

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 022**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2007** **E 15188894 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 3002294**

54 Título: **Fragmentos peptídicos para inducir la síntesis de proteínas de la matriz extracelular**

30 Prioridad:

13.06.2006 US 813284 P

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

03.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARRIS, SCOTT;
FALLA, TIMOTHY y
ZHANG, LIJUAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 680 022 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fragmentos peptídicos para inducir la síntesis de proteínas de la matriz extracelular

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a tetrapéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 10 (PKGP) o la SEQ ID NO: 9 (PEKP) con el motivo de aminoácidos PxxP para su uso como medicamento. En particular, la invención se refiere a péptidos activos que estimulan la producción de proteínas de la matriz extracelular y potencian el cierre de la herida de la monocapa de células epiteliales de piel humana herida por arañazos. Las composiciones peptídicas pueden usarse en formulaciones para reparar la piel dañada o para mantener la piel sana.

Antecedentes de la invención

15 El envejecimiento cutáneo se ve habitualmente como la formación de arrugas y la cicatrización de heridas deteriorada. Una herida se define como una ruptura de la integridad epitelial de la piel. La cicatrización normal de heridas implica una serie compleja y dinámica pero magníficamente orquestada de acontecimientos que conducen a la reparación de los tejidos lesionados. El componente más grande de la piel normal es la matriz extracelular (MEC), una matriz similar a un gel producida por las células que rodea. La MEC se compone de dos clases principales que incluyen proteínas estructurales fibrosas y proteoglicanos. Se sabe que los cambios en la composición y el estado reticulado de la MEC se asocian al envejecimiento y a una gama de trastornos cutáneos adquiridos y hereditarios. Está bien documentado que la MEC no solo proporciona soporte estructural, sino que también influye en el comportamiento celular, tal como la diferenciación y la proliferación. Además, cada vez más investigaciones indican que los componentes de la matriz pueden ser una fuente de señales celulares para facilitar la proliferación y migración de las células epiteliales y, por tanto, para potenciar la cicatrización de las heridas.

La clase más grande de moléculas fibrosas de la MEC es la familia del colágeno, que incluye al menos 16 tipos diferentes de colágeno. El colágeno en la matriz dérmica se compone principalmente de los colágenos de tipo I (80-85 %) y de tipo III (8-11 %), ambos son colágenos fibrilares o en forma de bastón. La resistencia a la tracción de la piel se debe principalmente a estas moléculas de colágeno fibrilar, que se autoensamblan en microfibrillas en una disposición de cabeza a cola y lateral de lado a lado escalonada. Las moléculas de colágeno se entrecruzan con las moléculas de colágeno adyacentes, creando resistencia y estabilidad adicionales en las fibras de colágeno. El daño a la red de colágeno (por ejemplo, por enzimas o destrucción física) o su colapso total, provoca que se produzca la cicatrización por reparación.

Se han notificado diversos péptidos bioactivos que estimulan la producción de proteínas de la MEC tanto en la bibliografía científica como en las patentes expedidas. Históricamente, los péptidos se han aislado de fuentes naturales y recientemente han sido objeto de estudios de relación estructura-función. Los péptidos naturales también han servido como puntos de partida para el diseño de análogos de péptidos sintéticos.

Las secuencias específicas dentro de proteínas de la MEC pueden estimular elementos útiles en la piel, tales como colágeno de tipo I, colágeno de tipo III y fibronectina (Katayama et al., *J. Biol. Chem.* 288: 99419944 (1983)). Katayama et al. identificaron el pentapéptido, KTTKS (SEQ ID NO: 17), dentro del propéptido carboxiterminal (restos 197-241) del colágeno de tipo I. El propéptido se escinde durante la producción de la proteína de colágeno madura. El propéptido escindido puede participar en la regulación de la producción de colágeno a través de un mecanismo de retroalimentación de biosíntesis, desempeñando el segmento KTTKS una función activa. Maquart et al. (*J. Soc. Biol.* 193: 423-28 (1999)) notificaron que los péptidos GHK y CNYYSNS también estimulan la síntesis de MEC. Estas secuencias pueden liberarse durante la renovación de la MEC, indicando de este modo la necesidad de reparar la MEC. Las secuencias peptídicas cortas liberadas mediante cualquiera de los dos mecanismos con frecuencia se denominan "matricinas" (Maquart et al., *J. Soc. Biol.* 193: 423-28 (1999)).

El documento EP0858808 desvela péptidos, preferentemente el tetrapéptido que comprende la secuencia Gly-Pro-Ala-Gly, que presentan un efecto quimiotáctico hacia los fibroblastos y se usan en el tratamiento de heridas.

Aunque existe una serie de péptidos naturales y sintéticos, existe la necesidad de péptidos biológicamente activos mejorados y métodos para su uso.

