacéuticamente o cosméticamente aceptable y uno o más de los péptidos anteriormente mencionados. Las composiciones anteriormente mencionadas son útiles para la aplicación de medicamentos o cosmética para la cicatrización de heridas cutáneas de mamíferos. El péptido en tales composiciones oscila preferentemente en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 500 µg/ml, o entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 20 mg/ml. Las formas preferentes de la composición son aerosoles, emulsiones, líquidos, soluciones, lociones, cremas, pastas, pomadas, polvos, geles y espumas.

Adicionalmente, los péptidos de la presente invención, y las composiciones que los contienen, pueden proporcionar

características útiles para su inclusión en general en el cuidado de la piel y formulaciones cosméticas, tales como diversos cosméticos para la piel, cremas para la piel, lociones, protectores solares y lociones o cremas terapéuticas, tales como formulaciones anti-acné para el cuidado después de un procedimiento por láser.

La presente divulgación también se dirige a procedimientos de uso de las composiciones anteriormente mencionadas para la cicatrización en mamíferos. Normalmente, el procedimiento del tratamiento conlleva la administración de una cantidad eficaz de las composiciones que contienen péptidos a las heridas, especialmente las de los tejidos de la piel (epidermis) y tejidos mucosos asociados, durante un espacio de tiempo eficaz. Dichas heridas incluyen heridas quirúrgicas, abrasiones, ampollas, quemaduras, laceraciones, úlceras, contusiones, erupciones cutáneas, cicatrices, estrías y daños en la piel debido a los efectos intrínsecos y extrínsecos del envejecimiento y la exposición ambiental, incluyendo la formación de arrugas, flacidez de la piel y fotolesiones.

Descripción detallada de la invención

Las patentes de Estados Unidos n.º 5.962.410, 5.861.478, y 7.696.174 proporcionan divulgaciones útiles para comprender la presente invención. El péptido HB107 (MPKEKVFLKIEKMGRNIRN) (SEQ ID NO: 10) constituye en sí mismo un fragmento de cecropina B, que es una proteína antimicrobiana presente en una especie de polilla. Aunque HB-107 no muestra los efectos bacteriostáticos de la proteína de la cual se deriva, muestra cualidades de cicatrización epidérmica (Lee y col., 2004). Este péptido formado por un resto de 19 aminoácidos es un inmunomodulador multifuncional que estimula la proliferación, la migración de queratinocitos, el cierre de heridas por rascado y las actividades anti-inflamatorias que son esenciales para la cicatrización.

Basándose en este razonamiento nos centramos en un tramo de seis aminoácidos representado por la SEQ ID NO: 1 (HB2265), EKMGRN, de HB107 desde la posición de 11-16 en el estudio actual. Ilustración esquemática de péptidos que comprenden de 4 a 6 restos de aminoácidos contiguos situados en HB107

SEQ ID NO.	N.º HB	Secuencia
10.	HB107	MPKEKVFLKIEKMGRNIRN
1.	HB2265	EKMGRN
2.	HB2262	KMGRN
3.	HB2263	EKMGR
4.	HB2234	EKMG
5.	HB2235	MGRN
6.	HB2268	KMG
7.	HB2269	GRN
8.	HB2232	KIEK
9.	HB1062	GRNIRN

Se generaron además péptidos que comprenden de 3 a 5 restos de aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1, representados por las SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Para evaluar si los péptidos recientemente derivados poseen una actividad de cicatrización, los péptidos de las SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se sometieron a un ensayo de heridas por rascado en queratinocitos, una prueba bien aceptada para evaluar la capacidad del compuesto activo para promover el cierre de heridas. En la Tabla 1 se muestra que los péptidos de las SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, y 5 inducen significativamente el cierre de heridas por rascado en una concentración comprendida entre 10 y 20 µg/ml. El porcentaje de cierre de heridas inducido por SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, y 5 osciló desde un 182-218 % en comparación con el tratado con TFS que se tomó como el 100 %. No obstante, los tripéptidos representados por la SEQ ID NO: 6 (HB2268) y la SEQ ID NO: 7 (HB2269), y el tetrapéptido HB2232, no pudieron inducir el cierre de heridas por rascado (Tabla 1). Se mostró que otro péptido de SEQ ID NO: 9 (HB1062) que carece del resto de aminoácidos metionina (GRNIRN) también era incapaz de promover el cierre de heridas por rascado en el mismo en el ensayo de cierre de heridas por rascado en queratinocitos *in vitro* (Tabla 1). Por lo tanto, existen dos elementos esenciales requeridos para la actividad de cicatrización observada. En primer lugar, debe de haber un mínimo de cuatro restos de aminoácidos contiguos; y en segundo lugar, se ha de contener un resto de metionina en las secuencias designadas. El hecho de que tanto HB2232 (KIEK) como HB1062 (GRNIRN) sean inactivos para promover el cierre de heridas por rascado sugiere que el resto de metionina es un aminoácido insustituible que ha de estar presente como uno de los aminoácidos en los cuatro o más restos contiguos para promover la actividad de cicatrización. De esta manera, se puede concluir que de cuatro a seis restos de aminoácidos contiguos, que han de contener un resto de metionina, situados en la región central de HB107 desde las posiciones 11 a 16 en EKMGRN,

promueven la reparación de heridas. Para confirmar que la actividad no se debió a la toxicidad de los péptidos hacia los queratinocitos, todos los péptidos se sometieron al ensayo de citotoxicidad por MTT. Ninguno de los péptidos sometidos a ensayo eran citotóxicos para los queratinocitos de la piel normal *in vitro* en concentraciones de hasta 500 µg/ml (Tabla 1).

