(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 663 072**

(51) Int. CI.:

C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2010 PCT/FR2010/050458**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10103254**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2010 E 10715940 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2406275**

(54) Título: **Péptido promotor de la adhesión y de la migración celular**

(30) Prioridad:

13.03.2009 FR 0901168

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2018

(73) Titular/es:

SYMATESE (33.3%)
Z.I. Les Troques
69630 Chaponost, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%) y
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I (33.3%)

(72) Inventor/es:

ROUSSELLE, PATRICIA

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

DESCRIPCIÓN

Péptido promotor de la adhesión y de la migración celular

Se describe un nuevo péptido de secuencia definida presente en la cadena alfa3 del glóbulo LG4 de la laminina 332 (laminina 5), así como los péptidos de secuencia homóloga a dicho péptido de secuencia definida, y capaz de unirse al receptor de sindecano-1. Se refiere también a una composición farmacéutica o cosmética que contiene dicho péptido. Por último, se refiere al uso del péptido en el campo de la curación de heridas y regeneración de los tejidos o como un complemento en los medios de cultivo destinados a la reconstrucción epidérmica o epitelial.

Cada año decenas de millones de pacientes sufren pérdida de tejidos o deficiencias orgánicas. Aunque el trasplante de los órganos y tejidos en cuestión es capaz de responder a una parte de la demanda, este enfoque terapéutico está gravemente limitado por la falta de donantes y el potencial rechazo de aloinjertos que requiere terapia inmunosupresora a largo plazo.

Durante una decena de años el interés por la ingeniería de tejidos ha experimentado un crecimiento sin precedentes tanto en términos de investigación básica como en términos de la definición y el desarrollo de tejidos “artificiales” que están empezando a ser propuestos para aplicaciones clínicas por diversas sociedades. La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función del tejido.

La ingeniería de tejidos combina los biomateriales naturales o sintéticos biodegradables, células no diferenciadas (células madre) o diferenciadas (queratinocitos, fibroblastos, condrocitos ...) y (o) las moléculas activas, tales como factores de crecimiento o moléculas de adhesión. De hecho, la adhesión celular es una etapa necesaria y fundamental para la aplicación exitosa de los biomateriales en el cuerpo humano. Aunque se pudiera mejorar mediante el desarrollo de superficies altamente interactivas, esta sigue siendo dependiente de la presencia, o la síntesis por las células, de proteínas matriciales de adhesión.

Por otro lado, 5 millones de personas al año necesitan apósitos cicatrizantes para el tratamiento de heridas difíciles (úlceras por presión y úlceras en las piernas). En el mercado existen actualmente muchos apósitos que supuestamente promueven la cicatrización de la piel y la investigación en este campo está creciendo. A pesar de los esfuerzos realizados en el tratamiento y la prevención de la infección y la deshidratación, siguen existiendo muchos problemas en el tratamiento de problemas de cicatrización complicados. De hecho, el problema de la cicatrización de heridas crónicas está aumentando debido a la prolongación de la vida y al envejecimiento de la población. Se anuncia una nueva era con el desarrollo de apósitos portadores de moléculas de adhesión.

La cicatrización cutánea es un fenómeno complejo en el que los procesos dérmicos y epidérmicos están estrechamente relacionados y no es, como se ha creído durante mucho tiempo, un proceso lineal simple en el que los factores de crecimiento son sintetizados para activar la proliferación y la migración celular. Más bien, es el resultado de varios procesos dinámicos e interactivos que implican factores solubles, componentes de la sangre, componentes de la matriz extracelular (MEC) y células parenquitamosas y epiteliales (Clark, 1996).

Las interacciones entre las células y la MEC desempeñan un papel importante en el control del comportamiento de las células mediante el control de la expresión de ciertos genes, o la modulación de la migración, proliferación, diferenciación y muerte celular programada (Hynes, 1992). Este control del comportamiento celular es crucial en la remodelación tisular. Cuando se produce una herida en la piel, la unión dermo-epidérmica (UDE) resulta dañada y sus moléculas constituyentes son destruidas o degradadas por enzimas específicas. La dermis tiene un papel fundamental en la reepitelización mediante la producción de factores solubles para las células epiteliales y moléculas de la matriz informativas con la que los queratinocitos tienen contacto directo. En condiciones favorables, la reepitelización epidérmica comienza unas horas después del traumatismo. La respuesta inflamatoria conduce a la aparición en el lecho de la herida de moléculas matriciales y los queratinocitos de estructuras epiteliales residuales que migran rápidamente al lecho de la herida.

Durante el proceso de reparación, los queratinocitos que migran pierden su polaridad apical-basal, se adhieren a la matriz provisional, y emiten pseudópodos que les permiten realizar una migración lateral (Larjava et al., 1993). Cuando el epitelio cubre el lecho de la herida, las proteínas de la UDE reaparecen secuencialmente y ordenadas desde los márgenes de la herida hacia el centro. Los queratinocitos basales vuelven a adoptar un fenotipo estacionario con polaridad apical, firmemente anclado a la UDE a través de hemidesmosomas (HDS) reconstituidos en su superficie basal. Este control de la migración y adhesión de los queratinocitos basales se efectúa a través de interacciones específicas entre ciertos motivos de péptidos presentes en las moléculas de la matriz y los receptores transmembrana, agrupados en complejos de adhesión y cuyo dominio intracelular está asociado a los constituyentes del citoesqueleto (Aumailley et al., 1996). Los complejos de adhesión celular son grandes agregados multimoleculares que permiten la transferencia bidireccional de información a través de la membrana celular. Estos complejos, que constan de proteínas extracelulares, transmembrana (integrinas y sindecanos), citosólicas y citoesqueléticas son estructuras altamente dinámicas y se estabilizan más o menos de forma transitoria a través de interacciones específicas entre los diversos componentes. El montaje y desmontaje de los complejos de adhesión

está finamente controlado para permitir que la célula realice operaciones clave, tales como la adhesión, la migración, la proliferación y la diferenciación.

Entre la gran variedad de ligandos extracelulares, la laminina 332 (LN332) también conocida como laminina 5 juega un papel fundamental en los dos procesos (Aumailley y Rousselle, 1999; Ghohestani et al., 2001). Esta molécula de adhesión tiene una doble función: ejerce una regulación finamente controlada, que es capaz de inducir una adhesión celular fuerte y estática o, a la inversa, una adhesión de baja afinidad, transitoria que permite la migración celular. Esta propiedad está muy bien ilustrada en la piel, ya que la LN332 es, por un lado, responsable del anclaje de la epidermis, y por otro, participa en la migración de los queratinocitos durante el proceso de curación.

La LN332 está constituida por el ensamblaje de tres subunidades alfa3, beta3 y gamma2 (Figura 1). Es la principal proteína de adhesión e irremplazable de la epidermis donde fue identificada como el componente principal de los filamentos de anclaje, estructuras que conectan los HD en la parte basal de la UDE en la piel (Rousselle et al., 1991). Está implicada en la adhesión de muchas otras células epiteliales del organismo (Rouselle y Aumailley, 1994). Se sintetiza exclusivamente por las células epiteliales en forma de un precursor de 460 kDa (pre-LN332). La cadena alfa3 más larga que las otras 2 lleva en su extremo carboxi terminal un dominio globular que consiste en 5 repeticiones de restos básicos que aparecen como 5 glóbulos denominados LG1 a LG5 (LG1-2-3-4-5). Estos dominios globulares son muy importantes ya que implican las áreas responsables de la adhesión de los queratinocitos.

El documento WO2000/66731 describe la producción de laminina 5 entera en forma recombinante.

El documento WO2006/018551 describe la implicación de la secuencia TALRIRATYGEY presente en la cadena gamma2 del extremo N-terminal de la laminina 5 en la adhesión de los queratinocitos epidérmicos.

El documento WO2006/025646 describe una proteína recombinante rLG3-His6 de 311 aa, que incluye el dominio globular denominado LG3, capaz de promover la adhesión y la migración celular.

En la presente solicitud, el solicitante se interesa por el extremo carboxi-terminal de la cadena alfa3 de la pre-LN332.

En condiciones fisiológicas, cada una de las subunidades alfa3 y gamma2 de la LN332 sufre una escisión post-traduccional extracelular de su extremo carboxi terminal y amino terminal, respectivamente (Marinkovich et al., 1994; Goldfinger et al., 1998; Amano et al., 2000). Estas diversas divisiones conducen a la forma madura que desempeña un papel crucial en la cohesión epitelial-mesenquimal tanto en términos de organización supra-molecular a nivel de los extremos amino terminales como de las interacciones celulares usadas por los dominios LG (Aumailley y Rousselle 1999). De hecho, la maduración de la cadena alfa3, que resulta de la escisión del tándem LG4/5 induce cambios funcionales determinantes de la LN332 ya que permite la adhesión de las células epiteliales adyacentes a través del intermediario de las integrinas alfa6beta4 e induce el ensamblaje de estructuras de adhesión estables que son hemidesmosomas. (Sonnenberg et al., 1993; Rousselle y Aumailley, 1994; Niessen et al., 1994). Así pues, la LN332 madura constituye una barrera para la motilidad celular (Baker et al., 1996; Goldfinger et al., 1998; Ryan et al., 1999). La pre-LN332 es a su vez capaz, a través de los glóbulos LG4/5 del precursor de la cadena alfa3 de impedir la formación de hemidesmosomas e inducir la migración celular (Ryan et al., 1999; Goldfinger et al., 1999; Bachy et al., 2008). Estudios *in vivo* de la cicatrización de la piel han mostrado un aumento de la expresión de las diferentes cadenas de la LN332 por los queratinocitos situados en la colonización de la zona de la herida (Ryan et al., 1994), estando esta última presente en la matriz extracelular en su forma precursora (Ryan et al., 1994; Lampe et al., 1998; Nguyen et al., 2000). La pre-LN332 está además presente en la matriz provisional pero está completamente ausente en las láminas basales organizadas donde aparece en su forma madura (Lampe et al., 1998; Goldfinger et al., 1999; Tungall et al., 2002). Por otra parte, los estudios *in vitro* han descrito muy tempranamente una sobreexpresión y un aumento de la síntesis de la LN332 por los queratinocitos móviles (Rousselle et al., 1991), mientras que su participación a través de la forma precursora ha sido descrita más tardíamente (Nguyen et al., 2000; Décline y Rousselle, 2001). Todos estos datos muestran que el dominio LG4/5 influye en la migración de las células y juega un papel en el proceso de reparación epitelial. Los trabajos, incluidos los de los inventores de esta solicitud, han demostrado que la pre-LN332 coopera con la integrina alfa3beta1 para controlar la polarización y la migración celular (Goldfinger et al., 1998; Décline y Rousselle, 2001; Frank y Carter, 2004; Bachy et al., 2008). Por otra parte, un estudio propone el papel que juega el fragmento LG4/5 en la deposición y retención de la pre-LN332 en la matriz extracelular (Sigle et al., 2004).

Finalmente, se ha demostrado que el dominio LG4/5 de la pre-LN332 interactúa con un receptor de la familia de los proteoglicanos, el sindecano-1, durante la migración de los queratinocitos (Okamoto et al., 2003; Bachy et al., 2008).

En la epidermis, el sindecano-1 se encuentra localizado en la región pericelular de los queratinocitos de las capas suprabasales y se expresa poco en la capa basal. Sorprendentemente, la expresión del sindecano-1 es fuertemente activa durante la cicatrización de heridas y se encuentra principalmente en los bordes de las heridas (Elenius et al., 1991; Oksala et al., 1995; Jaakkola et al., 1998). Este patrón de expresión es específico del sindecano-1 ya que no se encontró en los demás sindecanos (Gallo et al., 1996). Además, los ratones deficientes para el gen que codifica el sindecano-1 presentan defectos de la proliferación y migración de los queratinocitos durante la cicatrización de

heridas (Stepp et al., 2002). Los sindecanos son conocidos por estar implicados en procesos celulares, tales como la migración y son conocidos como co-receptores, cooperando con las integrinas y los factores de crecimiento (Bernfield et al., 1999; Woods et al., 2000). Todos estos elementos refuerzan la hipótesis según la cual el dominio LG4/5 de la pre-LN332 representaría un ligando preferido del sindecano-1 durante la cicatrización y sería la base para una cascada de señalización intracelular favorable para los procesos de reparación epitelial.

Se determinó el sitio de escisión del fragmento LG4/5 en la cadena alfa3 (Decline et al., 2003) y el fragmento LG4/5 ha sido producido en forma recombinante (Okamoto et al., 2003). Los experimentos de adhesión y migración celular realizados con el fragmento LG4/5 han permitido demostrar que este dominio está implicado en la migración celular y que un receptor de membrana, el sindecano-1, está implicado específicamente en su reconocimiento (Okamoto et al., 2003, Bachy et al., 2008). Los sindecanos pertenecen a una familia de receptores de membrana con cadenas de heparán sulfato expresado en la superficie de todas las células adherentes. Estos receptores se han descrito como “facilitadores” moleculares capaces de modular, mediante una señalización intracelular asociada al citoesqueleto, la actividad de las integrinas. La adhesión celular al fragmento LG4/5 es dependiente de las cadenas de heparán sulfato y el condroitín sulfato presente en el sindecano-1. Si estas dos cadenas de glicosaminoglicanos se unen al fragmento LG4/5 con diferentes afinidades, estas reconocen el mismo dominio de interacción en el glóbulo LG4/5 (Okamoto et al., 2003). La pre-LN332 induce la migración de los queratinocitos humanos normales a través de la interacción del sindecano-1 con el dominio LG4/5. La adhesión del sindecano-1 dependiente del dominio LG4/5 de la pre-LN332 induce una reorganización del citoesqueleto de los queratinocitos humanos normales que conduce a la formación de filopodios y microespículas, prolongaciones citoplasmáticas protuyentes características de la migración celular. Esta etapa temprana se acompaña de la activación de las GTPasas Rac y Cdc42, GTPasas conocidas por estar involucradas en la formación de los complejos de adhesión transitorios específicos de la migración celular (Bachy et al., 2008).

La obtención de la estructura del módulo LG5 de la cadena alfa2 de LN211 (Tisi et al., 2000; Timpl et al., 2000) ha permitido establecer un modelo estructural básico de los módulos de LG. Estos módulos se organizan en forma de 14 láminas beta de la A a la N conectadas entre sí por bucles orientados hacia el exterior de la estructura. Usando una tecnología basada en el acoplamiento covalente del fragmento LG4/5 recombinante sobre perlas recubiertas con heparina seguido por fragmentación enzimática de la proteína, se han definido tres secuencias correspondientes a “regiones de unión a heparina” (Vives et al., 2004), respectivamente las secuencias KKLRIKSKEK, PSGKPKSLP y TSVTPKQSL. En este documento, los experimentos se llevaron a cabo a partir de la proteína nativa y los sitios de unión han sido identificados, sin que hayan sido aislados en el estado de péptidos.

Paralelamente, los documentos JP2006063033 y Utani et al., 2001, describen la secuencia NSFMALYLSKGR (del resto 1412 al resto 1423 de la secuencia de la cadena alfa3) localizada en el módulo LG4 como inductor de la adhesión celular a través de los sindecanos 2 y 4.

El solicitante ha demostrado que la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (del resto 1433 al resto 1442 de la secuencia de la cadena alfa3 y situado en un bucle de conexión de las láminas beta F y G en el glóbulo LG4 es el sitio de unión a sindecano-1 en el módulo LG4 ya que (1) es la única capaz de inducir la adhesión celular dependiente de sindecano-1 y (2) es capaz de unir el sindecano-1 de manera específica y equivalente al dominio LG4/5 entero.

La identificación de un péptido funcional de un tamaño tan pequeño estaba lejos de ser evidente, como lo demuestra el documento de Urushibata et al., (Biochemistry, 2099, 48, 10522-10532), en el cual los autores analizaron la actividad biológica de 107 péptidos sintéticos que pertenecen al dominio G de la cadena alfa3 de la laminina, sin resaltar aquello que es el objeto de la presente invención.

Por consiguiente, la invención se refiere en primer lugar a un péptido sintético o similar, como se define a continuación.

El documento US 2005/0059602 describe realmente la secuencia A3G78 constituida por 12 aa y que comprende la secuencia SEQ ID 1. Más concretamente, se excluyen los siguientes péptidos:

- KKLRIKSKEK;
- DGKKLRIKSKEK.

El documento de Hashimoto et al., (Biomaterials 25 (2004) 1407-1414) describe péptidos híbridos unidos a apósitos de alginato. Algunos tienen un tamaño de 10 aa, con un resto de arginina (R) en la posición 4. Sin embargo, estos péptidos poseen una acetil-lisina (ac-K) en la posición 1 y no son susceptibles de unirse al receptor de sindecano-1. Por lo tanto, tampoco están cubiertos por la presente invención los siguientes péptidos:

- Ac-KSIRVAVAPG
- Ac-KSIRIAIAPG
- Ac-KSIRVGVGPG

- Ac-KSIRIGIGPG.

La unión al sindecano-1 puede ser fácilmente comprobada por cualquier técnica conocida por el experto en la materia, particularmente por la técnica de cromatografía de afinidad. Una prueba de este tipo puede por ejemplo consistir en unir el péptido a ensayar a perlas y después incubarlas con lisados de queratinocitos. Las proteínas celulares así fijadas sobre el péptido pueden entonces ser analizadas por electroforesis SDS PAGE seguido de inmunodetección para evaluar el contenido de sindecano-1.