Sumario de la invención

60 Un tetrapéptido de la invención comprende la SEQ ID NO: 10 (PKGP) o la SEQ ID NO: 9 (PEKP) para su uso como un medicamento. Se desvelan tetrapéptidos que se caracterizan por el motivo de secuencia de aminoácidos GxxG o PxxP, donde los restos de G (glicina) y P (prolina) se mantienen y x es un aminoácido variable. Los tetrapéptidos derivan de secuencias que aparecen múltiples veces a lo largo de la secuencia primaria de la proteína de la MEC, colágeno de tipo IV. Las secuencias desveladas inducen la producción de todas las formas de colágeno más que las secuencias peptídicas conocidas anteriormente, incluyendo KTTKS, comercializadas con la marca comercial MATRIXYL™ de SEDERMA SAS (Francia). Además, una composición que comprende una combinación de diversas

secuencias de repetición múltiple desencadena una respuesta de producción de colágeno aún mayor. Pueden esperarse beneficios adicionales de las combinaciones de péptidos presentes en diversas proteínas de la MEC.

5 La producción de una combinación específica de tetrapéptidos para la reconstrucción de la MEC puede ser prohibitiva en términos de costes comerciales. Se desvela un medio relativamente simple y rentable de producir una combinación diversa de tetrapéptidos biológicamente activos. Mediante la producción de una biblioteca combinatoria de tetrapéptidos con el motivo GxxG o PxxP, puede generarse diversos tetrapéptidos biológicamente activos en la misma ejecución de fabricación (por ejemplo, GEPG, GPEG, GPPG y GEEG). La combinación de tetrapéptidos puede inducir más formación de proteínas de la MEC que los péptidos individuales. Las composiciones que
10 comprenden los tetrapéptidos desvelados, solos o en combinación, son útiles en mercados de cuidado de la piel incluyendo, pero no limitados a, aquellos que abordan la formación de arrugas, la tonificación, la firmeza o la flacidez de la piel. La estimulación del colágeno mediante los tetrapéptidos desvelados puede mejorar significativamente la salud y el aspecto de la piel dañada y envejecida.

15 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 es la SEQ ID NO: 45 que es la secuencia de aminoácidos del Colágeno IV que ilustra las apariciones de tetrapéptidos GxxG. Todas las secuencias en negrita están subrayadas y las secuencias solapadas están doblemente subrayadas.

20 La FIG. 2 es la SEQ ID NO: 46 que es la secuencia de aminoácidos del Colágeno III que ilustra las apariciones de activos de desplazamiento del marco de lectura PGPR y GAGP. Todas las secuencias activas de desplazamiento del marco de lectura están en negrita y subrayadas y las secuencias GxxG que aparecen a un desplazamiento del marco de lectura de distancia están doblemente subrayadas.

25 La FIG. 3 es también la SEQ ID NO: 45, la secuencia de aminoácidos del Colágeno IV, que ilustra las apariciones del tetrapéptido PGPP.

Descripción detallada de la invención

30 La invención en general se refiere a tetrapéptidos que comprenden la SEQ ID NO: 10 (PKGP) o la SEQ ID NO: 9 (PEKP) que estimulan la producción de proteínas de la MEC y modulan la cicatrización de heridas y a usos de dichos tetrapéptidos.

Péptidos

35 Una realización de la divulgación se refiere a un tetrapéptido aislado que comprende el motivo GxxG o PxxP. En esta realización, se mantiene la G (glicina) o la P (prolina) y x es un aminoácido variable. El péptido puede ser, en general, cualquier péptido que pertenezca a la descripción anterior y, más preferentemente, es la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16.
40

Otra realización de la divulgación se refiere a un tetrapéptido aislado que comprende el motivo GxPG, donde x es P en cualquiera de las dos posiciones variables o en ambas. En esta realización, la G (glicina) y la P (prolina) se mantienen y x es una variable. El péptido, en general, puede ser cualquier péptido que pertenezca a la descripción anterior y, más preferentemente, es la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7.
45

Otra realización de la divulgación se refiere a un tetrapéptido aislado que comprende el motivo GExG. En esta realización, la G (glicina) y el E (ácido glutámico) se mantienen y x es un aminoácido variable. El péptido puede ser, en general, cualquier péptido que pertenezca a la descripción anterior y, más preferentemente, es la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 8.
50

Otra realización de la divulgación se refiere a un tetrapéptido aislado que comprende el motivo PGxP. En esta realización, la P (prolina) y la G (glicina) se mantienen y x es un aminoácido variable. El péptido puede ser, en general, cualquier péptido que pertenezca a la descripción anterior y, más preferentemente, es la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 16.
55

Otra realización de la divulgación se refiere a un tetrapéptido aislado que comprende el motivo PExP. En esta realización, la P (prolina) y el E (ácido glutámico) se mantienen y x es un aminoácido variable. El péptido puede ser, en general, cualquier péptido que pertenezca a la descripción anterior y, más preferentemente, es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 9.
60

Otra realización de la divulgación se refiere a un tetrapéptido activo de desplazamiento del marco de lectura. En esta realización, el tetrapéptido aparece a un desplazamiento del marco de lectura desde un tetrapéptido GxxG o PxxP en una proteína de la MEC. El péptido puede ser, en general, cualquier péptido que se encuentre dentro de la descripción anterior y, más preferentemente, es la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6.
65

Cada uno de los péptidos descritos anteriormente pueden comprender aminoácidos D o L. Los péptidos pueden

comprender todos los aminoácidos D o todos los aminoácidos L. Los péptidos pueden tener un extremo C de ácido (-CO₂H) o, preferentemente, un extremo C de amida (-CONH₂, -CONHR o -CONR₂). Los péptidos pueden aumentarse adicionalmente o modificarse ya sea química o enzimáticamente. Por ejemplo, los péptidos pueden estar amidados (-NH₂) en el extremo C, que puede hacer que el tetrapéptido sea menos susceptible a la degradación por proteasas y puede aumentar su solubilidad en comparación con las formas de ácido libre. Los péptidos también pueden estar lipidados, lo que puede proporcionar una penetración potenciada en la piel.