- 5 La actividad observada en el cierre de heridas por rascado *in vitro* está estrechamente correlacionada con la actividad de proliferación de los péptidos como se muestra en el ensayo de proliferación de queratinocitos *in vitro* (Tabla 2). La actividad proliferativa es más profunda a concentraciones más bajas. La concentración óptima requerida para estimular la actividad proliferativa de queratinocitos para cada péptido varía pero generalmente oscila en un intervalo de 0,625 a 5 µg/ml (Tabla 2). La SEQ ID NO 1 (HB2265) muestra la actividad en 2,5 y 5 µg/ml y la
- 10 SEQ ID NO 2 (HB2262) estimula la proliferación de queratinocitos en todas las concentraciones sometidas a ensayo de 0,625 a 5 µg/ml. La SEQ ID 3 (HB2263), la SEQ ID 4 (HB2234), y la SEQ ID 5 (HB2235) confieren dicha actividad en concentraciones relativamente bajas de 0,625 a 2,5 µg/ml. Los tripéptidos HB2268 (KMG) y HB2269 (GRN) no parecen mostrar actividad de proliferación en todas las concentraciones sometidas a ensayo. Asimismo, el tetrapéptido HB2232 no induce la proliferación de queratinocitos (Tabla 2). En conclusión, los péptidos de la
- 15 presente invención poseen una actividad moduladora hacia la proliferación de queratinocitos de la piel y tal actividad es esencial para la reparación de heridas cutáneas.

Para entender mejor el mecanismo, se coloca un péptido representativo de SEQ ID NO: 3, HB2235, para un estudio de perfiles génicos realizado por el perfil génico de SUNNY BIODISCOVERY™ (Santa Paula, CA) utilizando sustitutos tisulares de EPIDERM™ (MatTek, Ashland MA). Los sustitutos cutáneos se equilibraron durante la noche

20 y después se realizaron heridas por punción de espesor completo con una aguja 20G antes del tratamiento con el control de péptidos o agua por duplicado durante 24 h. Un conjunto de dos tejidos normales también se utilizó como control para apreciar el cambio de perfiles génicos entre los tejidos heridos y normales. Al final del tratamiento se extrajo ARN y se sometió a un análisis de matriz de PCR. La primera comparación se efectuó entre tejidos heridos no tratados frente a tejidos no heridos no tratados para apreciar el perfil de expresión de genes en respuesta a una

25 lesión, a continuación, se efectuó una comparación entre tejidos heridos no tratados frente a heridas tratadas con HB2235. La Tabla 3 enumera algunos genes que se ven significativamente afectados entre diferentes vías de señalización de la cascada de cicatrización. Los genes afectados representan aquellos que codifican proteínas de la matriz, tales como colágenos e integrinas, genes en la cascada proinflamatoria, tales como citoquinas y receptores de quimiocinas, genes implicados en el proceso de remodelado de tejidos, tales como metaloproteinasas de matriz,

30 activadores de plasminógeno e inhibidores de proteasa, y otros que están involucrados en la cicatrización. La cicatrización exitosa es un proceso bien orquestado que implica muchos tipos de células, componentes no celulares, tales como fibrina y colágeno, y un cóctel de especies químicas biológicamente activas. Aunque es una cascada continua de los procesos superpuestos, a menudo se divide en tres fases: inflamación; proliferación; y remodelado. Como se muestra en la Tabla 3, tras la herida o lesión aguda en comparación con el tejido cutáneo no herido normal, existe una regulación positiva significativa de genes que se asocian habitualmente con citoquinas proinflamatorias y receptores de quimiocinas. Por ejemplo, los ligandos de quimiocinas C-X-C 2 y 5 aumentaron 4,29 y 2,93 veces, respectivamente (Tabla 3). El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos 2 y el

35 transductor de las señales de interleucina-6 también aumentaron 1,87 y 1,93 veces, respectivamente. Durante la fase inflamatoria, la agregación de plaquetas en el sitio de la lesión es seguida por la infiltración de leucocitos, tales como neutrófilos y macrófagos en el sitio de la herida durante el cual se forma un coágulo rico en fibrina para evitar una mayor pérdida de sangre y actúa como un almacén para la migración celular temprana en la herida. Las señales inflamatorias observadas 24 horas después de la lesión (tejidos heridos frente a normales) son consistentes y esenciales para atraer neutrófilos y macrófagos al sitio de la lesión en el estado fisiológico. El coágulo rico en fibrina se descompone finalmente en una etapa posterior por proteínas, tales como plasminas. La producción de plasminas

45 se rige por la presencia de un activador del plasminógeno tisular, una proteína que convierte el plasminógeno en plasmina en estrecha relación con la función de las metaloproteinasas de la matriz (MPMs). Esto se aprecia claramente en la Tabla 3 en la que existe una regulación positiva de genes que codifican los activadores del plasminógeno tanto tisular como de tipo uroquinasa (PLAT y PLAU), así como MPMs (MMP-1) tras 24 horas de la lesión. En el proceso de cicatrización normal, la etapa de remodelado se produce en una escala temporal más larga, pudiendo llevar a menudo semanas para completarla, en la que se implica una fase de rápida proliferación de queratinocitos y fibroblastos que sintetizan y remodelan colágenos. En un examen minucioso de los tejidos heridos

50 tratados con HB2235, se observó que hay varias etapas cruciales en la cascada de cicatrización que están siendo influenciadas o moduladas por HB2235. En primer lugar, el péptido acorta claramente la duración de la fase inflamatoria inicial como se indica porque los genes que codifican las citoquinas proinflamatorias y los receptores de quimiocinas se regularon de forma significativamente negativa después del tratamiento de 24 horas con HB2235 (Tabla 3). En consonancia con la regulación negativa de las señales inflamatorias, la citoquina anti-inflamatoria, IL-10, se regula positivamente (Tabla 3). Esto es significativo ya que numerosos estudios indican que la reducción de la longitud o duración del proceso de inflamación puede facilitar significativamente la cicatrización, ya que era evidente que la cicatrización retardada se asoció con una inflamación profunda a lo largo de todos los pasos de cicatrización

60 (Leitch y col., 2009; Wang y col., 2006). En segundo lugar, HB2235 regula de forma significativamente negativa los genes que codifican los activadores del plasminógeno y MPMs después del tratamiento de 24 horas que indica que puede acelerar el proceso de granulación de tejidos. En tercer lugar, mediante la modulación de los genes que codifican factores de crecimiento, tales como TGF-β 1, PDGF, EGF que son esenciales para las actividades de migración y proliferación celular, el péptido está claramente implicado en la aceleración del proceso de

reepitelización y remodelado de tejidos durante el cual los tejidos recientemente formados comienzan a cubrir el área de la herida para completar la reparación de tejidos. Más significativamente, los tejidos tratados con HB2235 mostraron más de una regulación positiva de 5 veces de la vitronectina (VTN) (Tabla 3). VTN es una glicoproteína abundante que se encuentra en la matriz extracelular y bien conocida por promover la adhesión, la proliferación y la migración de queratinocitos, (Upton y col., 2008). En cuarto lugar, en consonancia con la actividad de proliferación y migración celular, HB2235 estimula la regulación positiva de genes que codifican las proteínas de la matriz, tales como colágenos e integrinas que son esenciales para la reepitelización y el remodelado de tejidos (Tabla 3). El análisis de la matriz génica apoya firmemente que el péptido acelera el proceso de epitelización promoviendo la proliferación y la migración celular, así como el remodelado de la matriz y la estimulación del colágeno.