Se demuestra en la siguiente descripción por medio de un análisis cuantitativo que la adhesión celular revelada por el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) es más eficaz que la descrita por el péptido NSFMALYLSKGR ya que, por un parte, la adhesión celular es inducida por una menor cantidad de péptido inmovilizado y, por otra parte, el número total de células adheridas es mayor que el 200 % en el péptido KKLRIKSKEK independientemente de la cantidad de péptido inmovilizado.

En la siguiente descripción y en las reivindicaciones, por “análogo de péptido” se designa al péptido de la invención en forma modificada, siempre que el péptido conserve las características que figuran a continuación. Los cambios pueden ser de orden conformacional. El péptido puede por lo tanto estar en forma oligomerizada, plegada, ciclada. Los cambios también pueden ser de naturaleza química. Por ejemplo, un péptido en el que se injerta un motivo de interés, o cuya cadena lateral está químicamente modificada también está abarcado por la presente invención.

Por lo tanto, la invención se refiere a un péptido que comprende o está constituido por la secuencia $Kaa_2aa_3Raa_5aa_6aa_7aa_8aa_9aa_{10}$ en la cual, a pH fisiológico:

- aa_2, aa_6, aa_8, aa_{10} son restos de carga positiva; a lo sumo uno de los cuales puede estar sustituido por un resto de carga neutra,
- aa_3 es un resto de carga neutra,
- aa_5 es un resto de carga neutra,
- aa_7 es un resto de carga neutra,
- aa_9 es un resto de carga negativa o un resto de carga neutra,

siendo la secuencia capaz de unirse al receptor de sindecano-1,
a excepción de los péptidos que comprenden o están constituidos por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1).

En la siguiente descripción y en las reivindicaciones, resto de carga neutra se refiere a los siguientes aminoácidos: fenilalanina, metionina, triptófano, valina, leucina, isoleucina, alanina, prolina, glicina, cisteína, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina.

Del mismo modo, resto de carga positiva se refiere a los siguientes aminoácidos: lisina, arginina e histidina.

Finalmente, resto de carga negativa se refiere a los siguientes aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico.

El solicitante ha obtenido muy buenos resultados de adhesión celular con los péptidos abarcados ventajosamente por la invención, que contienen o se componen de las siguientes secuencias:

- A2 : KALRIKSKEK (SEQ ID 2)
- A3 : KKARIKSKEK (SEQ ID 3)
- A5: KKLRAKSKEK (SEQ ID 4)
- A6 : KKLRIASKEK (SEQ ID 5)
- A8 : KKLRIKSAEK (SEQ ID 6)
- A9 : KKLRIKSKAK (SEQ ID 7)
- A10 : KKLRIKSKEA (SEQ ID 8)
- M2 : KKLRLRSKER (SEQ ID 9)
- M4 :KKLRHKSKEK (SEQ ID 10)
- M5 : KKLRTKSKEK (SEQ ID 11)
- M6 : KKLRKKSKEK (SEQ ID 12)
- M7 : KKLRSKSKEK (SEQ ID 13)
- M8 : KKLRIKLKEK (SEQ ID 14)
- M9 : KKLRIKQKEK (SEQ ID 15)
- U1 : KKLRIQSKEK (SEQ ID 16)
- U2 : KKLRIKSQEK (SEQ ID 17)
- U3 : KKLRIKSKEQ (SEQ ID 18).

La invención tiene igualmente por objeto un péptido sintético

- que contiene no más de 30 aminoácidos que comprende o está constituido por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1), o
- que comprende o está constituido por la secuencia $Kaa_2aa_3Raa_5aa_6aa_7aa_8aa_9aa_{10}$, en la que, a pH fisiológico:
  - aa_2, aa_6, aa_8, aa_{10} son restos de carga positiva; a lo sumo uno de los cuales puede estar sustituido por un resto de carga neutra,
  - aa_3 es un resto de carga neutra,
  - aa_5 es un resto de carga neutra,
  - aa_7 es un resto de carga neutra, a excepción de la alanina y
  - aa_9 es un resto de carga negativa o un resto de carga neutra,

siendo la secuencia capaz de unirse al receptor de sindecano-1, a excepción de los péptidos que comprenden o están constituidos por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1)
para su uso como un medicamento. De acuerdo con una realización particular, dicho péptido contiene o está constituido por una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID 2 a SEQ ID 18.

Dicho péptido se usa ventajosamente en la cicatrización de la piel, en particular tras una patología de la piel o un traumatismo.
Las enfermedades de la piel consideradas incluyen:

- Úlceras, escaras,
- Tratamiento de la piel después de los procedimientos dermatológicos, tales como tratamiento cosmético para el envejecimiento, melasma, tratamiento con láser de CO_2 o erbio, láser fraccional, peeling químico, microdermoabrasión
- Patología de la unión dermo-epidérmica, tales como la epidermolisis bullosa,
- Psoriasis.

Los traumatismos relevantes incluyen:

- Quemadura de segundo grado, superficial a profunda, dermoabrasión de tercer grado, ampollas
- Reconstrucción dérmica, cirugía plástica, injerto de piel
- Zonas donantes de injertos de piel

El péptido para su uso como un medicamento, como se define anteriormente, también se puede utilizar para la regeneración de tejidos, en particular para el aumento o engrosamiento de la piel. En este contexto, tiene un interés para el relleno de arrugas.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica o cosmética que comprende el péptido descrito anteriormente en relación con su uso como un medicamento, capaz de adoptar varias formas.

En una primera realización, la composición farmacéutica de la invención es más parecida a un dispositivo médico, en este caso un soporte sobre el que se injerta o se introduce, o en el que se incorpora en su interior el péptido sintético de la invención, estando en forma de una película o una matriz hecha de un material biológico seleccionado del grupo que comprende colágeno, gelatina, polisacáridos, ácido hialurónico, celulosa, carboximetilcelulosa, pectina, quitosano, dermis humana o animal descelularizado, o un material sintético seleccionado del grupo que comprende silicona, poliuretano, PLLA, o material textil del tipo de apósito elegido del grupo que comprende algodón, poliéster, poliamida.

Tales dispositivos se utilizan en particular para la reconstrucción de la piel en quemaduras de tercer grado. Por lo tanto, se describe un proceso de reconstrucción de la piel, sobre todo en quemaduras de tercer grado, que consiste en aplicar el dispositivo médico descrito anteriormente en contacto con la piel.

En una segunda realización, la composición farmacéutica o cosmética de la invención está en la forma de una crema, un hidrogel, una solución, una formulación inyectable o un aerosol que comprende opcionalmente queratinocitos autólogos o células mesenquimales.

En el caso de la solución, crema o hidrogel, el péptido o los péptidos se incorporan en estas preparaciones destinadas por ejemplo a ser untadas sobre la piel durante el injerto de piel a nivel de los sitios donantes y receptores de los injertos epidérmicos o dermoepidérmicos, así como para la cicatrización de la piel después de un rasguño, quemadura de segundo grado en el caso de heridas crónicas o cualquier procedimiento médico para el tratamiento de la piel.

En otra aplicación, el péptido o los péptidos se incorporan en una formulación inyectable para el tratamiento del envejecimiento de la piel, por ejemplo en mesoterapia. También puede considerarse la aplicación tópica.

La forma de aerosol es especialmente adecuada en aplicaciones de ingeniería de tejidos antes de aplicar láminas epidérmicas o pieles totalmente autólogas o alogénicas, por ejemplo para el tratamiento de quemaduras graves o la cicatrización de heridas recalcitrantes de tipo úlceras. En una realización particular, la forma de aerosol también puede contener, además del péptido, queratinocitos autólogos. El tratamiento realizado generalmente en el caso de quemaduras graves puede realizarse en una vez o dos veces.

Tratamiento en una vez:

- o recogida de un colgajo de epidermis seguido por la digestión enzimática del tejido y la recuperación de una suspensión celular a la que se añade el péptido o los péptidos. A continuación, la mezcla de células/péptidos se pulveriza sobre la herida a tratar.

Tratamiento en dos veces:

- o recogida de un colgajo de epidermis seguido por la digestión enzimática del colgajo epidérmico. Los queratinocitos se aíslan y se cultivan para la amplificación. Recuperación de las células como una suspensión a la que se añade el péptido o los péptidos. A continuación, la mezcla se pulveriza sobre la herida a tratar.

La invención también se refiere a un medio de cultivo que contiene el péptido descrito anteriormente en relación con su uso como un medicamento destinado al cultivo *in vitro* de células epiteliales o mesenquimales.

Específicamente, el péptido o los péptidos pueden añadirse a los medios de cultivo específicos para el cultivo *in vitro* de células epiteliales o mesenquimales (queratinocitos y fibroblastos entre otras) ya sea directamente en el medio de cultivo durante su fabricación o en forma de complemento añadido extemporáneamente en el medio de cultivo en uso.

Tal medio de cultivo puede ser para el cultivo de queratinocitos y otras células epiteliales (epitelio corneal, epitelio oral o vaginal) para aplicaciones médicas, científicas, de investigación o de farmacotoxicología, siendo la adición del péptido o los péptidos para facilitar y/o acortar las etapas de crecimiento, y/o mejorar la calidad del cultivo y la estructura celular (capa de células, pseudoépidermis, epitelios reconstruidos).

Un tipo de cultivo de queratinocitos medio se describe por ejemplo en la patente US5654135.

Las aplicaciones de los cultivos de queratinocitos o células epiteliales son por ejemplo:

- Realización de la reconstrucción de la epidermis o del epitelio para las pruebas de moléculas farmacológicas o cosméticas o preparaciones farmacológicas o cosméticas (prescindiendo de modelos animales)
- Para el tratamiento de quemaduras graves o el tratamiento de la cicatrización (por ejemplo, úlceras varicosas o úlceras diabéticas), mediante la pulverización de las células o láminas epidérmicas. El péptido de la invención también puede implementarse en un medio de cultivo de queratinocitos humanos normales para la supervivencia de sustitutos de la piel antes del trasplante, en particular en el caso de quemaduras graves.
- Con fines de investigación, terapia génica, estudio de los queratinocitos, prueba de nuevos principios activos, factores de crecimiento...
- Para la constitución de bancos de células

El medio de cultivo que contiene el péptido o los péptidos puede ser para el cultivo de fibroblastos *in vitro* con el fin de lograr una piel total y antes de la siembra de los queratinocitos y después en las fases de realización de la pseudoepidermis. El péptido o los péptidos permiten una mejor adhesión y propagación de los fibroblastos lo que limita la pérdida de fibroblastos inmediatamente después de la siembra, así como una mayor movilidad de los fibroblastos sembrados.

La duración de la obtención de una dermis de calidad equivalente se reduce, permitiendo obtener una piel total más rápidamente.

La presencia *in vivo* del péptido en la matriz tridimensional permite una mejor adhesión y propagación de los fibroblastos, así como limitar la formación de tejido de granulación durante la cicatrización de la herida.

La invención también se refiere a un medio de cultivo de células epiteliales tales como queratinocitos que contienen, por ejemplo, el péptido junto con su uso como un medicamento. Los soportes pueden estar en forma de membranas o matrices que se pueden utilizar para obtener una pseudoepidermis o pieles totales que se pueden utilizar para pruebas toxicológicas de los productos, moléculas o formulaciones cosméticas o farmacéuticas.

El péptido o los péptidos se utilizan para reducir las pérdidas de siembra, aumentar la velocidad de reconstrucción de la epidermis y mejorar la calidad estructural de la epidermis reconstruida.

Específicamente, el medio de cultivo puede estar en la forma de placas de cultivo de poliestireno sobre las que se adsorben péptidos injertados.

El medio de cultivo también puede estar en la forma de una membrana o película de biopolímero usada para la reconstrucción de una epidermis equivalente, por ejemplo en una membrana de colágeno de tipo I y de colágeno de tipo IV, sobre las cuales se adsorben o injertan los péptidos.

En aplicaciones donde el péptido se injerta en la superficie de una película, una matriz, una membrana, una placa de cultivo celular, se puede añadir al extremo C o N terminal de un grupo que permite un enlace de forma covalente sobre el soporte. Este grupo reactivo frente al soporte será eventualmente separado del péptido mediante un brazo espaciador.

El grupo puede consistir, por ejemplo en un injerto del motivo Cys-Gly-Gly en el extremo N-terminal para la reacción sobre un quitosano cloroacetilado como se describe en Masuda et al., (2009).

También se puede añadir un brazo de biotina que permitirá un injerto no covalente sobre un soporte funcionalizado con avidina.

El medio de cultivo también puede estar en la forma de una membrana textil o matriz porosa sobre la que se adsorben o injertan los péptidos.

El medio de cultivo también puede estar en forma de geles, por ejemplo, geles de colágeno solubles en ácido sobre los que los péptidos son adsorbidos o injertados.

El péptido o los péptidos también se pueden aportar independientemente del medio de cultivo en forma de una solución de recubrimiento, por ejemplo para el recubrimiento de una placa de cultivo o para el recubrimiento de una membrana de biopolímero usada para la reconstrucción de un equivalente de epidermis, por ejemplo en una membrana de colágeno de tipo I y tipo IV.

La invención y las ventajas de la misma surgirán claramente a partir de los siguientes ejemplos que se incluyen a continuación de las figuras adjuntas.

Figura 1: Presentación de la laminina 332
Las cadenas alfa3, beta3 y gamma2 se ensamblan para formar una hélice alfa superenrrollada a nivel de su extremo C terminal. La cadena alfa 3, más larga que las otras dos, tiene en su extremo C terminal una serie de cinco dominios globulares designados LG1 a LG5. La molécula está organizada en dominios: LN (dominio laminina N-terminal), LE (dominio del tipo factor de crecimiento epidérmico de laminina), L4 (dominio laminina 4), LG (dominio globular de laminina), LCC (superhélice de laminina).
Figura 2: Secuencia del péptido del dominio LG4/5 y localización del sitio de unión a sindecano-1.
Secuencia del dominio LG4/5 de la cadena alfa3 de la pre-LN332. La secuencia N-terminal comienza a partir del sitio de escisión a nivel del ácido aspártico en la posición 1338 y termina con un ácido glutámico en la posición 1713. Las regiones subrayadas representan dominios lineales “espaciadores” presentes entre los glóbulos. El dominio de unión a sindecano-1 KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) se muestra en negrita, de la posición 1433 a la posición 1442.
Figura 3: Adhesión de los queratinocitos humanos normales y células HT1080 al fragmento LG4/5 y al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) normal.

(A, B) Adhesión celular de queratinocitos humanos normales y células de la línea HT1080 al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y a la proteína LG4/5 dependiente de la dosis. El péptido (A) y la proteína LG4/5 (B) se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos a las concentraciones indicadas en la abscisa. Se sembraron $6x10^4$ células en cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células adheridas se fijaron y la adhesión celular se midió como se describe en la sección de metodología. (C) Observación de los queratinocitos humanos normales y las células HT1080 adheridas al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y a la proteína LG4/5. La observación se hizo con un microscopio Zeiss Axiovert 40 equipado con un bloque de interferencia PlasDIC. Barra, 50 µm.

Figura 4: Efecto del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) sobre la adhesión de las células al fragmento de LG4/5 y a la laminina 332.
Las proteínas LG4/5 (barras blancas) y LN332 (barras grises) (1 µg/pocillo) se adsorbieron en placas de 96 pocillos. (A) Efecto del anticuerpo policlonal anti-LG4/5 sobre la adhesión celular a la proteína LG4/5 y a la LN332. Después de la saturación de los pocillos, se aplicó una solución de anticuerpo anti-LG4/5 (10 µg/ml) una hora antes de realizar el ensayo de adhesión con las células HT1080 ($6x10^4$ células/pocillo). (B, C) Efecto de la proteína LG4/5 y del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) en solución sobre la adhesión al fragmento LG4/5

dependiente de sindecano-1. Las células HT1080 se extrajeron de las placas y se colocaron en pocillos ($6x10^4$ células/pocillo) tal cual o en presencia de la proteína LG4/5 (10 µg/ml) o del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (20 µg/ml) como se indica en el gráfico. (A, B, C) Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células adheridas se fijaron y la adhesión celular se midió como se describe en la sección de metodología. La adhesión celular en presencia del anticuerpo o de proteínas competidoras se presenta en porcentaje de la adhesión celular obtenida en el mismo sustrato sin competidor.

Figura 5: Demostración de la unión específica de sindecano-1 al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) por cromatografía de afinidad.

(A) Un lisado de queratinocitos humanos normales se preparó como se describe en Materiales y Métodos y se incubaron 2 mg de lisado con perlas de neutravidina no recubiertas (carril 1) o recubiertas con los péptidos KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (carril 2), PSGKPKSLP (SEQ ID 19) (carril 3) y TSVTPKQSL (SEQ ID 20) (carril 4) biotinilados. Después de los lavados, el material unido a las perlas se digirió con una mezcla de heparitinasa I y de condroitinasa ABC para liberar la parte proteica del sindecano-1 de los glicosaminoglicanos. Las muestras se analizaron a continuación mediante SDS PAGE en un gel de 8 % de acrilamida en condiciones no reductoras y se analizaron después por inmunotransferencia con el anticuerpo policlonal anti-sindecano H174. (B) Se preparó un lisado de queratinocitos humanos normales y se incubaron 2 mg de lisado con perlas de neutravidina no recubiertas (carril 1) o recubiertas con el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) biotinilado (carril 3), o con perlas de sefarosa recubiertas con el fragmento LG4/5 entero (carril 2). Después de los lavados, el material unido a las perlas se digirió con una mezcla de heparitinasa I y de condroitinasa ABC para liberar la parte proteica del sindecano-1 de los glicosaminoglicanos. Las muestras se analizaron a continuación mediante electroforesis SDS PAGE en un gel de 8 % de acrilamida en condiciones no reductoras y se analizaron después por inmunotransferencia con el anticuerpo policlonal anti-sindecano H174. (A, B) La posición de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda.