Los péptidos descritos anteriormente pueden contener los siguientes aminoácidos: R (arginina), L (leucina), P (prolina), F (fenilalanina), Q (glutamina), E (ácido glutámico), I (isoleucina), K (lisina), S (serina), V (valina), A (alanina), N (asparragina), D (ácido aspártico), T (treonina), Y (tirosina) y G (glicina). Los péptidos descritos anteriormente no incluyen los siguientes: M (metionina), C (cisteína), H (histidina) o W (triptófano). En consecuencia, en una realización, x no se selecciona entre M (metionina), C (cisteína), H (histidina) o W (triptófano).

Métodos de uso

Una realización adicional de la divulgación se refiere a métodos de uso de los péptidos descritos anteriormente. Los métodos de uso pueden implicar el uso de un único péptido o pueden implicar el uso de dos o más péptidos en combinación.

Una realización de la divulgación es un método de promoción de la reparación de la piel dañada y el mantenimiento de la piel sana usando tetrapéptidos que estimulan la producción de proteínas de la MEC. El método en general se refiere a poner en contacto células dérmicas (cutáneas) con una composición que contiene el péptido. Las composiciones pueden ser un aerosol, emulsión, líquido, loción, crema, pasta, pomada, espuma u otra formulación farmacéuticamente aceptable. En general, una formulación farmacéuticamente aceptable incluiría cualquier vehículo aceptable adecuado para su uso sobre la piel humana, por ejemplo, un vehículo cosméticamente aceptable y un vehículo dermatológicamente aceptable. Las composiciones pueden contener otros agentes biológicamente activos tales como retinoides u otros péptidos. Las composiciones pueden contener vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. La etapa de puesta en contacto puede realizarse *in vivo*, *in situ*, *in vitro* o mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia. Más preferentemente, la etapa de puesta en contacto ha de realizarse por vía tópica a una concentración suficiente para provocar una respuesta estimuladora. La concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml y de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml. La etapa de puesta en contacto puede realizarse en un mamífero, un gato, un perro, una vaca, un caballo, un cerdo o un ser humano. Una composición preferida para promover la producción de proteína de la MEC comprende la SEQ ID NO: 8; más preferentemente, la composición comprende la SEQ ID NO: 8 en una mezcla heterogénea con al menos otro tetrapéptido. En una realización más preferida, los tetrapéptidos individuales en la composición provocarían una producción sostenida de colágeno durante un período de al menos 48 horas.

Una realización adicional de la divulgación se refiere a un método para promover la cicatrización de heridas de la piel dañada por envejecimiento normal, enfermedad, lesión, traumatismo o por cirugía u otros procedimientos médicos. El método puede comprender administrar a la herida de un animal una composición, en el que la composición comprende cualquiera de los péptidos descritos anteriormente, individualmente o en combinación. Las composiciones pueden ser un líquido, loción, crema, pasta, pomada, espuma o cualquier otra formulación farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones pueden contener otros agentes biológicamente activos tales como agentes antimicrobianos o factores de crecimiento. Las composiciones también pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos tales como injertos de tejido, productos de cultivo tisular, oxígeno o apósitos. La concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml y de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml. La composición puede administrarse a la herida por vía tópica. El animal en general puede ser cualquier tipo de animal y preferentemente es un mamífero y, más preferentemente, es un ser humano, vaca, caballo, gato, perro, cerdo, cabra u oveja. Una composición preferida para aplicaciones de cicatrización de heridas en las que se promueve la producción de proteína de la MEC comprende la SEQ ID NO: 8; más preferentemente, la composición comprende la SEQ ID NO: 8 en una mezcla heterogénea con al menos otro tetrapéptido. En una realización más preferida, los tetrapéptidos individuales en la composición provocarían una producción sostenida de colágeno durante un período de al menos 48 horas.

Una realización adicional de la divulgación se refiere a un método para reducir la retracción cicatricial de la piel dañada por envejecimiento normal, enfermedad, lesión, traumatismo o por cirugía u otros procedimientos médicos. El método puede comprender administrar a la herida de un animal una composición, en el que la composición comprende cualquiera de los péptidos descritos anteriormente, individualmente o en combinación. Las composiciones pueden ser un líquido, loción, crema, pasta, pomada, espuma u otra formulación farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones pueden contener otros agentes biológicamente activos tales como agentes antimicrobianos o factores de crecimiento. Las composiciones también pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos tales como injertos de tejido, productos de cultivo tisular, oxígeno o apósitos. La concentración del péptido en la

composición puede ser de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml y de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml. La composición puede administrarse a la herida por vía tópica. El animal en general puede ser cualquier tipo de animal y preferentemente es un mamífero y, más preferentemente, es un ser humano, vaca, caballo, gato, perro, cerdo, cabra u oveja. Una composición preferida para aplicaciones de cicatrización de heridas en la que se promueve la producción de proteína de la MEC comprende la SEQ ID NO: 8; más preferentemente, la composición comprende la SEQ ID NO: 8 en una mezcla heterogénea con al menos otro tetrapéptido. En una realización mucho más preferida, los tetrapéptidos individuales en la composición provocarían una producción sostenida de colágeno durante un período de al menos 48 horas.