Los péptidos de la presente divulgación, incluyendo las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 y 5, exhiben las actividades que son importantes para una regulación positiva de la migración y la proliferación de queratinocitos que son esenciales para los procesos de cicatrización en los tejidos epidérmicos en los que residen los queratinocitos. Los péptidos desvelados en la presente invención son innovadores y más cortos que las secuencias desveladas previamente. Las actividades biológicas provocadas por los péptidos de la presente invención son la proliferación y la migración celular, ambas desempeñan un papel importante en la mediación de la función de cicatrización.

Debido al tamaño más pequeño, los péptidos, por ejemplo, que tienen cuatro restos de aminoácidos de la presente invención son más fáciles y por lo tanto tienen un costo significativamente eficaz de fabricación. También, en contraste con los péptidos más grandes, los péptidos desvelados son más fáciles de manipular para modificaciones químicas y presentan menos problemas de solubilidad. Su sencillo manejo permite un mayor número de opciones de administración de fármacos, tales como el vehículo a utilizar y cómo se aplica. El pequeño tamaño y la mayor solubilidad de los péptidos de la invención, permiten aumentar la fuerza de la cicatrización aumentando la absorción y la retención en el lugar de la herida; los queratinocitos locales y otras células que se exponen a concentraciones más altas de los péptidos durante un periodo mayor de tiempo.

Todos los péptidos desvelados pueden sintetizarse utilizando química en fase sólida de Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo) convencional. Cada uno de los péptidos descritos anteriormente puede comprender enantiómeros L o D de aminoácidos. El extremo carboxilo terminal de los péptidos puede ser ácido (-COOH) o puede estar amidado (p. ej., -CONH₂, -CONHR, o -CONR₂). La amidación del extremo carboxilo terminal puede hacer que los péptidos de la invención sean menos susceptibles a la degradación de las proteasas y aumenten su polaridad en comparación con las formas de ácido libre, proporcionando, por lo tanto, una potencia terapéutica elevada. Se discute que la lipidación N-terminal o acetilación puede mejorar la penetración del péptido en la piel sin alterar la función bioactiva del péptido (Samah A, 2011). Por lo tanto, los péptidos también pueden lipidarse, lo cual pueden proporcionar una penetración potenciada en la piel. Ejemplos de ácidos grasos saturados o insaturados que pueden utilizarse para proporcionar el componente lípido C₁₂₋₁₈ de los compuestos de la invención incluyen ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido oleico y ácido linoleico.

Los péptidos pueden conjugarse con moléculas portadoras solubles o insolubles para modificar sus propiedades de solubilidad según sea necesario y para aumentar las concentraciones locales de los péptidos en los tejidos diana. Ejemplos de moléculas portadoras solubles incluyen polímeros de polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona; ejemplos de polímeros insolubles incluyen, entre otros, silicatos, poliestireno y celulosa. Los péptidos pueden microencapsularse utilizando tecnología de liposomas o por medio de nanotecnología para potenciar su estabilidad y para la liberación controlada para potenciar su estabilidad durante y después de la aplicación.

La presente divulgación se dirige a procedimientos de uso de los péptidos descritos anteriormente, tales como en las formulaciones o como agentes terapéuticos. Estos procedimientos pueden implicar el uso de un péptido único, o múltiples péptidos en combinación. En ciertos casos, la composición de la invención puede disponerse en dispositivos colocados sobre, en, o bajo la piel. Tales dispositivos incluyen parches transdérmicos, implantes, e inyecciones que liberan las sustancias de manera tal que se ponen en contacto con la piel o con el folículo piloso, ya sea por mecanismos de liberación pasiva o activa. Las composiciones utilizadas para administrar los péptidos en los procedimientos descritos en la presente memoria pueden encontrarse en forma de un aerosol, emulsión, líquido, loción, solución, gel, microencapsulación, crema, pasta, pomada, polvo, espuma, u otra formulación farmacéuticamente aceptable. Además, los péptidos pueden administrarse utilizando formulaciones menos involucradas, tales como agua desionizada/destilada, TFS o soluciones salinas médicas convencionales.

La formulación puede tener opcionalmente un atractivo cosmético, y/o contener otros agentes, tales como retinoides, vitamina C u otros péptidos que puedan actuar como adyuvante para la acción terapéutica de los péptidos de la invención. Los antibióticos también se pueden añadir a la formulación para prevenir la infección, permitiendo de este modo, que se produzcan los procesos de máxima cicatrización.

La formulación puede contener inhibidores de la proteasa. Un inhibidor de la proteasa puede seleccionarse para orientarse específicamente a las proteasas que cabría esperar que degradaran el péptido bioactivo seleccionado; tal selección se determina basándose en la longitud y/o secuencia del péptido bioactivo. No obstante, los inhibidores de la proteasa no necesitan necesariamente seleccionarse de cualquier manera específica; por ejemplo, puede emplearse un cóctel inhibidor de la proteasa, que contiene dos o más inhibidores. Los siguientes tipos de inhibidores

de la proteasa se pueden incorporar: inhibidores de serina proteasa, inhibidores de cisteína proteasa, inhibidores de aspartato proteasa, inhibidores de metaloproteína, inhibidores de tior proteasa e inhibidores de treonina proteasa. El inhibidor de la proteasa utilizado puede ser un péptido o proteína o productos químicos. Los ejemplos no limitantes de tales inhibidores son las serpinas, las cuales incluyen alfa-1-antitripsina, inhibidor del complemento 1, antitrombina, alfa-1-antiquimotripsina, inhibidor del activador del plasminógeno 1, y neuroserpina, o productos químicos, incluyendo, entre otros, ácido úrsólico y ácido tranexámico que puede actuar como adyuvantes para la acción terapéutica de los péptidos de la invención.