Figura 6: Adhesión de células HT1080 a los péptidos KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y NSFMALYLSKGR (SEQ ID 21).

(A) Una serie decreciente de péptidos KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y el péptido NSFMALYLSKGR (SEQ ID 21) se inmovilizaron en placas de 96 pocillos Microlon y la determinación de la cantidad real adsorbida se realizó mediante un ensayo de proteínas en referencia a un rango del péptido correspondiente realizado extemporáneamente. Las cantidades de péptidos ensayados se muestran en las abscisas del gráfico. Se sembraron $6x10^4$ células en cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células adheridas se fijaron y la adhesión celular se midió como se describe en la sección de metodología. (B) Observación de células HT1080 adheridas al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y al péptido NSFMALYLSKGR (SEQ ID 21). La observación se hizo con un microscopio Zeiss Axiovert 40 equipado con un bloque de interferencia PlasDIC. Barra, 50 µm.

Figura 7: Mutagénesis del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y el efecto sobre la unión a sindecano-1.
Se introdujeron una serie de mutaciones puntuales en el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) sustituyendo sucesivamente cada aminoácido con alanina (A). Los diferentes péptidos mutados biotinilados se muestran en la figura y están enumerados de A1 a A10. El péptido de tipo silvestre (T+) se muestra en negro. Los aminoácidos de trazo “grueso” representan la posición de los aminoácidos básicos (lisina y arginina) que se cree que desempeñan un papel importante en la interacción con glicosaminoglicanos. Cada una de las mutaciones en la alanina (A) se muestra subrayada. Un lisado de queratinocitos humanos normales se preparó como se describe en Materiales y Métodos y se incubaron 2 mg de lisado con perlas de neutravidina no recubiertas (carril T-), recubiertas con los péptidos KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (T+) o recubiertas con diferentes péptidos mutados (A1 a A10). Después de los lavados, el material unido a las perlas se digirió con una mezcla de heparitinasa I y de condroitinasa ABC para liberar la parte proteica del sindecano-1 de los glicosaminoglicanos. Las muestras se analizaron a continuación mediante SDS PAGE en un gel de 8 % de acrilamida, en condiciones no reductoras y se analizaron después por inmunotransferencia con el anticuerpo policlonal anti-sindecano H174. La posición de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda.

Figura 8: Mutagénesis del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y el efecto sobre la unión a sindecano-1.
Se introdujeron una serie de mutaciones puntuales o agrupadas en el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) mediante la sustitución de una o más lisina (K) por una glutamina (Q). Los diferentes péptidos mutados biotinilados se presentan en la figura y se designan de U1 a U9. El péptido de tipo silvestre se designa T+. Los aminoácidos de trazo “grueso” representan la posición de los aminoácidos básicos (lisina y arginina) que se cree que desempeñan un papel importante en la interacción con los glicosaminoglicanos. Cada una de las mutaciones en la glutamina (Q), puntual o múltiple, se muestra subrayada. Un péptido acortado y privado de 3 restos se designa U9. Un lisado de los queratinocitos humanos normales se preparó como se describe en Materiales y Métodos y se incubaron 2 mg de lisado con perlas de neutravidina no recubiertas (carril T-), recubiertas con los péptidos KKLRIKSKEK (T+) o recubiertas con diferentes péptidos modificados (U1 a U9). Después de los lavados, el material unido a las perlas se digirió con una mezcla de heparitinasa I y condroitinasa ABC para liberar la parte proteica del sindecano-1 de los glicosaminoglicanos. Las muestras se analizaron a continuación mediante electroforesis SDS PAGE en un gel de 8 % de acrilamida en condiciones no reductoras y se analizaron después por inmunotransferencia con el anticuerpo policlonal anti-sindecano H174. La posición de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda.

Figura 9: La mutagénesis del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) mediante búsqueda de homología en las proteínas de la matriz extracelular y las consecuencias sobre la unión a sindecano-1.
Una serie de variantes del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) se produjeron teniendo en cuenta la homología de secuencias que se encuentran en las proteínas de la matriz extracelular. El péptido de tipo silvestre se designa T+. Los aminoácidos en trazo "grueso" representan la posición de los aminoácidos que desempeñan un papel importante en la interacción con el sindecano-1 (ver las figuras 6 y 7). Los aminoácidos que difieren de la secuencia original están subrayados. (A) Se encontraron secuencias homólogas de la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) en las proteínas de la matriz extracelular y se han denominado M1 (procedente de la cadena de laminina alfa4 humana o murina), M2 (procedente de la cadena de laminina alfa3 murina) y M3 (procedente de la proteína ADAM 20 humana). (B) Las secuencias homólogas de la secuencia de R-X-KSK fueron encontradas en las proteínas de la matriz extracelular y se han enumerado de M4 a M7. (C) Las secuencias homólogas de la secuencia RIK-X-K se han encontrado en las proteínas de la matriz extracelular y se han enumerado de M8 a M9. Los lisados de queratinocitos humanos normales se prepararon como se describe en Materiales y Métodos y se incubaron 2 mg de lisado con perlas de neutravidina no recubiertas (línea T-), recubiertas con los péptidos KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (T+) o recubiertas con diversos péptidos modificados (M1-M9). Después de los lavados, el material unido a las perlas se digirió con una mezcla de heparitinasa I y de condroitinasa ABC para liberar la parte proteica de sindecano-1 de los glicosaminoglicanos. Las muestras se analizaron a continuación mediante análisis de electroforesis SDS PAGE en un gel de 8 % de acrilamida en condiciones no reductoras y después se analizaron por inmunotransferencia con el anticuerpo policlonal anti-sindecano H174. La posición de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda.
Figura 10: Efecto del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) sobre la viabilidad de las NHK.
Las NHK se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10^4 células por pocillo. Después de 24 horas, los medios de cultivo se retiraron y se reemplazaron con medio KBM-2 que contenía las concentraciones del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (curva superior) o de la proteína LG4/5 (línea inferior) como se indica. Después de 48 horas de contacto a 37 °C, los medios se retiraron y esta etapa se repitió dos veces. Después de 48 horas de contacto a 37 °C, los medios fueron reemplazados por el reactivo XTT. Las placas se colocaron a continuación en una incubadora a 37 °C y la lectura de absorbancia se realizó a las 6 horas. Los controles sin péptido ni proteína se analizaron en la misma placa.
Figura 11: Efecto del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) sobre la migración de las NHK por videomicroscopía en tiempo real en células vivas.
Las NHK se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 20.000 células por pocillo en ausencia (A) o en presencia del fragmento LG4/5 (10 µg/ml, B) o del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (10 µg/ml, C) en medio de cultivo KGM. Después, el comportamiento de las células se registró inmediatamente por videomicroscopía en tiempo real (lapso de tiempo) durante 5 horas a una velocidad de toma de imágenes cada 10 minutos. Los diagramas ilustran el comportamiento de 20 células tomadas al azar en un campo dado. Para facilitar el análisis de los datos, los trayectos se han orientado a lo largo de x(0) e y(0). Las distancias se indican en micrómetros en los ejes de los gráficos.
Figura 12: Efecto del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) sobre el cierre de la herida de las NHK.
Las NHK se sembraron en placas de 24 pocillos y se hicieron crecer hasta la confluencia. Se eliminó el medio y se hizo una herida en el tapiz celular con la punta de una pipeta. Después de enjuagar con PBS, las superficies se incubaron con medio de cultivo KBM-2 a 37 °C en ausencia o presencia de la proteína LG4/5 (10 µg/ml) o del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (20 µg/ml). Después, el comportamiento de las células a nivel de la herida fue seguido inmediatamente por videomicroscopía de lapso de tiempo a una velocidad de una imagen grabada cada hora durante un período de 48 horas en una cámara humidificada que contiene 5 % de CO_2. (A) Las imágenes grabadas al comienzo del experimento, a las 24 h y a las 48 h permitieron definir el área total de la herida cubierta por las células durante la duración del experimento y para cada condición (las líneas negras representan los bordes de la herida al inicio de la grabación). Barra, 100 µM. (B) Las superficies lesionadas (sin células) se midieron al principio, a las 24 h (barras grises) y a las 48 h (barras negras) utilizando el software Adobe Photoshop CS3 Extended (versión 10.0) en las diferentes condiciones. La tasa de cierre para cada herida se expresó como un porcentaje de la lesión inicial. Cada condición se realizó por triplicado (3 pocillos por condición).
Figura 13: Análisis del efecto del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) sobre la adhesión celular a diferentes proteínas de la matriz extracelular.

(A) Estudio del efecto del péptido dado en forma soluble sobre la adhesión de las células HT1080. Usando experimentos de adhesión de dosis-respuesta, se ha seleccionado una cantidad fija de colágeno I (0,02 µg/pocillo), colágeno IV (0,5 µg/pocillo), fibronectina (0,1 µg/pocillo), laminina 111 (0,1 µg/pocillo) y laminina 332 (0,2 µg/pocillo) que induce una adhesión moderada para este experimento y se inmovilizó en placas de 96 pocillos. Se sembraron $6x10^4$ células HT1080 en cada pocillo en presencia (barras negras) o ausencia (barras grises) de péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (50 µg/ml). Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora y después del lavado, se fijaron las células adheridas. La adhesión celular se midió como se describe en la sección de metodología.
(B) Estudio del efecto del péptido inmovilizado sobre la adhesión de las células HT1080 a las proteínas de la matriz. Las proteínas de la matriz, colágeno I (0,02 µg), colágeno IV (0,5 µg), fibronectina (0,1 µg), laminina 111 (0,1 µg) y laminina 332 (0,2 µg) fueron inmovilizadas solas (barras grises) o co-inmovilizadas con el péptido KKLRIKSKEK (2,5 µg, barras negras) en placas de 96 pocillos. Se sembraron 6 x 10^4 células HT1080

en cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células adheridas se fijaron y la adhesión celular se midió como se describe en la sección de metodología.

Figura 14: El sindecano-1 de los fibroblastos dérmicos interactúa con el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1).

(A) Demostración de la unión de sindecano-1 al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1). Un lisado de fibroblastos humanos normales y un lisado de queratinocitos humanos normales se prepararon como se describe en Materiales y Métodos y se incubaron 2 mg de cada lisado con perlas de neutravidina no recubiertas (carriles 1) o recubiertas con los péptidos KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) biotinilados (carriles 2). El control positivo realizado con el lisado de los queratinocitos se realizó para comparar el tamaño y la cantidad de sindecano-1 en los dos tipos de células. Después de los lavados, el material unido a las perlas se digirió con una mezcla de heparitinasa I y de condroitinasa ABC para liberar la parte proteica del sindecano-1 de los glicosaminoglicanos. Las muestras se analizaron a continuación mediante electroforesis SDS PAGE en un gel de 8 % de acrilamida en condiciones no reductoras y después se analizaron por inmunotransferencia con el anticuerpo policlonal anti-sindecano-1 H174. La posición de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda. (B, C) Adhesión celular de los fibroblastos humanos normales al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y a la proteína LG4/5. En un caso (B), se inmovilizaron 5 µg de péptido KKLRIKSKEK y 1 µg de proteína LG4/5 sobre una placa de 96 pocillos y el otro (C), el péptido KKLRIKSKEK se inmovilizó a las concentraciones indicadas en la abscisa. Se sembraron 6 x 10^4 fibroblastos dérmicos en cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células adheridas se fijaron y la adhesión celular se midió como se describe en la sección de metodología.

Figura 15: Eficacia del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) en la epitelización de las heridas superficiales de la piel en un modelo experimental en cerdos.

(A) Se realizaron heridas superficiales de 0,9 mm de espesor en el lomo de 2 cerdos y fueron tratados con PBS (control) o una solución de péptido KKLRIKSKEK a 20 µg/ml, (cerdo 1) o 50 µg/ml (cerdo 2). La epitelización de las heridas evaluada macroscópicamente, muestra una diferencia de recogida entre las dos condiciones en el día 7. En los clichés, las zonas no epitelizadas estaban rodeadas por una línea negra. La observación macroscópica en el día 11 mostró una mejor restauración de la piel en presencia del péptido. (B) La superficie re-epitelizada de cada herida fotografiada en el día 7 se evaluó usando el software Adobe Photoshop CS3 Extended y la tasa de epitelización se expresó como un porcentaje de la herida inicial. Estos resultados son un promedio de los resultados obtenidos después del tratamiento de 4 heridas diferentes para cada concentración de péptido (2 heridas control por condición).

Ejemplos de realización

1°) Procedimiento de fabricación de péptidos

La síntesis de péptidos se realizó en un Sintetizador Milligen 9050 usando química de Fmoc-Opfp/HOBt. A continuación, el péptido se separó de la resina y se desprotegió utilizando una solución de TFA que contiene depuradores (fenol, agua, etanoditiol y tioanisol). El péptido se analizó a continuación y se purificó en una columna Vydac C18, 5 mm de 4,6 o 10 mm de diámetro y 250 mm de longitud y se caracterizó por espectrometría de masas por electronebulización en un SCIEX API 165. Los péptidos biotinilados fueron producidos por Eurogentec (Eurogentec, Anger, Francia).

2°) Información sobre el péptido de interés: KKLRIKSKEK (SEQ ID 1)

Número de aminoácidos: 10
Peso molecular: 1257,5
Punto isoeléctrico teórico: 10,58
Composición de aminoácidos:

Arg (R)	1	10,0 %
Glu (E)	1	10,0 %
Ile (I)	1	10,0 %
Leu (L)	1	10,0 %
Lys (K)	5	50,0 %
Ser (S)	1	10,0 %

Número total de restos cargados negativamente (Asp + Glu): 1
Número total de restos cargados positivamente (Arg + Lys): 6

Puntos isoeléctricos teóricos de péptidos análogos comprendidos entre 10 y 12:

- A2 : KALRIKSKEK : 10,46

- A3 : KKARIKSKEK : 10,58
- A5: KKLRAKSKEK : 10,58
- A6 : KKLRIASKEK : 10,46
- A8 : KKLRIKSAEK : 10,46
- A9 : KKLRIKSKAK : 11,39
- A10 : KKLRIKSKEA : 10,46
- M2 : KKLRLRSKER : 11,73
- M4 : KKLRHKSKEK : 10,58
- M5 : KKLRTKSKEK : 10,58
- M6 : KKLRKKSKEK : 10,68
- M7 : KKLRSKSKEK : 10,58
- M8 : KKLRIKLKEK : 10,58
- M9 : KKLRIKQKEK : 10,58
- U1 : KKLRIQSKEK : 10,46
- U2 : KKLRIKSQEK : 10,46
- U3 : KKLRIKSKEQ : 10,46

3°) Las células usadas para el estudio

A- las líneas

Las células usadas fueron derivadas de las líneas que expresan grandes cantidades de sindecano-1 en su superficie (Okamoto et al., 2003). Estas son células HT1080 (fibrosarcoma, ser humano), American Type Culture Collection CCL-121.

Estas células se mantuvieron en cultivo en medio DMEM complementado con suero de ternera fetal al 10 % y glutamina 2 mM y se cultivaron a 37 °C en una incubadora de CO_2 (5 % de CO_2, 95 % de aire y 98 % humedad).

B- los queratinocitos primarios

Se utilizaron queratinocitos humanos normales recién aislados. Los queratinocitos humanos se obtuvieron a partir de una biopsia de prepucio (restos quirúrgicos, Pabellón T-Bis, Hospital Edouard Herriot). El medio de cultivo utilizado fue el medio definido para el cultivo de los queratinocitos KGM-2 (que contiene: extracto de pituitaria bovina 35 mg, hEGF 10 ng/ml, insulina 5 µg/ml, hidrocortisona 0,5 µg/ml, transferrina 0,1 % epinefrina 0,1 %) fabricado por Clonetics y comercializado por Lonza (Bélgica) que contenía 0,15 mM de $CaCl_2$, pH 7,2 a 7,4.

Los queratinocitos se obtuvieron utilizando la técnica descrita por Boyce y Ham (Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum free-media, Tiss Cult. Meth. 1985, 9:83-93). Los trozos de piel, después de un enjuague a fondo en tampón PBS que contiene antibióticos, se liberan del tejido graso situado debajo de la dermis utilizando instrumentos estériles. A continuación, la piel se cortó en trozos de 3 mm^2 que se colocaron en una solución estéril de tripsina al 0,25 % en PBS durante 16 horas a 4 °C. La separación de la dermis/epidermis se realizó utilizando unas pinzas finas en una placa Petri que contiene medio de cultivo con el fin de detener la acción enzimática de la tripsina. Los fragmentos de epidermis se aspiraron y expulsaron varias veces con una pipeta para separar las células basales libres. La suspensión celular obtenida de este modo se centrifugó durante 5 min a 1000 revoluciones/min y el sedimento resultante se suspendió en un volumen conocido de KBM-2 para llevar a cabo un recuento de las células vivas con un colorante de exclusión: azul de tripano. Se sembraron $3x10^4$ células vivas por cm^2 en placas de cultivo de 25 cm^2 de tejido (Corning, Polylabo, Francia). Los queratinocitos se cultivaron a 37 °C en una incubadora de CO_2 (5 % de CO_2, 95 % de aire y 98 % de humedad). El medio se cambió cada dos días. El subcultivo tuvo lugar cuando las células alcanzaron la sub-confluencia. A continuación, el tapiz celular se lavó con PBS, a continuación, se recubrió con una solución de tripsina-EDTA (0,05 hasta 0,02 %). Después de una corta incubación a 37 °C, las células se separaron del soporte plástico. Después, las células se sembraron en placas de cultivo de 75 cm^2. La congelación de las células (3 a 5 millones por ampolla) se realizó en el medio de cultivo utilizado en presencia de 10 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y 20 % de suero de ternera 20 % en un volumen de 1 ml.