Una realización adicional de la divulgación se refiere a un método para producir los tetrapéptidos desvelados en combinación. Los péptidos pueden producirse usando cualquier método conocido por los expertos en la materia, tales como los desvelados en Merrifield, R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis I.*, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154 (1963); Carpino, L.A. et al., [(9-Fluorenylmethyl)Oxy] Carbonyl (Fmoc) Amino Acid Chlorides: *Synthesis, Characterization, And Application To The Rapid Synthesis Of Short Peptides*, *J. Org. Chem.* 37: 51: 3732-3734; Merrifield, R.B. et al., *Instrument For Automated Synthesis Of Peptides*, *Anal. Chem.* 38: 19Q51914 (1966); o Kent, S.B.H. et al., *High Yield Chemical Synthesis Of Biologically Active Peptides On An Automated Peptide Synthesizer Of Novel Design*, en: *Peptides 1984* (Ragnarsson U., ed.) Almquist and Wiksell Int., Estocolmo (Suecia), páginas 185-188. Preferentemente, los péptidos se producirán mediante una máquina capaz de añadir secuencialmente aminoácidos a una cadena peptídica en crecimiento. Sin embargo, los péptidos también pueden fabricarse usando una metodología de fase en solución convencional.

Se ha observado que la adición de una mezcla de aminoácidos libres en lugar de mezclas de péptidos homogéneas durante la síntesis de la cadena peptídica da como resultado la incorporación variada de aminoácidos libres de manera que se obtiene una combinación de péptidos como resultado de las reacciones de síntesis. La frecuencia de incorporación relativa de un aminoácido particular incluido en una mezcla de dos o más aminoácidos añadidos durante la síntesis puede ajustarse. El ajuste se hace posible mediante la modificación de la relación de un aminoácido libre que se vuelve disponible durante el proceso de síntesis con respecto a los otros aminoácidos de la mezcla (esto se denomina mezcla isocinética).

Los siguientes ejemplos se incluyen para mostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que las técnicas desveladas en los ejemplos a continuación representan técnicas que el inventor descubrió que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su puesta en práctica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de secuencias tetrapeptídicas de repetición en colágeno

Una proporción relativamente alta de secuencias repetidas de tetrapéptidos de colágeno IV tiene el motivo GxxG (donde x es cualquier aminoácido). Una serie de éstas se muestran *in situ* como parte de la secuencia completa de colágeno IV ilustrada en la Figura 1 como la SEQ ID NO: 45. El colágeno IV se examinó en primer lugar debido a su función de interactuar con otros componentes especializados de la MEC (véase Gregory Schultz et al., 2005). Existen once secuencias con el motivo GxxG en el colágeno IV que aparecen más de diez veces (GxxG donde xx está representado por: vp, ek, fp, lp, pp, sp, ep, ip, pk, qp y tp). De estas secuencias tetrapeptídicas, ocho de once secuencias contienen prolina en la posición 3, dos de once secuencias contienen P en la posición 2, una de once secuencias contiene prolina en las posiciones 2 y 3 y una de once secuencias no contiene prolina. Las secuencias desveladas se denominan REPLIKINES™. "REPLIKINE" se define como una secuencia corta dentro de las proteínas de la MEC que aparece múltiples veces (es decir, se replica). Esta secuencia puede estar presente en una proteína de la MEC (por ejemplo, colágeno IV). Preferentemente, la secuencia está presente en múltiples proteínas de la MEC (por ejemplo, todos los colágenos, elastina, laminina, etc.). La presencia de la secuencia en múltiples proteínas de la MEC aumenta la probabilidad de que el fragmento pueda ser capaz de promover la síntesis o reparación de la MEC.

Las once secuencias GxxG que aparecen en el colágeno IV enumeradas anteriormente se resaltan en la secuencia de colágeno IV humano ilustrada en la Figura 1. En esta figura, todas las secuencias en negrita están subrayadas y las secuencias solapadas están doblemente subrayadas. Todas menos una de estas secuencias también aparecen en los colágenos I, II, III y V. Este hecho contribuye a la capacidad de los péptidos desvelados para estimular la producción de todos los tipos de colágeno, en particular cuando los péptidos se usan en combinación. La Tabla 1 muestra la frecuencia de varias repeticiones tetrapeptídicas en proteínas de la MEC. Las secuencias en negrita en la Tabla 1 son aquellas que aparecen en el colágeno IV diez o más veces.