Los péptidos de la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento de heridas de la piel. La epidermis de la piel consiste en un epitelio estratificado altamente dinámico hecho principalmente de queratinocitos. Otros tipos de células, tales como fibroblastos también pueblan la epidermis. Nuevos queratinocitos diferenciadores emergen de forma continua desde la capa basal de proliferación de la epidermis para reponer las capas superiores, diferenciando progresivamente la envoltura córnea externa y la envoltura muerta descamada. Los queratinocitos son también un constituyente principal de los tejidos mucosos que son continuos con la epidermis (Presland y Dale, 2000). Dicho tejido carece de la capa córnea impermeable de la epidermis, y forma las superficies de revestimiento interior asociadas con la boca, nariz, garganta, oído, ano y genitales. Similares a la piel, las superficies mucosas son importantes para prevenir la entrada de agentes infecciosos en diversos tejidos del cuerpo, así, la lesión en estos tipos de tejido puede comprometer la salud de un individuo. El daño en el tejido cutáneo y mucoso se produce cuando se agrieta la capa epidérmica, tal como en una laceración, quemadura o ampolla. La lesión también puede implicar aplastamiento o contusión, que implica el 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 ocasionar un daño en las superficies epidérmicas. Las úlceras, tales como aquellas que afectan a los diabéticos o las asociadas a las llagas por presión son otra forma de daño en la piel; estas heridas son a menudo bastante intratables, se inflaman, son propensas a la infección, y requieren un largo proceso de cicatrización. La persistencia de una úlcera u otro tipo de heridas crónicas se debe a un fallo de los procesos celulares implicados en la cicatrización. El fracaso en la cicatrización puede ser resultado de la incapacidad de epitelizar la lesión debida, en parte, al hecho de que los queratinocitos en el borde de la herida no migran para cerrar o cubrir la llaga (Enoc y Price, 2004). La cicatrización de las heridas cutáneas y mucosas está orquestada, en parte, por la activación de los queratinocitos basales. Tras la activación, el queratinocito situado en el perímetro de la herida prolifera y migra para formar una capa única sobre la herida en un proceso referido como epitelización. Además, la proliferación y diferenciación de los queratinocitos establecen una capa epidérmica que comprende las capas estratificadas normales (Enoch y Price, 2004). Por lo tanto, la presente invención también puede utilizarse para tratar los daños asociados con los queratinocitos en los tejidos mucosos. La expresión "tejidos mucosos asociados" se refiere a cualquier tejido organizado de una manera similar a la piel y contiene queratinocitos/células epiteliales. Ejemplos de tales tejidos son superficies orales, nasofaríngeas, aurales y urogenitales, así como la conjuntiva palpebral del ojo. Ejemplos de heridas o lesiones/lesiones que pueden afectar a estos tejidos y que son susceptibles de tratamiento con los péptidos de la invención son abrasiones, ampollas, quemaduras, laceraciones, perforaciones, úlceras, contusiones, erupciones cutáneas y cicatrices. Los traumatismos post-quirúrgicos también pueden tratarse con los péptidos.

Otra forma de daño epidérmico es sutil y se establece durante un largo periodo de tiempo, comprometiendo con el tiempo la función de la piel, llamado así envejecimiento de la piel. El envejecimiento de la piel se ve afectado por un programa genético, así como por las agresiones ambientales y endógenas acumulativas que tienen lugar durante la esperanza de vida del individuo. Existen dos procesos principales que inducen el envejecimiento de la piel; intrínseco (envejecimiento cronológico) de la piel protegida del sol y extrínseco (fotoenvejecimiento) de áreas expuestas al sol. El envejecimiento intrínseco refleja los antecedentes genéticos y depende del tiempo. Independientemente, el envejecimiento de la piel comparte uno o más de los siguientes: arrugas, líneas finas, hiperpigmentación, pérdida de luminosidad, tersura, firmeza, claridad del tono de la piel y uniformidad, y alteraciones en la apariencia de los poros. Detrás de estos signos visibles se encuentran diversos cambios histológicos y citológicos inducidos por la exposición aguda o crónica de los estímulos ambientales, tales como radiación ultravioleta (UV) y contaminación, además de la predisposición genética. Los problemas estéticos, tales como arrugas, sequedad, adelgazamiento, flacidez, mayor susceptibilidad a las contusiones y quemaduras solares son signos externos habituales de daño epidérmico que, además de envejecimiento, también pueden producirse antes de tiempo debido a la exposición prolongada a los agentes perjudiciales, tales como rayos ultravioleta y contaminación. La investigación sugiere que la modificación morfológica más destacada de envejecimiento de la piel es la pérdida progresiva de tejido cutáneo. Esta pérdida de tejido cutáneo se puede atribuir a varios factores, tales como la pérdida de células y la disminución de la proliferación celular. En el tejido de auto-renovación similar a la epidermis, el número de células se regula estrictamente por un delicado equilibrio entre la proliferación, la diferenciación terminal y la apoptosis (Robert L, Labat-Robert J y Robert AM. 2009). Por lo tanto, los péptidos desvelados pueden utilizarse en los problemas asociados con el envejecimiento de la piel causado por estímulos tanto intrínsecos como extrínsecos, para prevenir o revertir los efectos del envejecimiento. De manera relacionada, los péptidos se podrían aplicar al tejido que se había dañado por la exposición a diversos agentes externos, tales como la luz del sol. La invención también se puede utilizar como un cosmético al respecto para hacer que la piel tenga un aspecto y textura más joven, y para proporcionar una mejor función. Los péptidos cortos por sí mismos sin alteraciones, o por medio de modificación química y/o administración especializada, se pueden fabricar para penetrar a través de la epidermis para afectar a los procesos en contra de los que causan el adelgazamiento de la

piel, las arrugas, la fragilidad y la rugosidad/endurecimiento. Puesto que los queratinocitos son el principal componente de las superficies epidérmicas y disminuyen en la piel envejecida y dañada, se espera que la reposición de los mismos por la estimulación peptídica revierta el problema anteriormente mencionado.