C - los fibroblastos primarios C

Se utilizaron fibroblastos humanos normales recién aislados. Se obtuvieron de biopsias de prepucio utilizadas para la obtención de los queratinocitos. El medio de cultivo utilizado fue DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal y glutamina 2 mM. Cuando se produjo la separación dermis/epidermis, se colocaron fragmentos de dermis durante varios días en placas de Petri en presencia de DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal y glutamina 2 mM a 37 °C en una incubadora con CO_2 (5 % de CO_2, 95 % de aire y 98 % de humedad). El

medio se cambió cada dos días. Cuando los fibroblastos salieron de los explantes dérmicos y colonizaron la placa Petri, se desprendieron de la placa con tripsina y se amplificaron de acuerdo con técnicas estándar de cultivo celular.

4) Análisis cuantitativo de las propiedades de adhesión celular del péptido de interés mediante un ensayo colorimétrico:

- Preparación de los sustratos de adhesión

Los péptidos, la proteína LG4/5 purificada (Belin y Rousselle, 2007) y la LN332 purificada (Rousselle et al., 1991) se utilizaron en los experimentos de adhesión celular. Se realizó una serie de 7 concentraciones decrecientes por dilución sucesiva en PBS (solución salina tamponada con fosfato, KH_2PO_4 1,54 mM; Na_2HPO_4 1,42 mM; NaCl 131 mM) o tampón de inmovilización Na_2CO_3 20 mM pH 9 a partir de una solución de partida a 1 mg/ml. Estas soluciones se distribuyeron inmediatamente sobre las placas de cultivo de 96 pocillos (Greiner, Dutscher, Brumath, Francia) a razón de 100 µl por pocillo. Otras proteínas de la matriz, colágeno I bovino (Symatèse Biomatériaux), colágeno IV humano, fibronectina y laminina 1 humanas (BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia) se prepararon en PBS y se distribuyeron en placas de 96 pocillos (Corning, Amsterdam, Países Bajos). Las placas se colocaron a continuación a +4 °C durante 16 a 18 horas. Las soluciones se extrajeron a continuación, girando las placas y cada pocillo se saturó con una solución de PBS-SAB al 1% (albúmina de suero bovino). Tres pocillos adicionales sin sustrato se sometieron al mismo tratamiento, los cuales sirvieron de blanco.

Los experimentos de comparación de la adhesión inducida por los péptidos KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y NSFMALYLSKGR (SEQ ID 21) se llevaron a cabo usando placas de 96 pocillos Microlon (Greiner, Dutscher) sobre los cuales se inmovilizaron los dos péptidos con la misma eficiencia. La dosificación de la cantidad de péptido inmovilizado se llevó a cabo con ácido bicinconínico (BCA Protein Assay, Perbio Science, Brebière, Francia).

- Ensayo de adhesión celular

Las células se desprendieron de las placas de cultivo con una solución de PBS/EDTA 10 mM, a continuación se suspendieron en medio DMEM sin aditivos para las líneas celulares KBM-2 sin aditivos para queratinocitos humanos. El número de células sembradas por pocillo se indica en los gráficos ($5x10^4$ a 10^5 células por pocillo).

- Evaluación de la prueba de adhesión celular

Después de la siembra de células, las placas de múltiples pocillos se colocaron en una incubadora a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO_2. Después de la incubación durante 30 a 60 minutos, se observan las células en un microscopio de contraste de fases para asegurar que la prueba se lleva a cabo correctamente. El medio de adhesión se retiró y cada pocillo se lavó con una solución estéril de PBS para eliminar las células que no se han adherido. Las células restantes, adherentes al sustrato, se fijaron usando una solución de glutaraldehído al 1 % en PBS durante 15 minutos. La solución de glutaraldehído se retiró y las células fueron teñidas con una solución de cristal violeta diluida al 1 % en agua destilada durante 30 minutos. Después de un extenso lavado con agua, las células se permeabilizaron con una solución de tritón al 0,02 % durante 15 minutos para solubilizar el cristal violeta. La lectura de absorbancia se realizó a 570 nm usando un lector de placas ELISA-Reader (MR500, Dynatech, Guernsey Chanel, Islandia). Cada punto experimental se realizó por triplicado. El valor del blanco representa la media de absorbancia de 3 pocillos de control (SAB). Esta se resta de cada uno de los valores de densidad óptica obtenidos para los puntos experimentales. A continuación, se calculó la media de los tres valores para cada triplicado de absorbancia.

Los resultados se representan como una curva, en el eje de ordenadas los valores de absorbancia, y la abscisa, las diferentes concentraciones de sustrato. Las células adheridas fueron fotografiadas con microscopio de contraste de fase.

5) Pruebas de inhibición de la adhesión celular por análisis de la competencia

Las placas de 96 pocillos se recubrieron con las cantidades indicadas de péptido KKLRIKSKEK o de laminina 332 por adsorción a +4 °C durante 16 a 18 horas. Al igual que antes, los pocillos se saturaron con una solución de PBS-SAB al 1 % durante una hora. Las células HT1080 se desprendieron de las placas de cultivo y después se suspendieron en medio DMEM sin suero. Después del recuento celular, se añadió la proteína LG4/5 completa o el péptido a la suspensión de células 30 minutos antes de la prueba de adhesión. Se utiliza sistemáticamente un competidor sin control y se le considera como el 100 % de adhesión. En el caso de la inhibición por el anticuerpo anti-LG4/5, este último se aplicó a las proteínas inmovilizadas durante una hora después de la saturación con una solución de PBS-SAB al 1 %.

6) Prueba de viabilidad celular

El efecto del péptido sobre la viabilidad celular se analizó utilizando un ensayo colorimétrico (Cell Proliferation Kit XTT, Roche Diagnostics, Meylan, Francia) en queratinocitos humanos normales. Se realizó en paralelo un control

con la proteína LG4/5 de longitud completa. La reacción química de la prueba se basa en la producción de NADPH por las células vivas que permite la reducción de las sales de tetrazolio XTT amarillas a las sales de formazan de color naranja. La medición de la absorbancia se realiza a 490 nm usando un lector de placas ELISA-Reader. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10.000 células por pocillo (6 pocillos/condición) en medio de cultivo KBM-2. Después de 24 horas de cultivo a 37 °C en presencia de 5 % de CO_2, los medios de cultivo se retiraron y se reemplazaron con medio libre de suero que contiene las cantidades de péptido o de proteína que se muestran en las gráficas y el reactivo de ensayo. Las placas se colocaron a continuación en una incubadora a 37 °C y se tomaron lecturas de absorbancia a 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas y 5 horas. Se utilizaron controles sin péptidos en la misma placa. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad de las células colocadas en presencia del péptido o proteína en comparación con controles sin péptido o proteína. En este caso, la viabilidad celular se calculó según la fórmula:

% de viabilidad = (Abs. de células con péptido / Abs. de células control) x 100

7) Experimento de cromatografía de afinidad y detección de sindecano-1

Para identificar la naturaleza del receptor celular que se une al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1), se llevaron a cabo experimentos de cromatografía de afinidad o “pull-down” incubando perlas recubiertas con péptidos con lisados celulares. Los lisados de queratinocitos o fibroblastos primarios se llevaron a cabo utilizando un tampón de lisis de 1 % de Triton X-100 en PBS, pH 7,5, que contenía N-etilmaleimida y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 50 mM. El péptido silvestre KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y los péptidos mutados se acoplan a la biotina en su extremo amino terminal y 100 µg de cada péptido biotinilado se unió a perlas de neutravidina-agarosa (Perbio Science, Bezons, Francia) por incubación durante 16 horas a +4 °C. Las perlas se incubaron después con 2 mg de lisado celular durante 2 horas a +4 °C. Después de tres lavados con 2 mg de tampón de lisis, las perlas se transfirieron a un tampón de digestión (acetato de sodio 20 mM, $CaCl_2$ 5 mM, pH 7,0) que contiene 8 mU/ml de heparitinasa I y 50 mU/ml de condroitinasa ABC (Seikagaku America, Fogger, Paris, Francia) durante 2 horas a 25 °C. Este tratamiento permite eliminar la parte proteica del sindecano-1 de los glicosaminoglicanos, lo que facilita el análisis por inmunotransferencia. Las muestras se analizaron a continuación mediante electroforesis SDS PAGE en un gel de 8 % de acrilamida, en condiciones no reductoras y se analizaron después por inmunotransferencia con el anticuerpo anti-sindecano H174 (Santa Cruz Biotechnology, Le Perray en Yvelines, Francia).

8) Videomicroscopía en tiempo real en células vivas (Lapso de tiempo)

Los experimentos de videomicroscopía se realizaron con un microscopio Axiovert 100M Zeiss equipado con una cámara CCD (1 imagen cada 10 minutos o cada hora). En los experimentos de la Figura 11, se analizaron los movimientos de 100 células con el software Metaview (Roper Scientific, Princeton Instruments, Evry, Francia).

9) Cicatrización *in vivo*

Se realizaron heridas cutáneas de 12 cm de longitud, 8 cm de anchura y 0,9 mm de profundidad usando un dermatomo en el lomo de 2 hembras de cerdo para charcutería de aproximadamente 4 meses (2 heridas control y 4 heridas tratadas por cerdo, a ambos lados de la columna vertebral). Se aplicaron dos concentraciones de péptido, 20 µg/ml (cerdo 1) y 50 µg/ml (cerdo 2) y una solución de PBS (controles) a las heridas en el primer día y en cada cambio de apósito (D1, D2, D4, D7 y D11). El análisis clínico fue seguido por la toma de fotografías y se realizaron biopsias cutáneas. La evaluación de la zona epitelializada se llevó a cabo en las fotos del día 7 utilizando el software Adobe Photoshop CS3 Extended (versión 10.0). El experimento se llevó a cabo en el Instituto Claude Bourgelat Campus de Veterinaria de Lyon (VetAgro Sup) y el protocolo fue aprobado por el comité de ética de la escuela veterinaria VetAgro Sup.

Resultados:

a/ Estudio de la adhesión de los queratinocitos humanos normales y de las células HT1080 al fragmento LG4/5 y al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1)

Como se muestra en la Figura 3, el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) induce la adhesión celular de las células HT1080 y de los queratinocitos humanos normales de manera dependiente de la dosis. Un experimento de control de la adhesión se llevó a cabo con las mismas células en el fragmento LG4/5 entero purificado para demostrar la adhesión dependiente de sindecano-1 y comparar la morfología celular obtenida entre el fragmento LG4/5 entero y la secuencia peptídica de interacción de sindecano-1. Las células están firmemente ancladas al péptido ya que resistieron, de manera comparable al fragmento LG4 5 entero, a los diversos lavados antes de la fijación. Se obtuvo el máximo de la adhesión celular cuando se añadió una cantidad media de 10 microgramos de péptido a los pocillos para la inmovilización. El perfil de la adhesión de los dos tipos de células HT1080 y NHK es idéntico al del péptido de interés. Esta experiencia es cualitativa y se llevó a cabo para analizar el comportamiento de las células en contacto con el péptido. Las concentraciones inductoras de la adhesión son por lo tanto indicativas puesto que (1) no tienen en cuenta la cantidad real de péptido inmovilizado en los pocillos y (2) dependen de la cantidad de células añadidas a cada pocillo. Estas observaciones indican que las cantidades anunciadas son exageradas y que cantidades más

pequeñas podrían tener un efecto inductor de la adhesión celular dependiente de sindecano-1. De hecho, se utilizó deliberadamente un número relativamente pequeño de células en este experimento con el fin de demostrar el efecto dosis-respuesta y para analizar la morfología de las células individuales. Una capa celular demasiado confluente impediría esta observación. Las imágenes obtenidas con el microscopio de contraste de fase mostraron que las células HT1080 y los queratinocitos adheridos al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) tienen la misma morfología que las células adheridas al fragmento LG4/5 entero. Esto indica que el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) es capaz de inducir las propiedades de adhesión mostradas por el fragmento LG4/5 entero. Como se describe detalladamente en las publicaciones del solicitante, la adhesión a LG4/5 induce la propagación de células en forma de extensiones citoplasmáticas protruyentes de tipo filopodios (Décline et al., 2003, Okamoto et al., 2003, Bachy et al., 2008, Sulka et al., 2009). Estas estructuras asociadas con el citoesqueleto de actina intervienen en el proceso de migración celular.

Para confirmar que el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) corresponde a la secuencia responsable de la adhesión celular en el fragmento LG4/5, se han llevado a cabo experimentos de competición preincubando las células con el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) antes de hacerlas adherirse al fragmento LG4/5 (Figura 4). En este experimento, la adhesión celular se ensayó también en LN332 para asegurar la especificidad del efecto del péptido sobre la proteína LG4/5 y no en otras proteínas de la matriz. Un control positivo y específico de la inhibición de la adhesión a LG4/5 se realizó con un anticuerpo policlonal anti-LG4/5 que habíamos caracterizado como bloqueo de la función de LG4/5. La proteína LG4/5 entera se ha utilizado igualmente como control positivo en este experimento. Así, las células HT1080 fueron utilizadas, tal cual, o preincubadas con la proteína LG4/5 entera o con el péptido. A continuación, se depositaron sobre los sustratos LG4/5 y LN332 para el experimento de adhesión. Como era de esperar, nuestro anticuerpo anti-LG4/5 inhibió la adhesión al fragmento LG4/5 sin alterar la adhesión a LN332. El fragmento LG4/5 en solución también bloqueó, fijándose a través del sindecano-1 de las células, la adhesión al fragmento LG4/5 inmovilizado sin perturbar la adhesión a LN332. El péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) en solución, también bloqueó completamente la adhesión de las células al fragmento LG4/5 y no afectó a la adhesión a LN332. Este resultado muestra que el péptido fue capaz por sí mismo de unirse al receptor implicado en la adhesión al fragmento LG4/5. El hecho de que no inhibiese la adhesión a LN332 confirma la especificidad de su actividad en el fragmento LG4/5. Estos resultados muestran que la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) representa la secuencia responsable de la adhesión dependiente de sindecano-1 sobre el fragmento LG4/5. También muestran que el fragmento LG4/5 o el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) en forma soluble, tienen la capacidad de interactuar con las células y de unirse al receptor de sindecano-1. Esto indica que estas proteínas también podrían activar las vías de señalización dependientes de sindecano-1 cuando están en forma soluble.

<u>b/ Demostración de la unión específica del sindecano-1 al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) por cromatografía de afinidad</u>

Para demostrar que el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) es el sitio de interacción del sindecano-1 sobre el fragmento LG4/5, se llevaron a cabo experimentos de cromatografía de afinidad fijando el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) asociado con biotina sobre perlas de estreptavidina. El péptido así expuesto al péptido a la superficie de las perlas sirve como un gancho molecular para atrapar su receptor en una muestra de los queratinocitos humanos normales. En este experimento, las otras dos secuencias identificadas en el fragmento LG4/5 implicadas en la unión a la heparina (PSGKPKSLP (SEQ ID 19) y TSVTPKQSL (SEQ ID 20), Vives et al., 2003) también fueron biotiniladas y probadas. Se prepararon homogeneizados de queratinocitos primarios y las perlas recubiertas con diferentes péptidos se incubaron con cantidades equivalentes de estos lisados (Figura 5A). Las proteínas unidas a las perlas se analizaron a continuación mediante electroforesis SDS-PAGE seguido de inmunodetección para determinar su contenido de sindecano-1. Como se muestra en la Figura 5A, solo el extracto de proteína fijada sobre las perlas recubiertas de péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (carril 2) tiene una proteína reconocida por el anticuerpo anti-sindecano-1. Las perlas no recubiertas con el péptido (control negativo, carril 1), así como las perlas recubiertas con los otros dos péptidos (carriles 3 y 4) no retienen el sindecano-1. Para confirmar la identidad de la proteína asociada al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) como sindecano-1, el experimento se repitió utilizando el fragmento LG4/5 entero como control positivo (Figura 5B). En este caso, la proteína purificada por el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (carril 3) corresponde al sindecano-1, ya que corresponde a la proteína purificada con el fragmento LG4/5 entero (carril 2). Las perlas no recubiertas de péptido no mostraron la unión no específica (carril 1). Estos resultados muestran que el sindecano-1 es un receptor específico del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) de una manera comparable al fragmento LG4/5 entero.