Tabla 1: Frecuencia de tetrapéptidos en proteínas de la MEC

SEQ. ID NO	Secuencia	Colágeno I	Colágeno II	Colágeno III	Colágeno IV	Colágeno V	Elastina	Precursor de elastina
19	GAAG	10	5	7		2	4	5
20	GAKG	3	4	3	5	5		
21	GAPG	13	21	25	6	9		
22	GDKG	2	2	4	9	3		
23	GDRG	2	5	2	4	1		
8	GEKG	3	5	4	22	15		
5	GEPG	11	15	10	11	4		
24	GERG	10	11	14	6	7		
2	GFPC	4	8	6	22	5	1	1
25	GIPQ	2	2	6	14	6	5	5
26	GKDG	1	4	5	2	2		
27	GKJPG	2	3	3	4	1		
28	GLKG	2	1	1	5	4		
29	GLPG	15	10	9	42	15	1	1 -
30	GNPG	3	5	3	2	1		
31	GPAG	16	20	20	3	6		
32	GPKG	3	11	4	12	9		
7	GPPG	33	40	40	46	43		
33	GPQG	7	11	9	7	5		
34	GPRG	11	13	10	4	7		
35	GPSG	10	11	5	1	5		
36	GPTG	4	3	2	2	6		
37	GPVG	9	3	3	2	5		
38	GQPG	3	4	6	12	7		
39	GRDG	4	2	3	3			
40	GRPG	3	3	4	2	5		
3	GSPG	4	6	21	16	3		
41	GTPG	3	4	2	11	2		
42	GVKG	1	3	2	3	1		
43	GVPG		1	3	10	1	14	15
44	GYPG	1	1	1	4	2		

Como también es evidente a partir de una revisión de la secuencia del colágeno IV, la SEQ ID NO: 45, también hay muchas apariciones de secuencias que tienen el motivo PxxP. Por ejemplo, la secuencia PGPP aparece no menos de quince veces como se ilustra en la Figura 3. Por tanto, esta secuencia desvelada también se denomina REPLIKINE™. Preferentemente, esta secuencia está presente en múltiples proteínas de la MEC (por ejemplo, todos los colágenos, elastina, laminina, etc.) ya que la presencia de esta secuencia en múltiples proteínas de la MEC aumenta la probabilidad de que el fragmento pueda ser capaz de promover la síntesis o reparación de la MEC. Las quince secuencias de PGPP que aparecen en el colágeno IV enumeradas anteriormente están resaltadas y subrayadas en la secuencia del colágeno IV humano ilustrada en la Figura 3.

Ejemplo 2: Identificación de activos de desplazamiento del marco de lectura

Además de la proporción relativamente alta de secuencias de repetición tetrapeptídicas de colágeno IV con el motivo GxxG, se han identificado otras secuencias tetrapeptídicas que presentan un desplazamiento del marco de lectura de aminoácidos de distancia desde una secuencia tetrapeptídica GxxG o PxxP. Estas secuencias pueden repetirse o aparecer solo una vez dentro de una proteína de la MEC y pueden estar ubicadas a una posición de aminoácido de distancia de una secuencia tetrapeptídica QxxG o PxxP como se describe en el presente documento. Estas secuencias tetrapeptídicas se denominan activos de desplazamiento del marco de lectura. Dichos activos de desplazamiento del marco de lectura pueden contener, en consecuencia, una G o una P ya sea en la segunda o en la tercera posición, dependiendo de la dirección del desplazamiento del marco de lectura. Se ha reconocido adicionalmente que los activos de desplazamiento del marco de lectura pueden combinarse con otras secuencias tetrapeptídicas desveladas en la presente solicitud formando una combikine. Un ejemplo de dicha combikine es H06 y H15.

25

Un ejemplo de un activo de desplazamiento del marco de lectura es GAGP o H12 (SEQ ID NO: 6). H12 (GAGP) aparece a un desplazamiento de resto (o marco de lectura) del tetrapéptido de GxxG GGAG en el Colágeno III (SEQ ID NO: 46) como se ilustra en la Figura 2. En esta figura, todas las secuencias activas de desplazamiento del marco de lectura están en negrita y subrayadas y las secuencias de GxxG que aparecen a un desplazamiento del marco de lectura de distancia están doblemente subrayadas. Además, como se muestra en la Tabla 5, este tetrapéptido (GAGP) consigue buenos resultados para la producción de colágeno a las 48 horas. Otro ejemplo es la secuencia PGPR, que es H10 (SEQ ID NO: 4) que aparece once veces en los Colágenos I-IV. Como aparece múltiples veces en una proteína de la MEC individual, este tetrapéptido se consideraría adicionalmente REPLIKINE. La Figura 2 (SEQ ID NO: 46) ilustra varios casos de este tetrapéptido con cada desplazamiento del marco de lectura que se produce desde el tetrapéptido de GxxG GPRG. Este activo de desplazamiento del marco de lectura particular aparece en múltiples proteínas de la MEC y, por tanto, aumenta la probabilidad de que el fragmento pueda ser capaz de promover la síntesis o reparación de la MEC.

Ejemplo 3: Identificación de secuencias de repetición que estimulan la producción de colágeno

Se sintetizaron varias secuencias identificadas en los Ejemplos 1 y 2 usando química peptídica convencional y se sometieron a ensayo para la estimulación de colágeno a partir de fibroblastos dérmicos. Los péptidos sintetizados se amidaron en el extremo C, lo que volvió a los tetrapéptidos menos susceptibles a la degradación por proteasas y aumentó su solubilidad en comparación con las formas de ácido libre. Se incubaron fibroblastos dérmicos humanos en placas de 96 pocillos a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 y 48 horas en 150 µl de medio de cultivo celular completo (Cascade Biologics, Portland, OR; N.º de Cat. M-106-500), complementado con Complemento de Crecimiento Pobre en Suero (Cascade Biologics, Portland, OR; N.º de Cat. S-003-10) que contenía péptidos de la muestra a una concentración peptídica final de 50 µg/ml. Cada pocillo se sembró con 10.000 células. Después de la incubación, se recuperaron muestras de medio de 100 µl de cada pocillo y se sometieron a ensayo para determinar la producción de colágeno.