- La piel es relativamente elástica, pero hay límites en cuanto a su capacidad para estirarse. La estría, o estrías, son una forma de cicatrices en la piel con un tono de color azulado. Son causadas por el desgarro de la dermis, que, con el tiempo pueden disminuir, pero no van a desaparecer por completo. Aparecen por primera vez como líneas rojizas o moradas, pero tienden a desaparecer poco a poco a un intervalo más claro. Las estrías suelen ser el resultado del rápido estiramiento de la piel asociado con el rápido crecimiento o la pérdida rápida de peso. Las estrías pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo que no esté apenas sometida a un estiramiento o distensión notable o excesivo. La mayoría de los lugares comunes son el abdomen, senos, brazos, axilas, espalda, muslos, caderas y nalgas. Las estrías son a menudo causadas por los cambios hormonales de algunas de las principales etapas de la vida como la pubertad y el embarazo, pero el tratamiento con corticosteroides, la obesidad, la cirugía estética y el culturismo intensivo pueden conducir a la aparición de estrías. Bajo la acción de los corticosteroides, el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos puede verse seriamente dañado y, en consecuencia, la síntesis de los 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 y col., 2002). Reparar y restaurar la función de los queratinocitos en la sección dérmica/epidérmica podría ser la clave para la corrección de las estrías. Los péptidos de la presente invención promueven la proliferación y la migración de queratinocitos y son, por lo tanto, ideales para el tratamiento de las estrías.
- En general, una formulación farmacéuticamente aceptable incluiría cualquier portador adecuado para su uso en la piel humana. Tales portadores farmacéuticamente y cosméticamente aceptables incluyen etanol, dimetilsulfóxido, glicerol, sílice, alúmina, almidón y portadores 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 pueden añadirse antibióticos a la formulación para prevenir la infección, permitiendo de este modo, que se produzcan los procesos de máxima cicatrización. 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 20 mg/ml; no obstante, la concentración final empleada puede variar fuera de estos intervalos, en función de la naturaleza del estado de la herida/tejido, la bioactividad del péptido de la invención y el uso de cualquier adyuvante o una técnica para obtener una absorción de la composición potenciada.
- En aspectos de la divulgación inmediata, en la que la composición tiene que estar en contacto con tejido queratinoso humano, cualquiera de los componentes adicionales además de los péptidos de la invención debe ser adecuado para la aplicación al tejido queratinoso; es decir, cuando se incorporan en la composición, tales otros componentes demuestran excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, y similares en el ámbito del juicio razonable del médico. El *CFTA Cosmetic Ingredient Handbook*, segunda edición (1992), describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos no limitativos, habitualmente utilizados en la industria del cuidado de la piel, que son adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención. Ejemplos de estas clases de ingredientes incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos, tales como fragancias, pigmentos, materias colorantes/colorantes, aceites esenciales, sensibilizadores de la piel, astringentes, etc. (p. ej., aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, lactato de mentilo, destilado de avellano), agentes anti-acné, agentes anti-aglomerantes, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos (p. ej., yodopropilo butilcarbamato), antioxidantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tamponantes, agentes de carga, agentes quelantes, aditivos químicos, biocidas cosméticos, desnaturizantes, astringentes de fármacos, analgésicos externos, formadores o materiales de película, agentes opacificantes, ajustadores del pH, propulsores, agentes reductores, secuestrantes, agentes blanqueadores y aclaradores de la piel (p. ej., hidroquinona, ácido kójico, ácido ascórbico, ascorbil fosfato de magnesio, ascorbil glucosamina), agentes acondicionadores de la piel (p. ej., humectantes), agentes calmantes y/o curativos de la piel (p. ej., pantenol y sus derivados, aloe vera, ácido pantoténico y sus derivados, alantoína, bisabolol y glicirricinato dipotásico), agentes de tratamiento de la piel, espesantes, vitaminas y derivados de los mismos.
- La administración de los péptidos de la invención y las composiciones asociadas pueden fabricarse para seres humanos y animales, incluyendo todos los mamíferos. La aplicación también puede efectuarse 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, entre otros, gasas (tejidas y no tejidas, impregnadas, no adherentes, para taponamiento, desbridamiento); vendajes y sistema de compresión; materiales de relleno y limpiadores de heridas; capas de contacto; colágenos; membranas amnióticas; dermis humana acelular; matrices y productos combinados acelulares; y diversos apósitos de uso común.

Listado de apósitos de uso común

Categorías de apósitos	Productos
Películas	BIOCLUSIVE™ (Johnson & Johnson Medical, Inc)

(continuación)

Categorías de apósitos	Productos
	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)
Hidrocolooides	COMFEEL® (Coloplast Sween Corp.)
	DUODERM® (ConvaTec®)
	RESTORE™ (Hollister Incorporated)
Polisacáridos	BARD ABSORPTION DRESSING* (Bard Medical Division)
	DEBRISAN (Johnson & Johnson Medical, Inc.)
	DUODERM® Granules (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)
(*) Los asteriscos se refieren a marcas comerciales de compañías individuales	

5 En general, la composición se puede administrar por vías tópica, oral, transdérmica, sistémica, o por cualquier otro procedimiento conocido por los expertos en la materia que son útiles para administrar los péptidos de la invención al tejido diana. Las composiciones también se pueden aplicar de una manera *in vitro* o *ex vivo*, ya sea a células o a injertos de pacientes que crecen en cultivo, por ejemplo.

10 Las composiciones de la presente invención pueden contener uno o más agentes adicionales que ejercen actividad para el 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, alfa-hidroxiácidos, ácido ascórbico y ácido algarónico. Se espera que ciertos agentes activos adicionales actúen sinérgicamente con el componente peptídico bioactivo, o mejoren la vida útil de la formulación.