<u>c/ Adhesión de las células HT1080 a los péptidos KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y NSFMALYLSKGR (SEQ ID 21) (descrito en JP2006063033).</u>

Para un enfoque basado en la producción de péptidos que recubren secuencialmente la totalidad de la secuencia de los módulos LG4/5, se ha identificado otra secuencia como inductora de la adhesión celular (Utani et al., 2001 y JP2006063033) a través de otros receptores como sindecano 2 o 4. Esta secuencia NSFMALYLSKGR (SEQ ID 21) (desde el resto 1412 hasta el resto 1423 de la secuencia de la cadena alfa 3) está localizada en el módulo de LG4. Para comparar la capacidad de inducir la adhesión celular del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) con esta secuencia peptídica, se ha llevado a cabo una prueba de adhesión de forma comparativa con las células HT1080 que expresan sindecano-1 (Figura 6). Ambos péptidos se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos y se cuantificó la cantidad de

péptido adsorbido para asegurar cantidades equivalentes de péptido en los dos casos. También se llevó a cabo una serie del péptido realmente inmovilizado comprendida entre 2 µg y 0,07 µg por pocillo. Después de separarse de las placas de cultivo en condiciones que conservan los sindecanos, se depositaron células HT1080 en pocillos que contenían ambos péptidos y se mantuvieron en contacto durante una hora en ausencia de suero (Figura 6A). El análisis cuantitativo de la adhesión celular demostró que el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) es más eficaz que el péptido NSFMALYLSKGR (SEQ ID 21) ya que (1) la adhesión celular se produjo en una cantidad de péptido inmovilizado más baja (del orden de 0,025 µg) y (2) la máxima adhesión celular obtenida a la bandeja es significativamente mayor (aproximadamente 200 %). Por otro lado, el análisis de la morfología celular muestra que si las células adheridas a KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) tienen una morfología típica de la adhesión dependiente de sindecano-1 al fragmento LG4/5 (véase la figura 3), la adhesión de las células NSFMALYLSKGR al péptido (SEQ ID 21) no va acompañada de la misma propagación celular puesto que hay una falta de extensiones citoplasmáticas (Figura 6B). Se ha descrito que la adhesión a este péptido implica a los sindecanos 2 y 4 (Utani et al., 2001). Esto sugiere que este péptido podría estar implicado en diversos procesos celulares a los descritos para el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1).

d/ Mutaciones

Con el objetivo de la caracterización de la actividad del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1), se ha evaluado la importancia de varios aminoácidos en la interacción con sindecano-1 mediante la realización de una serie de sustituciones de estos aminoácidos. Este trabajo también tiene como objetivo identificar los restos esenciales para la actividad del péptido. En una primera etapa, y para no provocar nada más que un mínimo de alteraciones estructurales del péptido, cada uno de los aminoácidos de la secuencia de KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) se sustituyeron secuencialmente con un aminoácido neutro, alanina (A) (Figura 7). Los experimentos de reclutamiento de sindecano-1 con esta serie de péptidos mutados muestran que la sustitución individual de tres restos es suficiente para inhibir la interacción con el sindecano-1. Estos restos son el aminoácido 1: una lisina (K), el amino ácido 4: una arginina (R) y el aminoácido 7: una serina (S). Obsérvese la presencia de 5 restos de lisina en la secuencia del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1), y sólo la mutación de la primera causó una pérdida completa de la actividad de interacción del péptido. Esto indica que la actividad de cada uno de los otros restos de lisina se compensó al interactuar con el sindecano-1. Para caracterizar adicionalmente el papel de estos restos de lisina en la secuencia del péptido, la carga de cada uno de estos restos se ha cambiado, y se analizó el impacto de este cambio en la unión al sindecano-1. Para este propósito, estos aminoácidos fueron sustituidos por una glutamina (Q), un aminoácido neutro a pH fisiológico (Figura 8). Estas mutaciones eran puntuales (un solo aminoácido sustituido) o reagrupadas (2 o 3 sustituciones simultáneas).

e/ Secuencias homólogas

Se han llevado a cabo búsquedas de homología de la secuencia de KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) en las proteínas de la matriz extracelular para identificar un homólogo potencial que tenga propiedades de unión al sindecano-1 y para garantizar la especificidad de la actividad de esta secuencia. Las 4 proteínas de la matriz extracelular identificadas que tienen una secuencia homóloga a la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) de la cadena alfa3 de la laminina humana son la cadena alfa3 de la laminina murina (M2), las cadenas alfa4 de la laminina humana (M1) y murina (M1) y la proteína transmembrana ADAM 20 (M3) (Figura 9A). Todas estas secuencias se ensayaron para determinar su capacidad para unirse al sindecano-1 y sólo las secuencias de la laminina alfa3 y alfa 4 humanas y murinas se ha observado que son capaces de unirse al sindecano-1, mientras que la secuencia de la proteína ADAM 20 ha sido inactiva (Figura 9C). Todos estos resultados muestran que la secuencia de unión al sindecano-1 presente en la cadena alfa3 de la laminina humana se conserva en el ratón. Además, se observa que hay una secuencia homóloga en la cadena alfa4 de la laminina. El hecho de que la secuencia en la proteína ADAM 20 no se una al sindecano-1 apoya el carácter de especificidad y singularidad de la secuencia presente en las lamininas. Para apoyar las posibilidades de sustitución de unos pocos restos, se realizaron búsquedas de homología en fragmentos de la secuencia del péptido y las secuencias identificadas se han sustituido en el marco alrededor del péptido entero (Figura 9B). En particular, se han identificado sustituciones del aminoácido 5 (isoleucina, M4 a M7) y del aminoácido 7 (serina, M8 y M9). En la Figura 9C se observa que ninguna de estas mutaciones dio como resultado la inhibición de la interacción.

f/ Viabilidad celular

Finalmente, para asegurar que el péptido no tiene actividad tóxica para los queratinocitos, se realizó una prueba de viabilidad celular utilizando una serie de péptidos en una concentración que variaba de 100 a 1 µg/ml. Un control con la proteína LG4/5 entera se llevó a cabo en paralelo (Figura 10). Los queratinocitos se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10^4 células por pocillo. Después de 24 horas, los medios de cultivo se retiraron y se reemplazaron con medio KBM-2 que contiene las cantidades de péptido (curva rosa) o de proteína LG4/5 (curva azul) indicadas en los gráficos. Después de dos días a 37 °C, esta etapa se repitió dos veces y la cuantificación de las células vivas se realizó con el reactivo de la prueba XTT. Los resultados, presentados como el porcentaje de viabilidad de las células colocadas en presencia del péptido o de la proteína LG4/5 en comparación con los controles, demuestran que ni el péptido KKLRIKSKEK ni la proteína LG4/5 tienen actividad citotóxica a largo plazo en los queratinocitos epidérmicos.

g/ Inducción de la migración celular

El efecto de la contribución del fragmento LG4/5 entero o de la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) en forma soluble en el medio de cultivo de queratinocitos humanos normales se analizó por videomicroscopía en tiempo real en células vivas. En primer lugar, la observación de los queratinocitos durante 5 horas ayudó a resaltar diferencias significativas ya sea en presencia o ausencia del péptido. Los queratinocitos normales mantenidos en el medio de cultivo convencional efectuaron movimientos circulares permanentes de pequeña amplitud cuya distancia total nunca excedió de 40 µm (Figura 11A). La adición de la proteína LG4/5 o del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) en el medio de cultivo induce un cambio drástico en el comportamiento (Figura 11B y C). En ambos casos, los movimientos circulares de los queratinocitos fueron reemplazados por movimientos lineales aleatorios cuya distancia (en relación con el origen) podría llegar a 150 µm. Estos resultados muestran que el fragmento LG4/5 induce la migración celular cuando se une a las células. El péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) es capaz de reproducir la actividad del fragmento LG4/5. Si la adhesión al fragmento LG4/5 juega un papel importante en la migración celular inducida por la pre-LN332, este mismo fragmento LG4/5 (o su secuencia mínima KKLRIKSKEK (SEQ ID 1)) es capaz por sí sola de inducir la migración celular.

En una segunda etapa, se analizó el efecto del fragmento LG4/5 y del péptido sobre el cierre de una herida hecha en el centro de un tapiz de queratinocitos confluentes (Figura 12). Como en las lesiones *in vivo*, el cierre se lleva a cabo en este modelo mediante la migración y la proliferación de los queratinocitos situados en los bordes de la herida. En condiciones controladas (medio de cultivo solamente) la herida se cierra gradualmente y las mediciones mostraron que las células habían cubierto el 43 % de la superficie de la herida después de 24 h y 62 % después de 48 horas. Cuando se añadió la proteína LG4/5 al medio de cultivo, las células cubrieron un 65 % de la superficie a las 24 h y un 91 % a las 48 h, lo que indica que este dominio de la laminina 332 acelera el proceso de cierre de la herida. Este efecto se ha visto incluso amplificado con el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) ya que el cierre de la herida a las 24 h fue del 72 % h y del 96 % a las 48 h (Figura 12A y B). El presente péptido tiene propiedades de inducción de la cicatrización cutánea.

La hipótesis según la cual el péptido presenta propiedades de inducción de la cicatrización cutánea ha sido verificada por el estudio de la eficacia del péptido en la epitelización de las heridas superficiales de la piel en un modelo experimental en cerdos (Figura 15). El tejido de la piel de cerdo tiene características similares a las de la piel humana. La aplicación de péptido en las heridas de 0,9 mm de profundidad ha promovido el cierre de la herida (Figura 15A). De hecho, en condiciones controladas (uso de PBS), la herida se cerró progresivamente y las mediciones mostraron que el epitelio había cubierto el 65 % de la superficie de la herida 7 días después de la lesión. Cuando la herida se ha tratado con el péptido (20 mg/ml o 50 g/ml), el porcentaje de reepitelización de la herida fue casi total en el séptimo día ya que alcanza el 96 % de la superficie total. Este experimento muestra que el péptido acelera el proceso de cierre de las heridas *in vivo*. La observación macroscópica de las heridas después del cierre completo (día 11, Figura 15 A) revela, después del tratamiento con el péptido, un tejido cutáneo homogéneo y sano que tiene propiedades idénticas a las del tejido adyacente a la zona reparada, mientras que aparece aún frágil y contusionado en el caso del control. Estos resultados indican que la piel reparada aparece más firme y mejor cuando se trataba con el péptido.

h/ Efecto del péptido sobre la adhesión celular a la matriz extracelular

Con el fin de analizar el efecto del péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) en el contexto de la matriz extracelular dérmica, hemos realizado experimentos de adhesión a estas proteínas de la matriz en presencia del péptido en forma soluble o bien co-inmovilizado con estas proteínas. Las proteínas de la matriz ensayadas (colágeno I, colágeno IV, fibronectina, laminina 111 y laminina 332) son ampliamente conocidas por inducir la adhesión de células cutáneas a través de receptores de la familia de las integrinas. Para analizar el efecto del péptido sobre la adhesión celular a las proteínas de la matriz, el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) se puso en contacto con células HT1080, previamente disociadas por EDTA, antes de ser depositadas sobre los sustratos de matriz (Figura 13A). El análisis de la adhesión obtenida con las células controladas (sin péptido, barras grises) y con las células tratadas con el péptido (barras negras) con diferentes proteínas de la matriz ha permitido poner de relieve un aumento de la adhesión del 20 al 50 %, dependiendo de las proteínas. Este efecto fue aún más marcado cuando el péptido fue co-inmovilizado con estas proteínas (Figura 13B), puesto que se observó un rango del 20 al 150 % de aumento en la adhesión. Todos estos resultados indican que el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) potencia la adhesión de las células HT1080 a las proteínas de la matriz extracelular. El péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) puede aumentar la afinidad de las células por las proteínas de la matriz extracelular y por lo tanto permitir una mejor comunicación con el microambiente.

i/ Estudio de la adhesión de los fibroblastos humanos normales al fragmento LG4/5 y al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1)

Para demostrar que los fibroblastos dérmicos expresan sindecano-1 y que este puede interactuar con el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1), se llevó a cabo un experimento de cromatografía de afinidad para el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) con un lisado de fibroblastos humanos normales (Figura 14A). Se realizó un experimento de control con queratinocitos primarios. Las proteínas unidas a las perlas se analizaron a continuación mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de inmunodetección para determinar su contenido de sindecano-1. Como se

muestra en la figura 14A, el sindecano-1 se expresa por los fibroblastos y se une al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1). Los experimentos de adhesión celular muestran que los fibroblastos dérmicos humanos se adhieren al dominio LG4/5 entero y al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) (Figura 14B). Como se muestra en la Figura 14C, el péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) indujo la adhesión de los fibroblastos humanos normales de una manera dependiente de la dosis. Se obtuvo el máximo de adhesión celular cuando se añadió una cantidad media de 5 microgramos de péptido a los pocillos para la inmovilización. Los fibroblastos adheridos al péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) y al fragmento LG4/5 presentan una morfología extendida con presencia de procesos citoplásmicos (resultados no mostrados). El péptido KKLRIKSKEK (SEQ ID 1) interactúa con los fibroblastos dérmicos y representa un sustrato de adhesión para su anclaje al microentorno de la matriz y a su propagación, condiciones favorables para la reparación y regeneración tisulares.

Bibliografía

Amano S, Scott IC, Takahara K, Koch M, Champliaud MF, Gerecke DR, Keene DR, Hudson DL, Nishiyama T, Lee S, Greenspan DS, and Burgeson RE. (2000) J. Biol. Chem. 275, 22728-22735.

Aumailley M, Gimond C, and Rousselle P. (1996) Integrin-mediated cellular interactions with laminins. In 'The laminins" Eds. P. Ekblom, R. Timpl, Harwood Academic Publishers, pp 127-158.

Aumailley M, and Rousselle P. (1999) Laminins of the dermo-epidermal junction. Matrix Biol., 18 :19-28.

Bachy S, Letourneur F, and Rousselle P. (2008) Syndecan-1 interaction with the LG4/5 domain in laminin-332 is essential for keratinocyte migration. J Cell Physiol., 214 :238-249.

Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, Andreason GL, Frasier F, Plopper G, Quaranta V, and Jones JC. (1996) J. Cell Sci. 109, 2509-2520.

Belin V, and Rousselle P. (2006) Production of a recombinantly expressed laminin fragment by HEK293-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis-based bioreactor. Protein Expr. Purif. 48:43-48.

Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, and Zako M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Ann. Rev. Biochem. 68, 729-777.

Clark RAF. (1996). Wound repair : overview and general considerations. In : The molecular and cellular biology of wound repair. Clark R.A.F, Editor. Plenum Press/New York. 3-50.

Decline F, and Rousselle P. (2001). Keratinocyte migration requires alpha2betal integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. J. Cell Sci. 114:811-823.

Decline F, Okamoto O, Mallein-Gerin F, Helbert B, Bernaud J, Rigal D, Rousselle P. (2003). Keratinocyte motility induced by TGF-betal is accompanied by dramatic changes in cellular interactions with laminin 5. Cell Motil. Cytoskeleton 54:64-80.

Elenius K, Vainio S, Laato M, Salmivirta M, Thesleff I and Jalkanen M. (1991) Induced expression of syndecan in healing wounds. J. Cell Biol. 114:585-595.

Frank DE and Carter WG. (2004). Laminin 5 deposition regulates keratinocyte polarization and persistent migration. J. Cell Sci. 117:1351-1363.

Gallo R, Kim C, Kokenyesi R, Adzick NS and Bernfield M. (1996) Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. J. Invest. Dermatol. 107:676-683.

Ghohestani RF, Li K, Rousselle P, and Uitto J. (2001) Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. Clin. Dermatol., 19:551-562.

Goldfinger LE, Hopkinson SB, deHart GW, Collawn S, Couchman JR, and Jones JC. (1999) The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. J. Cell Sci. 112:2615-2629.

Goldfinger LE, Stack MS, and Jones JC. (1998) Processing of laminin-5 and its functional consequences: role of plasmin and tissue-type plasminogen activator. J. Cell Biol. 141: 255-265.

Hynes RO. (1992) Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69:11-25.

Jaakkola P, Kontusaari S, Kauppi T, Maata A, and Jalkanen M. (1998) Wound reepithelialization activates a growth factor-responsive enhancer in migrating keratinocytes. FASEB J 12: 959-969.

Lampe PD, Nguyen BP, Gil S, Usui M, Olerud J, Takada Y, and Carter WG. (1998) Cellular interaction of integrin alpha3betal with laminin 5 promotes gap junctional communication. J. Cell Biol. 143,1735-1747.

Larjava H, Salo T, Haaspasalmi K, Kramer RH, Heino J. (1993) Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. J. Clin. Invest. 92:1425-1435.

Marinkovich MP, Lunstrum GP, and Burgeson RE. (1992) The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. J. Biol. Chem. 267, 17900-17906.

Masuda R, Mochizuki M, Hozumi K, Takeda A, Uchinuma E, Yamashina S, Nomizu M, Kadoya Y. (2009) A novel cell-adhesive scaffold material for delivering keratinocytes reduces granulation tissue in dermal wounds. Wound Repair Regen. 17:127-135.

Nguyen BP, Ryan MC, Gil SG and Carter WG. (2000) Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. Curr. Opin. Cell Biol. 12:554-562.

Niessen CM, Hogervorst F, Jaspars LH, de Melker AA, Delwel GO, Hulsman EH, Kuikman I and Sonnenberg A. (1994) The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. Exp Cell Res 211:360-367.