Los ensayos fueron realizados por Tebu-bio Laboratories (Francia) usando el Kit de Ensayo de Colágeno SIRCOL™ (Biocolor Assays, Reino Unido) siguiendo el protocolo del fabricante. El Ensayo de Colágeno SIRCOL™ es un método cuantitativo de unión a colorante diseñado para el análisis de colágenos solubles liberados en el medio de cultivo por células de mamíferos durante el cultivo *in vitro*. El colágeno de las muestras sometidas a ensayo se une al colorante aniónico SIRCOL™. Los complejos de colágeno-colorante se separan por precipitación de la solución y se sedimentan por centrifugación. El sedimento de colágeno-colorante recuperado se disolvió en una solución alcalina antes de las mediciones de absorbancia. Se tomaron medidas por duplicado a las 24 y 48 horas de dos muestras separadas. Las cuatro mediciones para cada muestra se promediaron. Se midió la absorbancia de blancos de reactivo, patrones de colágeno y muestras a 560 nm. La absorbancia del blanco de reactivo se restó de la absorbancia de cada muestra a las 24 y 48 horas.

Se usaron dos conjuntos de datos separados para generar dos curvas de calibración de colágeno. La primera curva de calibración se generó con el fin de calcular la cantidad de colágeno en las muestras H6 (combinación de las SEQ ID NO: 1-4), H7-H14 (SEQ ID NO: 1-8, respectivamente) y H15 (combinación de las SEQ ID NO: 5-8). La segunda curva de calibración se generó para calcular la cantidad de colágeno en las muestras H16 (SEQ ID NO: 9), H21-23 (SEQ ID NO: 1012, respectivamente), H25-26 (SEQ ID NO: 13-14, respectivamente) o H29-3Q (SEQ ID NO: 15-16, respectivamente), H32 (SEQ ID NO: 17), H33 (combinación de las SEQ ID NO: 9-12), H34 (combinación de las SEQ ID NO: 11-14), H35 (combinación de las SEQ ID NO: 13-16), H36 (combinación de las SEQ ID NO: 1, 6, 5, 8), H37 (SEQ ID NO: 17) y H38 (SEQ ID NO: 8). A partir de las mediciones de absorbancia se creó la representación de Abs_{560nm} de los patrones de colágeno conocidos frente a las concentraciones respectivas de los patrones de colágeno (en microgramos). Se realizó una serie de ensayos en cada punto temporal. Con respecto a cada conjunto de datos, se usó la misma curva de calibración para las muestras tomadas a las 24 y 48 horas (Tablas 2A y 2B). En consecuencia, se prepararon diferentes curvas de calibración inmediatamente antes de realizar cada serie de ensayos.

Tabla 2A: Curva de calibración para someter a ensayo la producción de colágeno por los péptidos H6-H15

Patrones de colágeno (µg)	Ensayo de 24 h de A _{560nm}	Ensayo de 48 h de A _{560nm}
0	0,00	0,00
5	0,08	0,10
10	0,11	0,15
25	0,32	0,35
50	0,66	0,65

Tabla 2B: Curva de calibración para someter a ensayo la producción de colágeno por los péptidos H16, H21-23, H25-26 y H29-38

Patrones de colágeno (µg)	Ensayo de A _{560nm} fecha 1	Ensayo de A _{560nm} fecha 2
0	0,00	0,00

ES 2 680 022 T3

5	0,12	0,09
10	0,14	0,15
25	0,48	0,42
50	0,88	0,80

Se realizó una regresión lineal a partir de la representación de los valores de Abs_{560nm} frente a las concentraciones de los respectivos patrones de colágeno usando MICROSOFT EXCEL™. La regresión dio como resultado una línea descrita por la fórmula $y = 0,013x$ para ambos tiempos de incubación indicados en la Tabla 2A. Como los resultados fueron idénticos, solo se usó el período de tiempo de 24 horas para las curvas de calibración de la segunda serie. La fórmula de la línea obtenida en la fecha de ensayo 1 y la fecha de ensayo 2 de la segunda serie de muestras fue $y = 0,0178x$ e $y = 0,0162x$, respectivamente. El péptido LL-37 (SEQ ID NO: 18) se usó como control positivo ya que se ha informado ampliamente que tiene un impacto sobre la cicatrización de heridas en el hombre (Heilbom et al., *The Cathelicidin Anti-Microbial Peptide LL-37 Is Involved In The Re-Epithelialization Of Human Skin Wounds And Is Lacking In Chronic Ulcer Epithelium*, *J. Invest. Dermatol.* 120: 379-89 (2003)). El límite de detección del ensayo definido por el fabricante es de 2,5 µg.