Además, las abreviaturas de los aminoácidos siguen el uso convencional:

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
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

(continuación)

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 técnicas para la formulación y administración de los productos farmacéuticos pueden hallarse 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, aerosol, intramuscular, subcutánea, transcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, o intranasal. La presente invención se puede formular en un número de vehículos portador, por ejemplo, en un pulverizador; un aerosol; una emulsión de tipo agua y aceite; una emulsión de tipo aceite y agua; una crema facial o crema corporal; leche solar o after sun; u otro vehículo de administración tópica. Adicionalmente, los péptidos de la presente invención, y composiciones que los contienen, pueden proporcionar características útiles para su inclusión en general en el cuidado de la piel y formulaciones cosméticas, tales como diversos cosméticos para la piel, cremas para la piel, lociones, protectores solares y lociones o cremas terapéuticas, tales como formulaciones anti-acné.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la divulgación.

Ejemplos

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

Los queratinocitos de piel humana (ATCC CRL-2404) se cultivaron en un medio de crecimiento de queratinocitos libre de suero suplementado con 5 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF) recombinante humano (Life Technologies Corporation, 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 durante 24 horas después de realizar una herida por rascado utilizando una punta de pipeta P200 (200 µl). Las heridas por rascado se lavan y se fotografían en el momento 0. Se añadió un péptido a una concentración final de 40 µg/ml. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 %, incubadora con >90 % de humedad, excepto cuando las imágenes están siendo capturadas durante un corto periodo a temperatura ambiente. El cierre de la herida por rascado es seguido después de un tratamiento de 7-8 h y los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cierre de la herida por rascado en queratinocitos cultivados. El cierre de la herida tras un tratamiento de 7 h tratada en TFS se tomó como 100 %, el cierre de la herida tratada en péptido se calculó como relativo al tratado con TFS.

SEQ NO:	ID	N.º HB	Secuencia	Cierre de la herida tras un tratamiento de 7 h (%)	Citotoxicidad sobre queratinocitos (µl)
NA	NA	TFS		100	-
1	HB2265	EKMGRN		199*	>500
4	HB2234	EKMGR		191*	>500
5	HB2235	MGRN		218*	>500
2	HB2262	KMGRN		182*	>500
3	HB2263	EKMGR		188*	>500
6	HB2268	KMG		107	>500
7	HB2269	GRN		102	>500
8	HB2232	KIEK		100	>500
9	HB1062	GRNIRN		99	>500
*: significativo					

Ejemplo 2. Citotoxicidad en queratinocitos de piel humana normales

Para asegurarse de que los péptidos no son citotóxicos para las células, los queratinocitos epidérmicos humanos normales se sembraron en una placa de 96 pocillos. La placa se incubó a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % para permitir que las células crezcan a >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 con un medio fresco que contiene péptidos a diversas concentraciones después se incuban a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 horas. Al final del tratamiento, se midió la viabilidad celular utilizando un kit de prueba por MTT comprado de ATCC (Manassas VA). Los resultados se muestran en la Tabla 1. En las concentraciones de 50 a 500 µg/ml, los péptidos no cambiaron la viabilidad celular según se mide utilizando la prueba por MTT.

Ejemplo 3: Identificación de péptidos que estimulan la proliferación de células

Los queratinocitos de piel humana normales (ATCC CRL-2404) se cultivaron en un medio de crecimiento de queratinocitos libre de suero suplementado con 5 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (FCE) recombinante humano (Life Technologies Corporation, Grand Island, N.Y.). Las células se examinaron microscópicamente a diario. A medida que el cultivo alcanza un 50-75 % de confluencia, los medios en la placa se aspiran y se añade tripsina/EDTA al 0,25 %. Cuando las células se vuelven redondas y separadas, la tripsina se neutraliza mediante la adición de medio de cultivo fresco. Después, las células se centrifugan y el sedimento se vuelve a suspender en medio de cultivo fresco. Un hemacitómetro se utiliza para contar la suspensión de células y el número total de células se ajusta a aproximadamente 500-1.000 células por pocillo mediante la adición de 100 µl de suspensión celular a cada pocillo. Normalmente, se utilizan 60 pocillos centrales y los pocillos externos se llenan con medio fresco para minimizar la evaporación. Cuando las células unidas en cada pocillo después de 6-8 h de incubación, se añaden 100 µl de medio fresco que contiene TFS o 2x las concentraciones deseadas del péptido por triplicado. La microplaca se incuba a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 48-72 h.

Al final de la incubación, las células se someten a ensayo de citotoxicidad celular CYTOSCAN™ SRB (GBiosciences Company, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se fijan antes de tinción suforodamina B (SRB). Después de un extenso lavado, el color se solubiliza utilizando un tampón de solubilización. La absorbancia se midió a 565 nm con un lector de microplacas. Los resultados mostrados en la Tabla 1 son el valor medio del tratamiento por triplicado y los valores de más de 120 se consideran significativos.

Tabla 2. Modulación de la proliferación de queratinocitos epidérmicos humanos normales por los péptidos de la invención.

SEQ ID	N.º HB	Sec.	Concentración del péptido							
			5 µg/ml		2,5 µg/ml		1,25 µg/ml		0,625 µg/ml	
			DO ₅₆₅	% TFS en	DO ₅₆₅	% TFS en	DO ₅₆₅	% TFS en	DO ₅₆₅	% TFS en
-	TFS	TFS	0,1123	100	0,1123	100	0,1123	100	0,1123	100
1	HB2265	EKMGRN	0,142	126*	0,153	136*	0,127	113	0,125	111
4	HB2234	EKMGRN	0,103	92	0,143	127*	0,149	133*	0,151	134*
5	HB2235	MGRN	0,126	112	0,148	132*	0,145	129*	0,148	132*
2	HB2262	KMGRN	0,156	139*	0,169	150*	0,159	142*	0,159	142*
3	HB2263	EKMGR	0,129	115	0,154	137*	0,16	142*	0,137	122*
6	HB2268	KMG	0,108	96	0,134	119	0,113	101	0,103	92
7	HB2269	GRN	0,121	108	0,114	102	0,099	88	0,104	93
8	HB2232	KIEK	0,102	91	0,126	112	0,109	97	0,115	102
*: significativo										

Ejemplo 4. Análisis de perfiles génicos.