Okamoto O, Bachy S, Odenthal U, Bernaud J, Rigal D, Lortat-Jacob H, Smyth N and Rousselle P. (2003) Normal human keratinocytes bind to the alpha3LG4/5 domain of unprocessed laminin-5 through the receptor syndecan-1. J. Biol. Chem. 278:44168-44177.

Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P and Larjava H. (1995) Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. J. Histochem. Cytochem. 43:125-135.
Rousselle P, Aumailley M. (1994) Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. J. Cell Biol. 125: 205-214.
Rousselle P, Keene DR, Champliaud MF, Van der Rest M, and Burgeson R.E. (1997) Laminin 5 binds type VII collagen thru its NC1 domain. J. Cell Biol. 138:719-728.
Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR, and Burgeson RE. (1991) Kalinin : an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. J. Cell Biol. 114:567-576.
Ryan MC, Lee K, Miyashita Y, and Carter WG. (1999) Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. J. Cell Biol. 145:1309-1323.
Ryan MC, Tizard R, VanDevanter DR and Carter WG. (1994) Cloning of the LamA3 gene encoding the alpha 3 chain of the adhesive ligand epiligrin. Expression in wound repair. J. Biol. Chem. 269:22779-22787.
Sigle RO, Gil SG, Bhattacharya M, Ryan MC, Yang TM, Brown TA, Boutaud A, Miyashita Y, Olerud J, and Carter WG. 2004. Globular domains 4/5 of the laminin alpha3 chain mediate deposition of precursor laminin 5. J. Cell Sci. 117:4481-4494.
Sonnenberg A, de Melker AA, Martinez de Velasco AM, Janssen H, Calafat J, and Niessen CM. (1993) Formation of hemidesmosomes in cells of a transformed murine mammary tumor cell line and mechanisms involved in adherence of these cells to laminin and kalinin. J. Cell Sci. 106:1083-1102.
Stepp MA, Gibson HE, Gala PH, Iglesia DD, Pajoohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Brown M, Aquino C, Schwartz AM, Goldberger O, Hinkes MT and Bernfield M. (2002) Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. J. Cell Sci. 115, 4517-4531.
Sulka B, Lortat-Jacob H, Terreux R, Letourneur F, and Rousselle P. (2009) Tyrosine déphosphorylation of the syndecan-1 PDZ binding domain regulates syntenin-1 recruitment. J. Biol. Chem. Feb 19.
Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, and Hohenester E. (2000) Structure and function of laminin LG modules. Matrix Biol., 19:309-317.
Tisi D, Talts JF, Timpl R, a,d Hohenester E. Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin alpha2 chain harbouring binding sites for alpha-dystroglycan and heparin. Embo J. 2000, 19: 1432-1440.
Tunggal L, Ravaux J, Pesch M, Smola H, Krieg T, Gaill F, Sasaki T, Timpl R, Mauch, C and Aumailley M. (2002) Defective laminin 5 processing in cylindroma cells. Am. J. Pathol. 160:459-468.
Utani A, Nomizu M, Matsuura H, Kato K, Kobayashi T, Takeda U, Aota S, Nielsen PK and Shinkai H. (2001) A unique sequence of the laminin alpha 3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4. J. Biol. Chem. 276:28779-28788.
Vivès R, Crublet E, Andieu JP, Gagnon J, Rousselle P, and Lortat-Jacob H. (2004) A novel strategy for defining critical amino acid residues involved in protein/glycosaminoglycan interactions. J. Biol. Chem., 279:54327-54333.
Woods, A, and Couchman JR. (2000) Integrin modulation by lateral association. J. Biol. Chem. 275, 24233-24236.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SYMATESE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

<120> NUEVO PÉPTIDO PROMOTOR DE LA ADHESIÓN CELULAR

<130> S283-B-25332PCT

<150> FR 09/01168
<151> 13-03-2009

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> T+

<400> 1

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)(6)(8)(10)
<223> puede sustituirse con otros, restos independientemente positivos, siendo posiblemente uno un resto neutro

<220>
<221> variación
<222> (3)..(3)
<223> puede sustituirse con otros, independientemente neutros

<220>
<221> variación
<222> (5)..(5)
<223> puede sustituirse con otros, independientemente neutros

<220>
<221> variación
<222> (7)..(7)
<223> puede sustituirse con otros, independientemente neutros, pero no alanina

<220>
<221> variación
<222> (9)..(9)
<223> puede sustituirse con otros, independientemente neutros o negativos

<220>
<223> A2

<400> 2

Lys Ala Leu Arg Ile Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> A3

<400> 3

Lys Lys Ala Arg Ile Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

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

<220>
<223> A5

<400> 4

Lys Lys Leu Arg Ala Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> A6

<400> 5

Lys Lys Leu Arg Ile Ala Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> A8

<400> 6

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ser Ala Glu Lys
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> A9

<400> 7

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ser Lys Ala Lys
1 5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> A10

<400> 8

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ser Lys Glu Ala
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M2

<400> 9

Lys Lys Leu Arg Leu Arg Ser Lys Glu Arg
1 5 10

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

<220>
<223> M4

<400> 10

Lys Lys Leu Arg His Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M5

<400> 11

Lys Lys Leu Arg Thr Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

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

<220>
<223> M6

<400> 12

Lys Lys Leu Arg Lys Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M7

<400> 13

Lys Lys Leu Arg Ser Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M8

<400> 14

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Leu Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M9

<400> 15

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Gln Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> U1

<400> 16

Lys Lys Leu Arg Ile Gln Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> U2

<400> 17

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ser Gln Glu Lys
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> U3

<400> 18

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ser Lys Glu Gln
1 5 10

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> heparina 1

<400> 19

Pro Ser Gly Lys Pro Lys Ser Leu Pro
1 5

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

<220>
<223> heparina 2

<400> 20

Thr Ser Val Thr Pro Lys Gln Ser Leu
1 5

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sindecano 2/4

<400> 21

Asn Ser Phe Met Ala Leu Tyr Leu Ser Lys Gly Arg
1 5 10

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> A1

<400> 22

Ala Lys Leu Arg Ile Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> A4

<400> 23

Lys Lys Leu Ala Ile Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> A7

<400> 24

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ala Lys Glu Lys
1 5 10

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

<220>
<223> U4

<400> 25

Lys Lys Leu Arg Ile Gln Ser Gln Glu Lys
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> U5

<400> 26

Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ser Gln Glu Gln
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> U6

<400> 27

Lys Lys Leu Arg Ile Gln Ser Lys Glu Gln
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> U7

<400> 28

Lys Lys Leu Arg Ile Gln Ser Gln Glu Gln
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> U8

<400> 29

Gln Gln Leu Arg Ile Lys Ser Lys Glu Lys
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> U9

<400> 30

Arg Ile Lys Ser Lys Glu Lys
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M1

<400> 31

Lys Lys Leu Lys Ile Arg Ser Gln Glu Lys
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M3

<400> 32

Phe Lys Lys Arg Thr Lys Ser Lys Glu Asp
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Péptido sintético que comprende o está constituido por la secuencia $Kaa_2aa_3Raa_5aa_6aa_7aa_8aa_9aa_{10}$ en la cual, a pH fisiológico:

- aa_2, aa_6, aa_8, aa_{10} son restos de carga positiva; a lo sumo uno de los cuales puede estar sustituido por un resto de carga neutra,
- aa_3 es un resto de carga neutra,
- aa_5 es un resto de carga neutra,
- aa_7 es un resto de carga neutra, a excepción de la alanina, y
- aa_9 es un resto de carga negativa o un resto de carga neutra,

siendo la secuencia capaz de unirse al receptor de sindecano-1,
a excepción de los péptidos que comprenden o están constituidos por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1).

2. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que comprende o está constituido por una secuencia seleccionada del siguiente grupo:

- KALRIKSKEK (SEQ ID 2)
- KKARIKSKEK (SEQ ID 3)
- KKLRAKSKEK (SEQ ID 4)
- KKLRIASKEK (SEQ ID 5)
- KKLRIKSAEK (SEQ ID 6)
- KKLRIKSKAK (SEQ ID 7)
- KKLRIKSKEA (SEQ ID 8)
- KKLRLRSKER (SEQ ID 9)
- KKLRHKSKEK (SEQ ID 10)
- KKLRTKSKEK (SEQ ID 11)
- KKLRKKSKEK (SEQ ID 12)
- KKLRSKSKEK (SEQ ID 13)
- KKLRIKLKEK (SEQ ID 14)
- KKLRIKQKEK (SEQ ID 15)
- KKLRIQSKEK (SEQ ID 16)
- KKLRIKSQEK (SEQ ID 17)
- KKLRIKSKEQ (SEQ ID 18).

3. Péptido sintético

- que contiene no más de 30 aminoácidos y que comprende o está constituido por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1), o
- que comprende o está constituido por la secuencia $Kaa_2aa_3Raa_5aa_6aa_7aa_8aa_9aa_{10}$, en la que, a pH fisiológico:

  - aa_2, aa_6, aa_8, aa_{10} son restos de carga positiva; a lo sumo uno de los cuales puede estar sustituido por un resto de carga neutra,
  - aa_3 es un resto de carga neutra,
  - aa_5 es un resto de carga neutra,
  - aa_7 es un resto de carga neutra, a excepción de la alanina y
  - aa_9 es un resto de carga negativa o un resto de carga neutra,

siendo la secuencia capaz de unirse al receptor de sindecano-1, a excepción de los péptidos que comprenden o están constituidos por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1)
para su utilización como medicamento.

4. Péptido para su utilización de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que contiene o está constituido por una secuencia seleccionada del siguiente grupo:

- KALRIKSKEK (SEQ ID 2)
- KKARIKSKEK (SEQ ID 3)
- KKLRAKSKEK (SEQ ID 4)
- KKLRIASKEK (SEQ ID 5)
- KKLRIKSAEK (SEQ ID 6)
- KKLRIKSKAK (SEQ ID 7)
- KKLRIKSKEA (SEQ ID 8)
- KKLRLRSKER (SEQ ID 9)
- KKLRHKSKEK (SEQ ID 10)

- KKLRTKSKEK (SEQ ID 11)
- KKLRKKSKEK (SEQ ID 12)
- KKLRSKSKEK (SEQ ID 13)
- KKLRIKLKEK (SEQ ID 14)
- KKLRIKQKEK (SEQ ID 15)
- KKLRIQSKEK (SEQ ID 16)
- KKLRIKSQEK (SEQ ID 17)
- KKLRIKSKEQ (SEQ ID 18).

5. Péptido para su utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 4, caracterizado por que se utiliza en la cicatrización de la piel.

6. Péptido para su utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 4, caracterizado por que se utiliza en la regeneración tisular.

7. Composición farmacéutica o cosmética que comprende un péptido sintético, donde dicho péptido:

- contiene no más de 30 aminoácidos y comprende o está constituido por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1), o
- comprende o está constituido por la secuencia $Kaa_2aa_3Raa_5aa_6aa_7aa_8aa_9aa_{10}$, en la que, a pH fisiológico:
  - aa_2, aa_6, aa_8, aa_{10} son restos de carga positiva; a lo sumo uno de los cuales puede estar sustituido por un resto de carga neutra,
  - aa_3 es un resto de carga neutra,
  - aa_5 es un resto de carga neutra,
  - aa_7 es un resto de carga neutra, a excepción de la alanina y
  - aa_9 es un resto de carga negativa o un resto de carga neutra,

siendo la secuencia capaz de unirse al receptor de sindecano-1, a excepción de los péptidos que comprenden o están constituidos por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1).

8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada por que se presenta en forma de una crema, un hidrogel, una solución, una formulación inyectable o un aerosol que comprende eventualmente queratinocitos autólogos o células mesenquimales.

9. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada por que se presenta en forma de un soporte sobre el que se injerta o se deposita, o dentro del cual se incorpora, el péptido sintético, estando el soporte en forma de una película o una matriz constituida por:

- un material biológico seleccionado del grupo que consiste en colágeno, gelatina, polisacárido, ácido hialurónico, celulosa, carboximetilcelulosa, pectina, quitosano, dermis humana o animal descelularizado, o
- un material sintético seleccionado del grupo que consiste en silicona, poliuretano, PLLA o
- un material textil de tipo apósito seleccionado del grupo que incluye algodón, poliéster y poliamida.

10. Uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 7 como medio de cultivo destinado al cultivo *in vitro* de células epiteliales o mesenquimales.

11. Soporte para el cultivo de células epiteliales que comprende un soporte en forma de una placa de cultivo de poliestireno, una película o una matriz porosa hecha de biopolímero, una membrana textil o un gel de colágeno, sobre el que se injerta o adsorbe un péptido sintético, donde dicho péptido:

- contiene no más de 30 aminoácidos y comprende o está constituido por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1), o
- comprende o está constituido por la secuencia $Kaa_2aa_3Raa_5aa_6aa_7aa_8aa_9aa_{10}$, en la que, a pH fisiológico:
  - aa_2, aa_6, aa_8, aa_{10} son restos de carga positiva; a lo sumo uno de los cuales puede estar sustituido por un resto de carga neutra,
  - aa_3 es un resto de carga neutra,
  - aa_5 es un resto de carga neutra,
  - aa_7 es un resto de carga neutra, a excepción de la alanina y
  - aa_9 es un resto de carga negativa o un resto de carga neutra,

siendo la secuencia capaz de unirse al receptor de sindecano-1, a excepción de los péptidos que comprenden o están constituidos por la secuencia KKLRIKSKEK (SEQ ID 1).

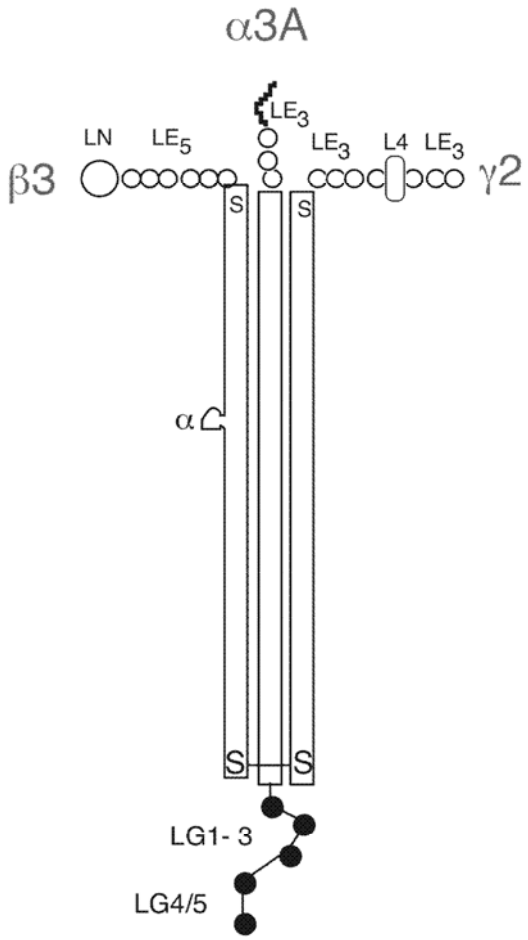


Figura 1

```
                    DTP VASPRSVKVW QDACSPLPKT 1360
QANHGALQFG DIPTSHLLFK LPQELLKPRS QFAVDMQTTS 1400
SRGLVFHTGT KNSFMALYLS KGRLVFALGT DGKKLRIKSK 1440
EKCNDGKWHT VVFGHDGEKG RLVVDGLRAR EGSLPGNSTI 1480
SIRAPVYLGS PPSGKPKSLP TNSFVGCLKN FQLDSKPLYT 1520
PSSSFGVSSC LGGPLEKGIY FSEEGGHVVL AHSVLLGPEF 1560
KLVFSIRPRS LTGILIHIGS QPGKHLCVYL EAGKVTASMD 1600
SGAGGTSTSV TPKQSLCDGQ WHSVAVTIKQ HILHLELDTD 1640
SSYTAGQIPF PPASTQEPLH LGGAPANLTT LRIPVWKSFF 1680
GCLRNIHVNH IPVPVTEALE VQGPVSLNGC PDQ       1713
```