La cantidad total de colágeno producida en las muestras que contenían péptidos se calculó a partir de los valores de absorbancia promediados tomados a las 24 horas (Tabla 3A) y 48 horas (Tabla 3B) usando la ecuación lineal derivada de la curva de calibración. La cantidad total de colágeno producida en las muestras que contenían los péptidos H16 (SEQ ID NO: 9), H21-23 (SEQ ID NO: 10-12, respectivamente), H25-26 (SEQ ID NO: 13-14, respectivamente) o H29-30 (SEQ ID NO: 15-16, respectivamente), H32 (SEQ ID NO: 17), H33 (combinación de las SEQ ID NO: 9-12), H34 (combinación de las SEQ ID NO: 11-14), H35 (combinación de las SEQ ID NO: 13-16), H36 (combinación de las SEQ ID NO: 1, 6, 5, 8), H37 (SEQ ID NO: 17) y H38 (SEQ ID NO: 8) se calculó a partir de los valores de absorbancia tomados a las 24 horas (Tabla 4A) y a las 48 horas (Tabla 4B) usando la ecuación lineal derivada de la curva de calibración. Estos valores se compararon con el péptido LL37 (SEQ ID NO: 18), un péptido conocido por estimular el colágeno. En cada tabla, las muestras marcadas por un asterisco (*) pueden no ser significativas ya que el límite de detección del ensayo es de 2,5 µg.

25 **Tabla 3A: Mediciones de absorbancia y cuantificación de colágeno en las muestras de ensayo H6-H15 a las 24 horas.**

SEQ ID NO	Péptidos	A _{560nm}		Promedio	Promedio menos blanco	Colágeno (µg)
18	LL37	0,102	0,136	0,12	0,04	3,0
-	H6	0,084	0,140	0,11	0,03	2,5
1	H7	0,098	0,063	0,08	0,00	0,0*
2	H8	0,122	0,078	0,10	0,02	1,5*
3	H9	0,147	0,104	0,13	0,05	3,5
4	H10	0,103	0,146	0,12	0,04	3,4
5	H11	0,110	0,168	0,14	0,06	4,5
6	H12	0,063	0,101	0,08	0,00	0,2*
7	H13	0,114	0,093	0,10	0,02	1,8*
8	H14	0,115	0,122	0,12	0,04	3,0
-	H15	0,132	0,093	0,11	0,03	2,5
-	Blanco	0,074	0,076	0,08	0,00	0,0

Tabla 3B: Mediciones de absorbancia y cuantificación del colágeno en las muestras de ensayo H6-H15 a las 48 horas.

SEQ ID NO	Péptidos	A _{560nm}		Promedio	Promedio menos blanco	Colágeno (µg)
18	LL37	0,262	0,113	0,19	0,07	5,2
-	H6	0,086	0,189	0,14	0,02	1,3*
1	H7	0,192	0,189	0,19	0,07	5,4
2	H8	0,137	0,126	0,13	0,01	0,9*
3	H9	0,117	0,061	0,09	0,00	0,0*
4	H10	0,136	0,085	0,11	0,00	0,0*
5	H11	0,113	0,181	0,15	0,03	2,1*
6	H12	0,106	0,231	0,17	0,05	3,7
7	H13	0,100	0,145	0,12	0,00	0,2*

ES 2 680 022 T3

8	H14	0,132	0,176	0,15	0,03	2,6
-	H15	0,177	0,174	0,18	0,06	4,3
	Blanco	0,120	0,115	0,12	0,00	0,0

Tabla 4A: Mediciones de absorbancia y cuantificación del colágeno en las muestras de ensayo H16, H21-23, H25-26 o H29-38 a las 24 horas.

SEQ ID NO	Péptidos	A _{560nm}		Promedio	Promedio menos blanco	Colágeno (µg)
9	H16	0,133	0,137	0,14	0,06	3,1
10	H21	0,129	0,119	0,12	0,04	2,5
11	H22	0,192	0,085	0,14	0,06	3,3
12	H23	0,090	0,073	0,08	0,00	0,1*
13	H25	0,129	0,076	0,10	0,02	1,3*
14	H26	0,114	0,149	0,13	0,05	2,9
15	H29	0,111	0,063	0,09	0,01	0,4*
16	H30	0,099	0,092	0,10	0,02	0,9*
17	H32 (cristales y toxicidad celular)	0,087	0,055	0,07	-0,01	-0,5*
-	H33	0,086	0,125	0,11	0,03	1,4*
-	H34	0,117	0,120	0,12	0,04	2,2*
-	H35	0,103	0,090	0,10	0,02	0,9*
-	H36	0,105	0,128	0,12	0,04	2,1*
17	H37	0,099	0,100	0,10	0,02	1,1*
8	H38	0,103	0,159	0,13	0,05	2,9
-	Blanco	0,072	0,086	0,08	0,00	0,0

5 Tabla 4B: Mediciones de la absorbancia y cuantificación del colágeno en las muestras de ensayo H16, H21-23, H25-26 o H29-38 a las 48 horas.