Los 84 genes que codifican la cicatrización, la matriz extracelular y las moléculas de adhesión se analizaron utilizando matrices de PCR llevadas a cabo por Sunny Biodiscovery, Inc (Santa Paula, CA). Brevemente, los sustitutos de la piel EPIDERM™ se obtuvieron de MatTek (Ashland, MA) y se manipularon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de equilibrarse durante la noche, el medio se cambió y se hicieron 10 heridas por punción de espesor completo con una aguja 20G y controles de HB2235 (330 µg/ml) o agua se aplicaron en el tejido de la piel por duplicado y se les permite el tratamiento durante 24 horas. Se utilizó también un conjunto de dos tejidos no heridos normales como control para apreciar los perfiles génicos entre los tejidos heridos y normales. Al final del tratamiento, los tejidos se recogieron y preservaron en una solución de RNAlater (Ambion, Austin, TX). El ARN se extrajo y se purificó con un kit Illustra Mini RNAspin (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El ARN total purificado

se evaluó a 260 nm y 280 nm con un espectrofotómetro de arreglo de diodos Agilent HP-8452A. La concentración de ARN se igualó a través de las muestras y la expresión de genes de interés se midió por PCR cuantitativa en tiempo real con un sistema de detección BioRad iCycler iQ utilizando matrices de PCR PAHS-121A, con un kit de síntesis de la 1^a cadena, la mezcla maestra SYBR Green y las condiciones de funcionamiento de PCR de Qiagen. El procedimiento de eficiencia $\Delta\Delta Ct$ se utilizó para la cuantificación de los resultados, tras la normalización de la expresión génica en 5 genes constitutivos llevada a cabo con el análisis de datos de matriz de PCR de RT2 Profiler, software versión 3.5. Los genes se consideraron expresados diferencialmente si el nivel de expresión era razonablemente alto (menos de 30 ciclos para la detección) y la modulación era de 1,5 o más en cada serie de duplicados.

10 Tabla 3. Perfiles de expresión génica seleccionados en un tejido cutáneo herido en comparación con el control no herido y herido tratado con HB2235 frente a herido no tratado, representados como cambio múltiplo

Símbolo	Nombre del gen	Cambio múltiplo regulación positiva (+) o negativa (-)	
		control herido frente a no herido	herido y tratado con HB2235 frente a herido
Proteínas de la matriz			
COL1A1	colágeno I, alfa 1	1,3195	2,0279
COL3A1	colágeno III, alfa 1	1,0353	1,5369
COL5A1	colágeno V, alfa 1	-1,1487	1,1647
COL5A2	colágeno V, alfa 2	-1,1096	1,8921
COL5A3	colágeno V, alfa 3	1,8025	6,5887
COL14A1	colágeno XIV, alfa 1	1,0353	1,5369
ITGB3	integrina beta 1	1,0353	1,5369
CXCL1	ligando de quimiocina (C-X-C) 1	1,3195	-1,057
CXCL2	ligando de quimiocina (C-X-C) 2	4,2871	-1,7171
CXCL5	ligando de quimiocina (C-X-C) 5	2,9282	-3,9449
CSF2	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos 2	1,8661	-1,6021
IL6ST	transductor de señales de interleucina 6	1,9319	1,5369
IL-1β	interleucina 1, beta	1,4641	-1,3947
MAPK3	proteína quinasa activada por mitógenos 3	2,2974	1,8921
Vía antiinflamatoria			
IL-10	interleucina 10	1,0353	1,5369
Factores de crecimiento			
EGF	factor de crecimiento epidérmico	1,2746	1,434
PDGFA	polipéptido alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas	-1,0353	1,434
VTN	vitronectina	1,0000	5,7358
VEGFA	factor de crecimiento endotelial vascular A	-1,366	1,1647
TGFB1	factor de crecimiento transformante-β1	1,2311	2,1735
Proteasas e inhibidores			
MMP1	metalopeptidasa de la matriz 1	1,8025	1,1647
CTSL2	catepsina L2	1,1487	-1,7171
PLAT	activador del plasminógeno tisular	3,3636	1,2483
PLAU	activador del plasminógeno tipo uroquinasa	2,0000	-1,1329
PTGS2	prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa	2,4623	-1,7171
SERPINE1	inhibidor de la serpina peptidasa, clado E, miembro 1	2,1435	-1,4948

Todas las composiciones reivindicadas o procedimientos desvelados en la presente memoria pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a tenor de la presente divulgación. Si bien las composiciones y procedimientos de la presente divulgación se han descrito en términos de aspectos preferentes, resultará evidente para los expertos en la materia que se puedan aplicar variaciones a las composiciones y/o procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas de los procedimientos descritos en la presente memoria sin apartarse del concepto y ámbito de la divulgación. Más específicamente, resultará evidente que ciertos agentes que se relacionan químicamente como fisiológicamente puedan sustituirse con los agentes descritos en la presente memoria mientras se logran resultados idénticos o similares. Todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la materia se consideran dentro del ámbito de la divulgación.