Figura 2

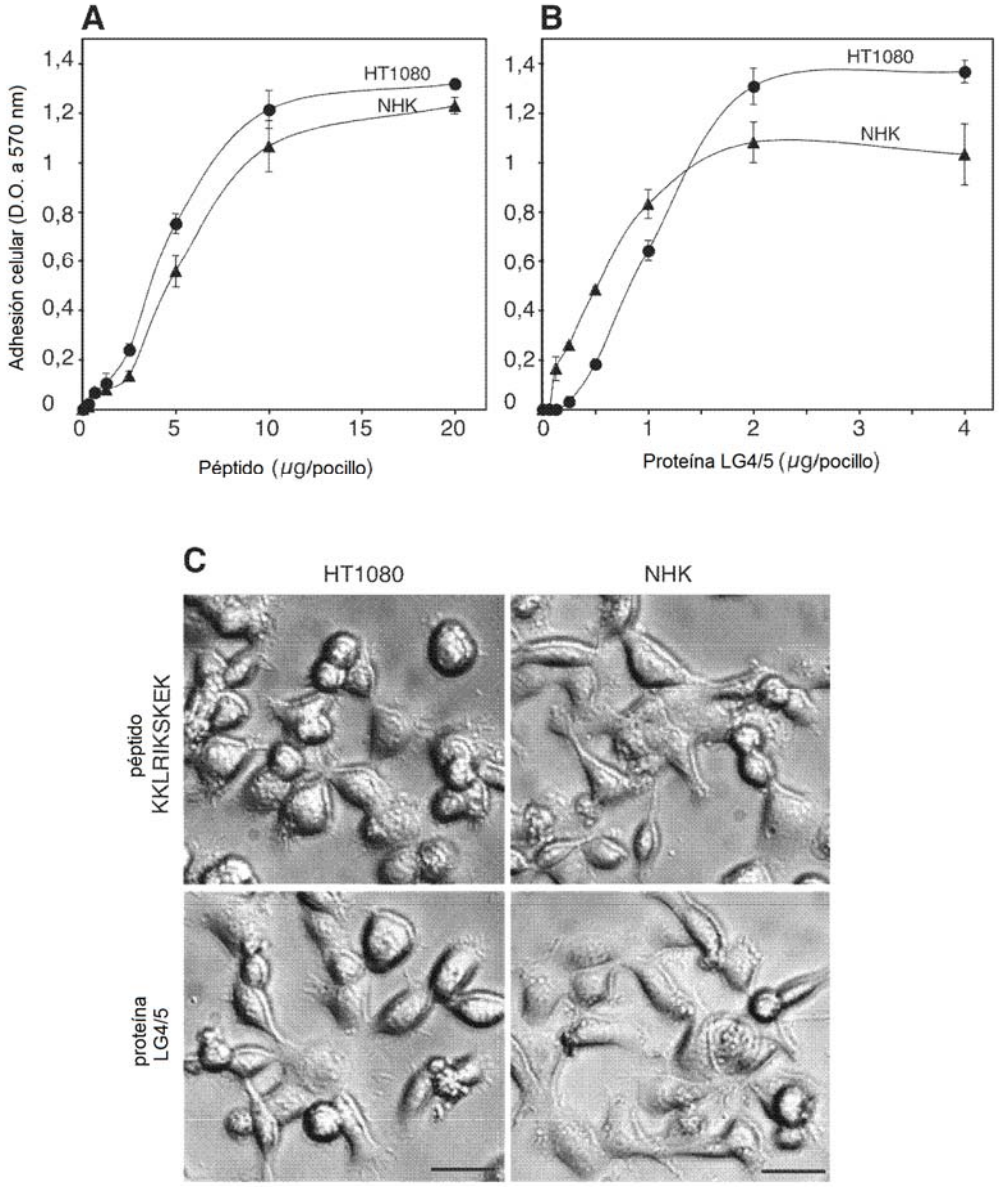

A
B
C
HT1080
NHK
Adhesión celular (D.O. a 570 nm)
Péptido (µg/pocillo)
Proteína LG4/5 (µg/pocillo)
péptido KKLRIKSKEK
proteína LG4/5

Figura 3

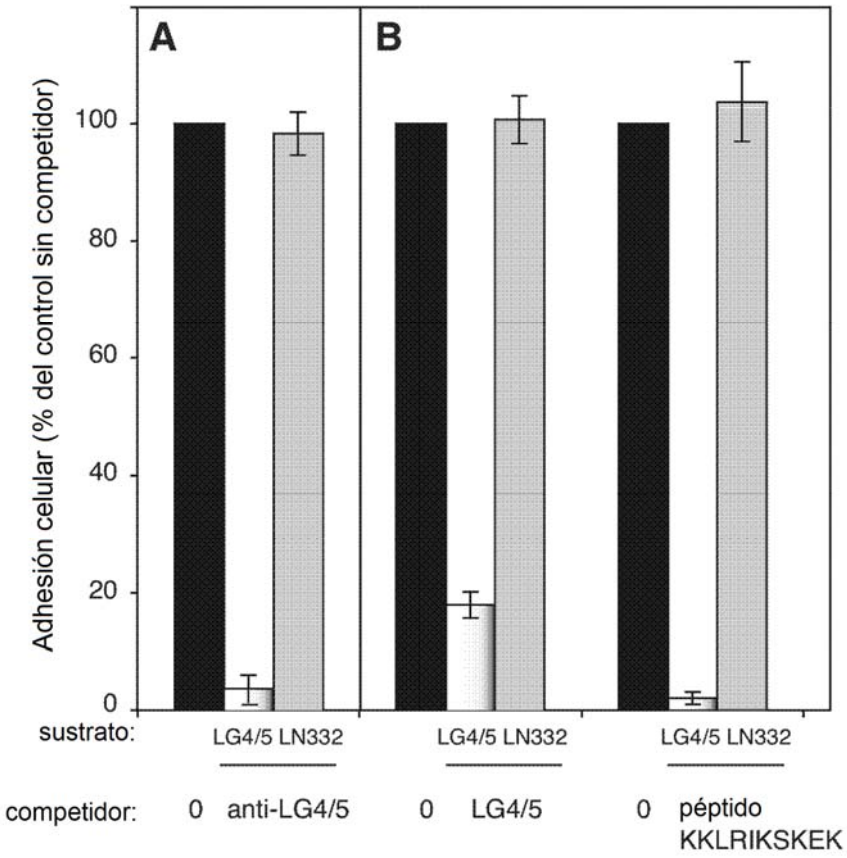

A
B
Adhesión celular (% del control sin competidor)
100
80
60
40
20
0
sustrato:
LG4/5 LN332
LG4/5 LN332
LG4/5 LN332
competidor:
0
anti-LG4/5
0
LG4/5
0
péptido
KKLRIKSKEK

Figura 4

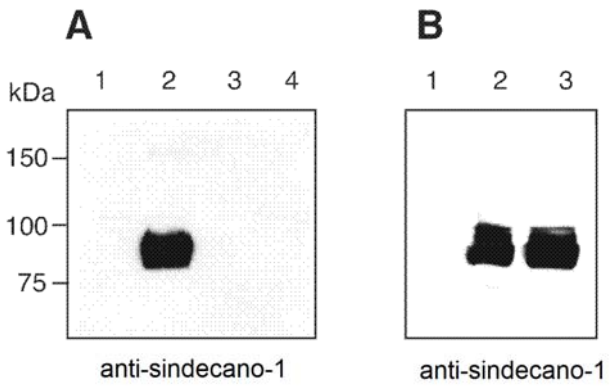
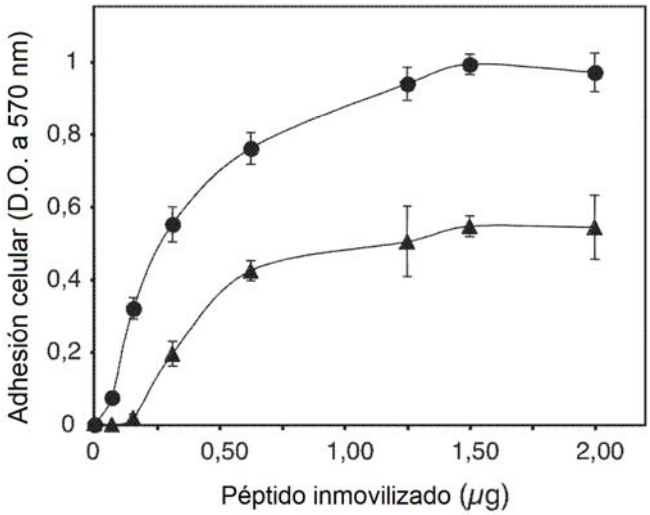


Figura 5

A


Adhesión celular (D.O. a 570 nm)
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
0,50
1,00
1,50
2,00
Péptido inmovilizado (μg)

B

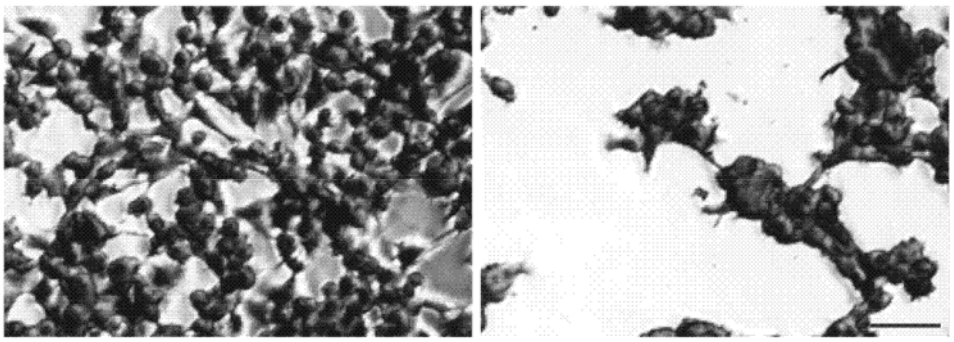


Figura 6

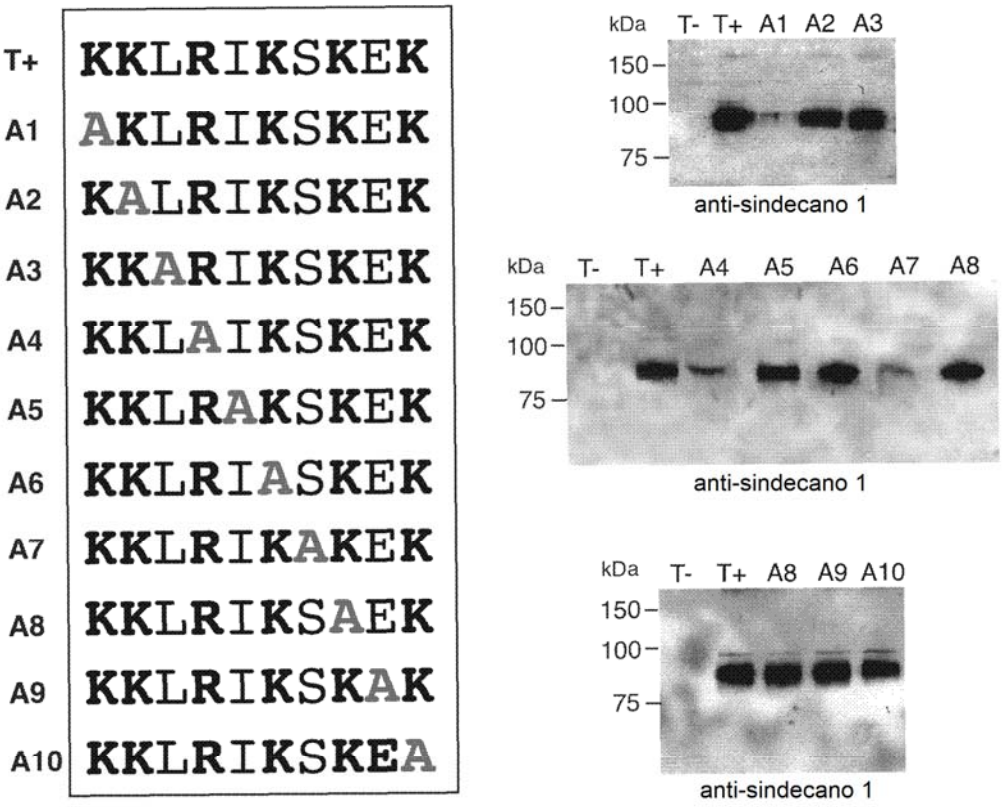

T+ KKLRIKSKEK
A1 AKLRIKSKEK
A2 KALRIKSKEK
A3 KKARIKSKEK
A4 KKLAIKSKEK
A5 KKLRAKSKEK
A6 KKLRIASKEK
A7 KKLRIKAKEK
A8 KKLRIKSAEK
A9 KKLRIKSKAK
A10 KKLRIKSKEA
kDa T- T+ A1 A2 A3
150
100
75
anti-sindecano 1
kDa T- T+ A4 A5 A6 A7 A8
150
100
75
anti-sindecano 1
kDa T- T+ A8 A9 A10
150
100
75
anti-sindecano 1

Figura 7

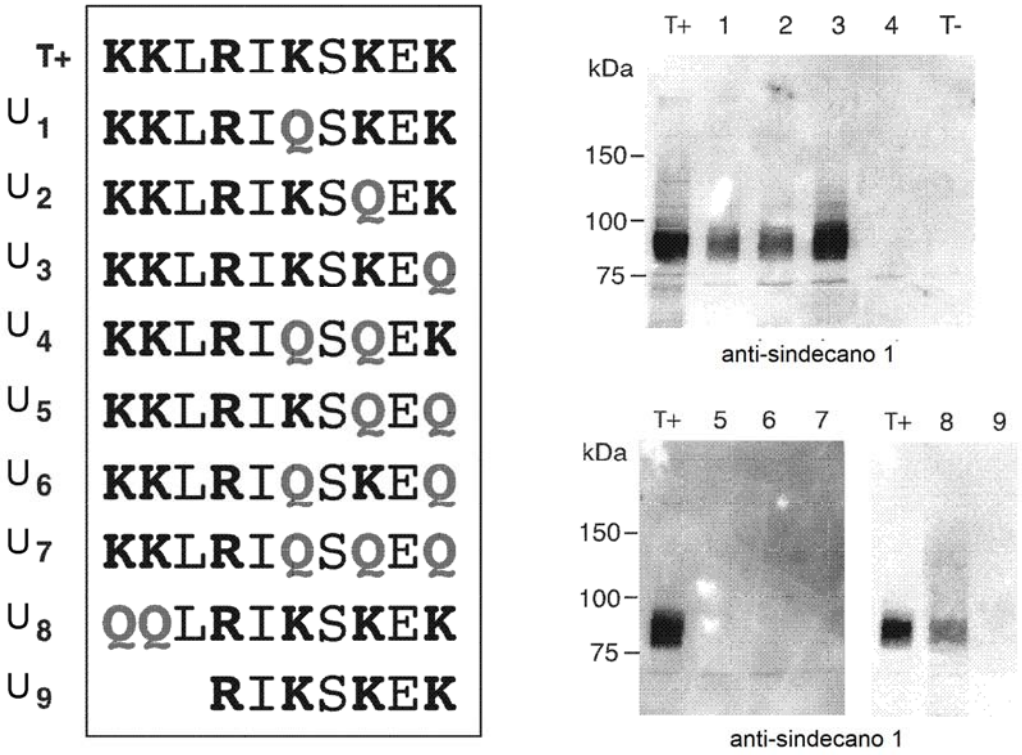

T+ KKLRIKSKEK
U1 KKLRIQSKEK
U2 KKLRIKSQEK
U3 KKLRIKSKEQ
U4 KKLRIQSQEK
U5 KKLRIKSQEQ
U6 KKLRIQSKEQ
U7 KKLRIQSQEQ
U8 QQLRIKSKEK
U9 RIKSKEK
T+ 1 2 3 4 T-
kDa
150
100
75
anti-sindecano 1
T+ 5 6 7 T+ 8 9
kDa
150
100
75
anti-sindecano 1

Figura 8

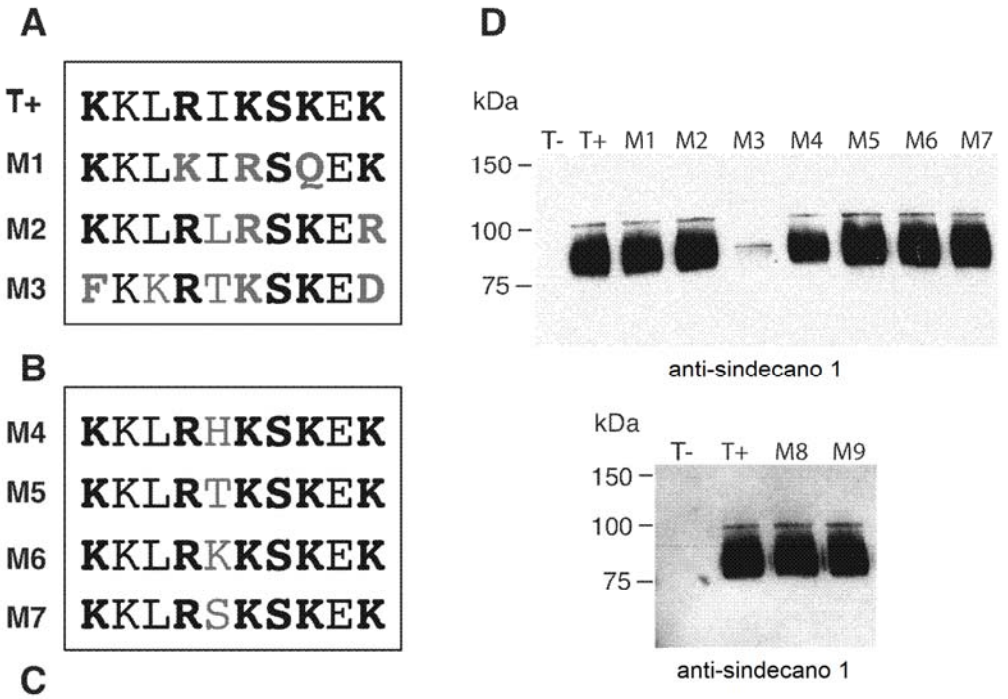

A
T+ KKLRIKSKEK
M1 KKLKIRSQEK
M2 KKLRLRSKER
M3 FKKRTKSKED
B
M4 KKLRHKSKEK
M5 KKLRTKSKEK
M6 KKLRKKSKEK
M7 KKLRSKSKEK
C
M8 KKLRIKLKEK
M9 KKLRIKQKEK
D
kDa
T- T+ M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7
150
100
75
anti-sindecano 1
kDa
T- T+ M8 M9
150
100
75
anti-sindecano 1