10 **Referencias**

- Bergers G, Coussens LM (2000). Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev.* 10:120-127
- Easton DM, Nijnik A, Mayer ML, Hancock RE (2009). Review Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends Biotechnol.* 27(10):582-90.
- 15 Enoch S, Price P (2004). Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds.* (worldwidewounds.com/2004/august/Enoch/Pathophysiology-Of-Healing.html)
- Gallo RL, Ono M. et al., (1994). Syndecans, cell surface heparin sulfate proteoglycans, are induced by a prolinerich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:11035-9
- 20 Heilborn JD, Nilsson MF. et al., (2003). The cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol.* 120: 379-89
- Lee PH, Rudisill BA et al., (2004). HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropin B, accelerate murine wound repair. *Wound Rep Reg* 12: 351-8.
- 25 Leitch VD, Strudwick XL, Matthaei KI, Dent LA, Cowin AJ. (2009). IL-5-overexpressing mice exhibit eosinophilia and altered wound healing through mechanisms involving prolonged inflammation. *Immunol Cell Biol.* 87(2):131-40.
- Mustoe TA, Cutler NR, Allman RM, Goode PS, et al., (1994) A phase II study to evaluate recombinant platelet derived growth factor-BB in the treatment of stage 3 and 4 pressure ulcers. *Ach Surg* 129: 213-9.
- Nijnik A, Madera L, Ma S, Waldbrook M, Elliott MR, Easton DM, Mayer ML, Mullaly SC, Kindrachuk J, Jenssen H,
- 30 Hancock RE (2010). Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. *J Immunol.* 184(5):2539-50.
- Oono T, Shirafuji Y. et al., (2002). Effects of human neutrophil peptide-1 on the expression of interstitial collagenase and type I collagen in human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 294:185-9
- 35 Presland RB, Dale BA (2000). Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit. Rev. Oral Bio. Med.* 11:383-408
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 17:1063-72.
- Robert L, Labat-Robert J and Robert AM (2009) Physiology of skin aging. *Pathol Biol (Paris).* 57(4):336-41.
- Rogalski C et al., 2002. Extensive striae distensae as a result of topical corticosteroid therapy. *Acta Derm Venereol.* 83:54-55
- 40 Samah A (2011). Topically applied KTTKS: a review. *Int J Cosmet Sci.* 33: 483-90. Shi J, Ross CR, Leto TL, and Blecha F (1996) PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:6014-8
- Singer, A. J., Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341, 738-746
- 45 Steed DL (1995). Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic ulcer study group. *J Vasc Surg* 21:71-8.
- Steinstraesser L, Koehler T, Jacobsen F, Daigeler A, Goertz O, Langer S, Kesting M, Steinau H, Eriksson E, Hirsch T (2008). Host defense peptides in wound healing. *Mol Med.* 14(7-8):528-37.
- Steinstraesser L, Kraneburg UM, Hirsch T, Kesting M, Steinau HU, Jacobsen F, Al-Benna S (2009). Host defense peptides as effector molecules of the innate immune response: a sledgehammer for drug resistance? *Int J Mol*

Sci. 10(9):3951-70.

Upton Z, Cuttle L, Noble A, Kempf M, Topping G, Malda J, et al., (2008) Vitronectin: growth factor complexes hold potential as a wound therapy approach. J Invest Dermatol. 128:1538-1544.

5 Wang, XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y and Li AG (2006). Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing. J Invest Dermatol Symp Proc. 11 (1):112-7.

Zhang L, Falla TJ (2006). Antimicrobial peptides: therapeutic potential. Expert Opin Pharmacother. 7(6):653-63.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Helix BioMedix Inc.
 <120> PÉPTIDOS BIOACTIVOS CORTOS PARA PROMOVER LA CICATRIZACIÓN
 <130> 20226.0049.PZUS00
 15 <150> US 61/764.913
 <151> 14-03-2013
 <160> 10
 20 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido HB2265
 30 <400> 1
 Glu Lys Met Gly Arg Asn
 1 5
 35 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido HB2262
 <400> 2
 Lys Met Gly Arg Asn
 1 5
 45 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Péptido HB2263
 <400> 3
 55 Glu Lys Met Gly Arg
 1 5
 <210> 4

	<211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Péptido HB2234 <400> 4	
10		Glu Lys Met Gly 1
15	<210> 5 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido HB2235 <400> 5	
20		Met Gly Arg Asn 1
25	<210> 6 <211> 3 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido HB2268 <400> 6	
30		Lys Met Gly 1
35	<210> 7 <211> 3 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido HB2269 <400> 7	
40		Gly Arg Asn 1
45	<210> 8 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido HB2232 <400> 8	
50		Lys Ile Glu Lys 1
55		

ES 2 633 437 T3

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido HB1026
 10
 <400> 9
 Gly Arg Asn Ile Arg Asn
 1 5
 15
 <210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Péptido HB107
 <400> 10
 Met Pro Lys Glu Lys Val Phe Leu Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn
 1 5 10 15
 25
 Ile Arg Asn

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado, en el que la secuencia del péptido consiste en la SEQ ID NO: 4 (EKMG), la SEQ ID NO: 5 (MGRN) o la SEQ ID NO: 2 (KMGRN), en el que el péptido está en forma de un ácido libre, amidado en el extremo carboxilo terminal o lipidado en el extremo amino terminal.
- 5 2. El péptido de la reivindicación 1, que corresponde a la SEQ ID NO: 4 (EKMG) o a la SEQ ID NO: 5 (MGRN) o a la SEQ ID NO 2 (KMGRN).
3. El péptido de la reivindicación 1, que comprende uno de los enantiómeros L y D de aminoácidos o ambos.
4. Una composición que comprende al menos un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 5. La composición de la reivindicación 4, en la que el péptido está presente en una concentración que oscila de 0,1 µg/ml a 500 µg/ml o de 0,1 µg/ml a 20 mg/ml.
6. La composición de la reivindicación 4, en la que la composición está en forma de un aerosol, emulsión, líquido, loción, solución, gel, microencapsulación, crema, pasta, pomada, polvo o espuma o está incorporada en un dispositivo adaptado para la aplicación a la superficie de un tejido cutáneo o mucoso o bajo el tejido cutáneo.
- 15 7. Una composición para su uso en la cicatrización de una herida en un mamífero cuando se aplica en una cantidad terapéuticamente eficaz durante un espacio de tiempo eficaz, en la que dicha composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable y al menos un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
8. La composición para su uso según la reivindicación 7, en la que la herida afecta al tejido cutáneo o al tejido mucoso asociado de dicho mamífero.
- 20 9. La composición para su uso según la reivindicación 8, en la que la herida se debe a una abrasión, ampolla, quemadura, laceración, úlcera, contusión, erupción cutánea, cicatriz, estrías o los efectos del envejecimiento o de exposición ambiental.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, para su uso en el tratamiento para el cuidado de la piel.
- 25 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, para su uso en un producto cosmético.
12. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de una herida del tejido cutáneo o mucoso de un mamífero.
13. Un péptido para uso según la reivindicación 12, en el que la herida se debe a una abrasión, ampolla, quemadura, laceración, úlcera, contusión, erupción cutánea, cicatriz, estrías o los efectos del envejecimiento o de exposición ambiental.
- 30