Figura 9

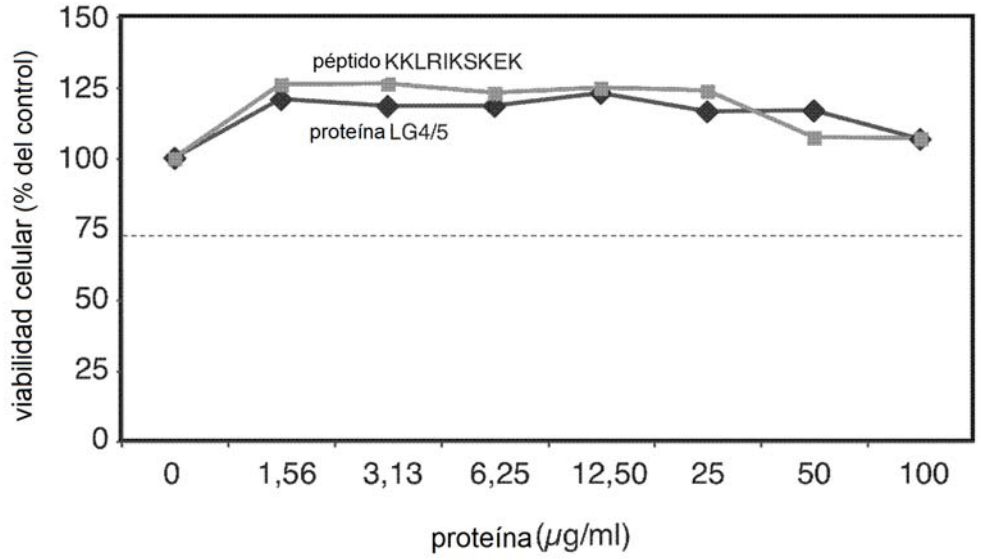

150
125
100
75
50
25
0
viabilidad celular (% del control)
péptido KKLRIKSKEK
proteína LG4/5
0
1,56
3,13
6,25
12,50
25
50
100
proteína (µg/ml)

Figura 10

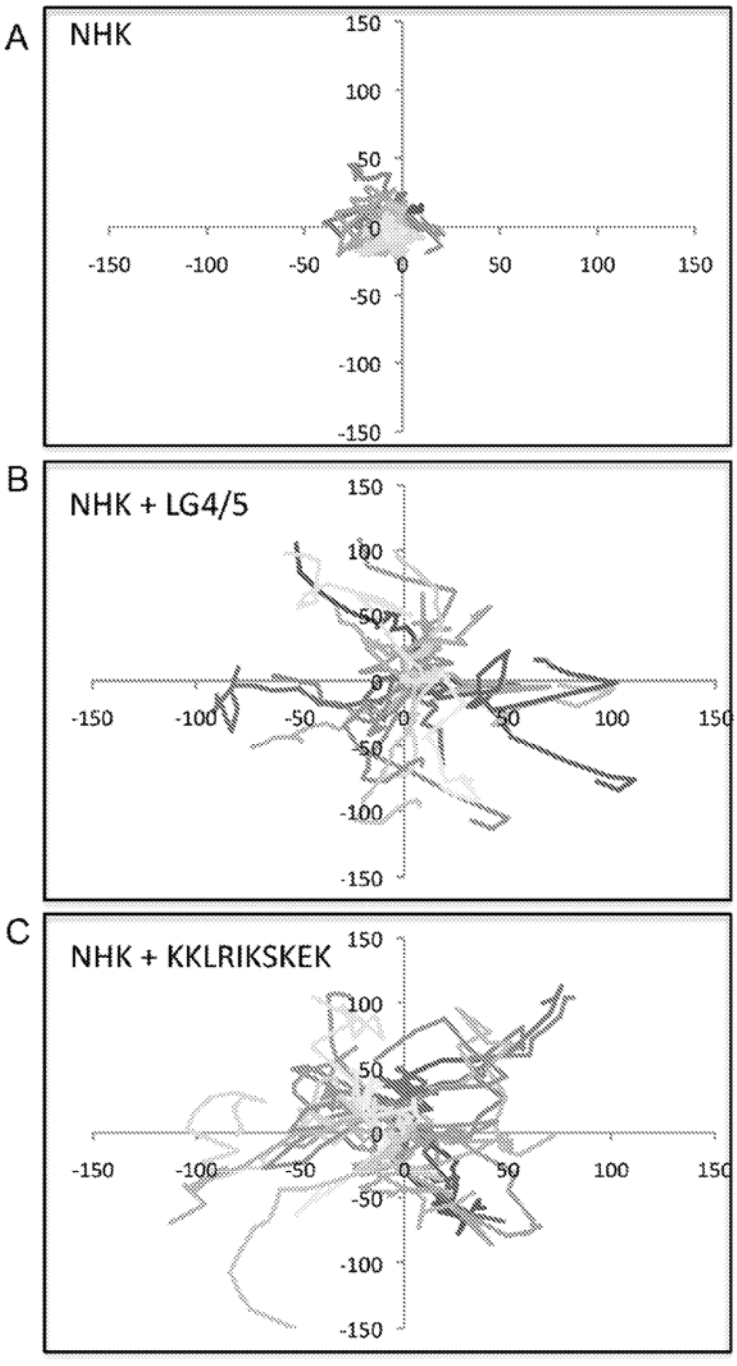

A
NHK
150
100
50
0
-50
-100
-150
-150
-100
-50
0
50
100
150
B
NHK + LG4/5
C
NHK + KKLRIKSKEK

Figura 11

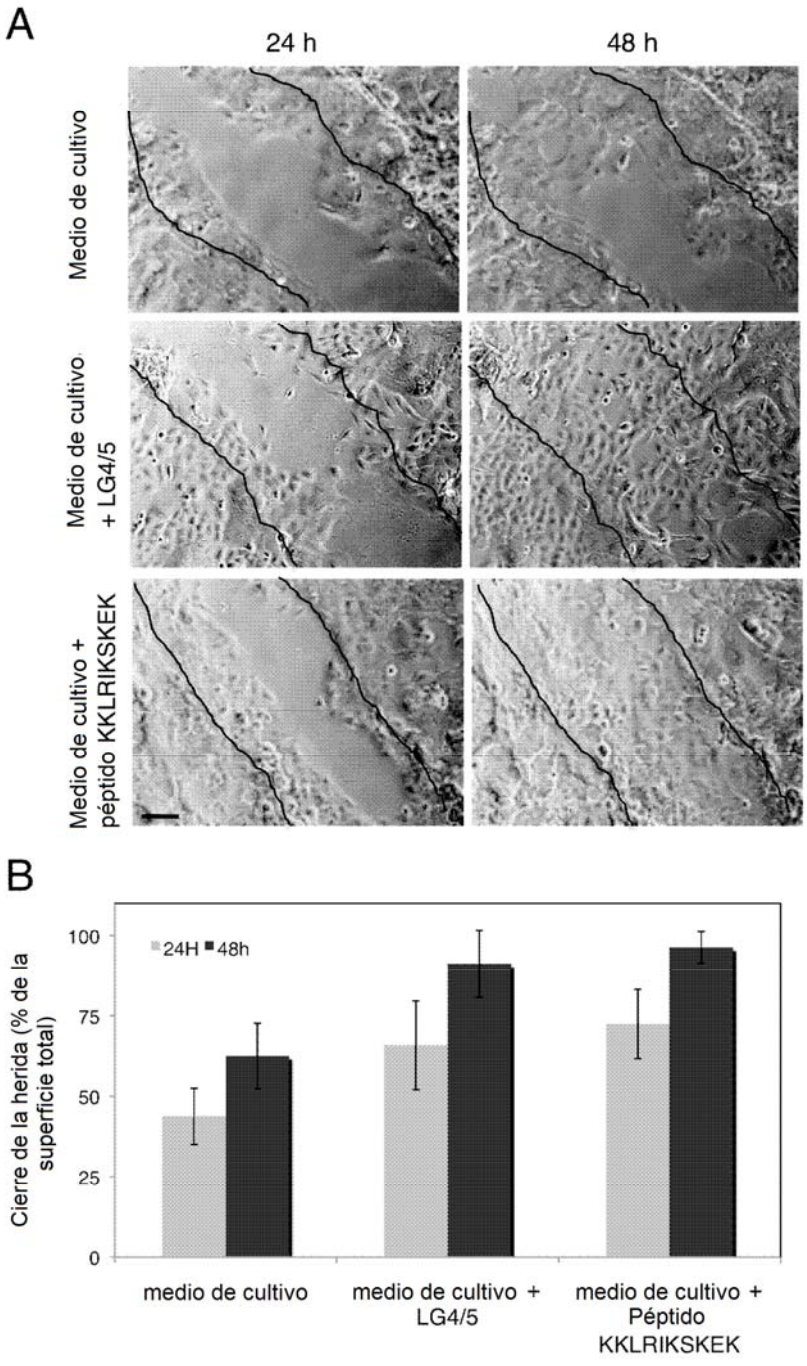

A
24 h
48 h
Medio de cultivo
Medio de cultivo + LG4/5
Medio de cultivo + péptido KKLRIKSKEK
B
Cierre de la herida (% de la superficie total)
24H
48h
100
75
50
25
0
medio de cultivo
medio de cultivo + LG4/5
medio de cultivo + Péptido KKLRIKSKEK

Figura 12

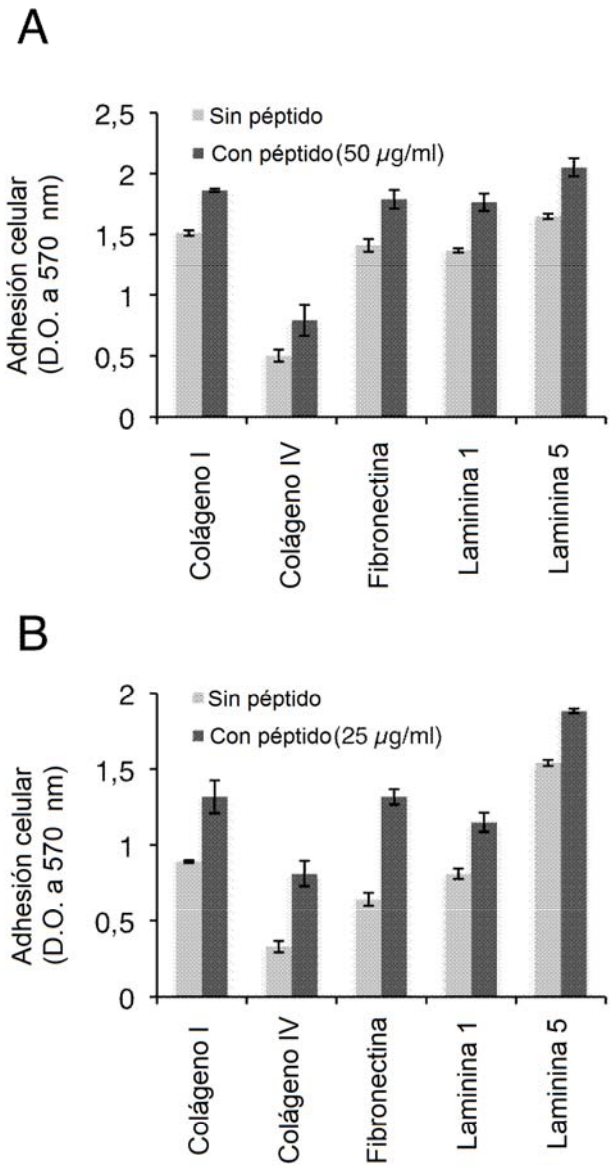

A
Adhesión celular (D.O. a 570 nm)
Sin péptido
Con péptido (50 µg/ml)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Colágeno I
Colágeno IV
Fibronectina
Laminina 1
Laminina 5
B
Adhesión celular (D.O. a 570 nm)
Sin péptido
Con péptido (25 µg/ml)
2
1,5
1
0,5
0
Colágeno I
Colágeno IV
Fibronectina
Laminina 1
Laminina 5

Figura 13

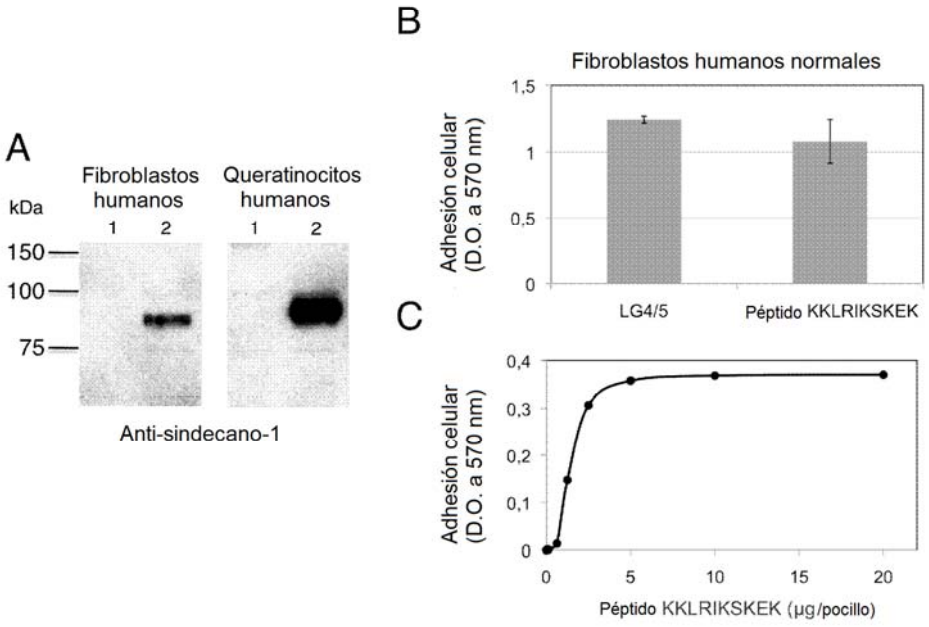

A
Fibroblastos humanos
Queratinocitos humanos
kDa
1
2
1
2
150
100
75
Anti-sindecano-1
B
Fibroblastos humanos normales
Adhesión celular (D.O. a 570 nm)
1,5
1
0,5
0
LG4/5
Péptido KKLRIKSKEK
C
Adhesión celular (D.O. a 570 nm)
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
5
10
15
20
Péptido KKLRIKSKEK (µg/pocillo)

Figura 14

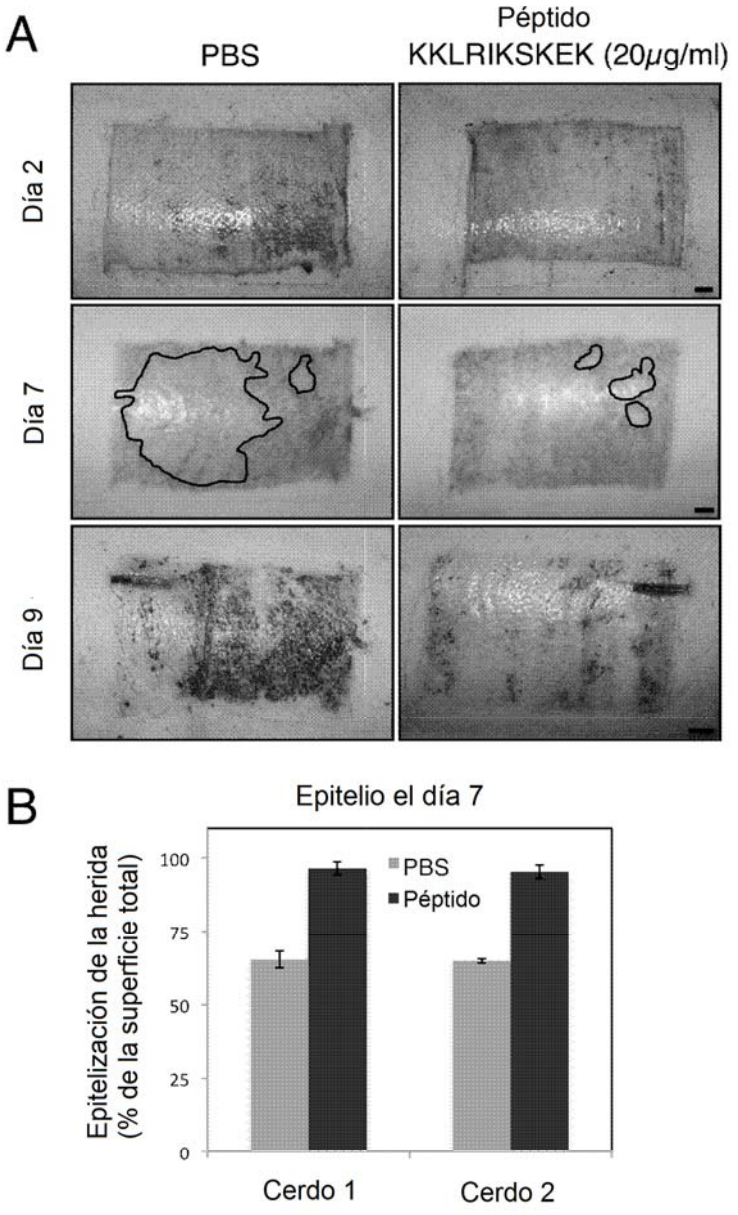

A
PBS
Péptido
KKLRIKSKEK (20μg/ml)
Día 2
Día 7
Día 9
B
Epitelio el día 7
Epitelización de la herida
(% de la superficie total)
100
75
50
25
0
PBS
Péptido
Cerdo 1
Cerdo 2

Figura 15