SEQ ID NO	Péptidos	A _{560nm}		Promedio	Promedio menos blanco	Colágeno (µg)
9	H16	0,065	0,064	0,06	0,00	0,3*
10	H21	0,089	0,126	0,11	0,05	2,9
11	H22	0,102	0,087	0,09	0,03	2,1*
12	H23	0,093	0,082	0,09	0,03	1,7*
13	H25	0,059	0,084	0,07	0,01	0,7*
14	H26	0,081	0,153	0,12	0,06	3,5
15	H29	0,09	0,094	0,086	0,03	1,9*
16	H30	0,083	0,101	0,09	0,03	2,0*
17	H32 (cristales y toxicidad celular)	0,088	0,072	0,08	0,02	1,2*
-	H33	0,096	0,092	0,09	0,03	2,1*
-	H34	0,076	0,155	0,12	0,06	3,4
-	H35	0,120	0,074	0,10	0,04	2,3*
-	H36	0,154	0,082	0,12	0,06	3,6
17	H37	0,078	0,114	0,10	0,04	2,2*
8	H38	0,123	0,089	0,11	0,05	2,8
-	Blanco	0,106	0,106	0,06	0,00	0,0

Debido a que los tamaños de muestra fueron de 100 µl, la concentración de colágeno producida en cada muestra en microgramos por mililitro se determinó multiplicando la cantidad de colágeno detectada por diez. Los resultados de todas las muestras analizadas se resumen en la Tabla 5.

10

Tabla 5: Síntesis de colágeno inducida por péptidos

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia primaria	[Péptido] (µg/ml)	Colágeno producido (µg/ml)	
				24 horas	48 horas
1	H07	PEGP	50	0	54
2	H08	GFPG	50	15	9
3	H09	GSPG	50	35	0
4	H10	PGPR	50	34	0
-	H06	H7, H8, H9, H10 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4)	50	25	13
5	H11	GEPG	50	45	21
6	H12	GAGP	50	2	37
7	H13	GPPG	50	18	2
8	H14	GEKG	50	30	26
8	H38	GEKG	0.3	29	28
-	H15	H11, H12, H13, H14 (SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8)	50	25	43
9	H16	PEKP	50	31	3
10	H21	PKQP	50	25	29
11	H22	PGQP	50	33	21
12	H23	PGTP	50	1	17
13	H25	PMGP	50	13	7
14	H26	PGPP	50	29	35
15	H29	PQGP	50	4	19
16	H30	PGNP	50	9	20
17	H32	KTTKS (péptido SEDERMA™)	50	na	12
17	H37	KTTKS (péptido SEDERMA™)	0,3	11	22
'	H33	H16, H21, H22, H23 (SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12)	50	14	21
-	H34	H22, H23, H25, H26 (SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14)	50	22	34
-	H35	H25, H26, H29, H30 (SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16)	50	9	23
-	H36	H7, H12, H11, H14 (SEQ ID NO: 1, 6, 5, 8)	50	21	36
18	LL37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRID FLRNLVPRTES	50	30	52

5 Todos los tetrapéptidos sometidos a ensayo estimularon la producción de colágeno soluble. De las secuencias sometidas a ensayo, los tetrapéptidos GxxG con un ácido glutámico en la posición 2 estimulan mejor el colágeno en ambos puntos temporales de 24 y 48 horas. Estas secuencias son H11 (GEPG, SEQ ID NO: 5), H14 (GEKG, SEQ ID NO: 8) y H38 (GEKG; SEQ ID NO: 8). Los péptidos se detectaron inicialmente usando una concentración de péptido de 50 µg/ml. Para estudiar la concentración eficaz para estimular la producción de colágeno, H14 (SEQ ID NO: 8) también se sometió a ensayo a 0,3 µg/ml como H38. Como se muestra en la Tabla 5, la estimulación de colágeno inducida por H38 no disminuyó a la concentración más baja, lo que indica que la concentración estimulante máxima de la SEQ ID NO: 8 es igual o inferior a 0,3 µg/ml.

10 Para someter a ensayo su eficacia, la SEQ ID NO: 8 (H14 y H38) se comparó con el péptido, LL37, (SEQ ID NO: 18) que se sabe que estimula la producción de colágeno. Basándose en la cantidad de colágeno liberada por los fibroblastos en respuesta a LL37, se consideró que 25 µg/ml era una cantidad de colágeno significativa liberada debido al contacto con un tetrapéptido. La SEQ ID NO: 8 indujo aproximadamente la misma cantidad de colágeno que LL37 (SEQ ID NO: 18) a las 24 horas. De forma importante, el colágeno producido como resultado del contacto con la SEQ ID NO: 8 se mantuvo sustancialmente durante al menos 48 horas. La SEQ ID NO: 8 también se comparó con un péptido líder para el cuidado de la piel que se sabe que estimula la producción de colágeno, KTTKS (SEQ ID NO: 17) (Katayama et al., *J. Biol. Chem.*, 288: 9941-9944 (1983)). KTTKS es un ingrediente en el producto MATRIXYL™ (SEDERMA SAS, Francia). La SEQ ID NO: 8 estimuló más producción de colágeno que el péptido KTTKS (SEQ ID NO: 17) (Tabla 5) a las 24 y 48 horas.

Ejemplo 4: Identificación de combinaciones de péptidos que potencian sinérgicamente la estimulación de colágeno - COMBIKINES

25 Las poblaciones heterogéneas de tetrapéptidos activos pueden estimular la producción de colágeno a un nivel más alto que las muestras homogéneas de tetrapéptidos. Los componentes de la composición heterogénea se

denominan COMBIKINES™. Las COMBIKINES son un grupo de REPLIKINES combinadas para producir un efecto mayor o más amplio sobre uno o más tipos celulares diana. Los péptidos H11 (SEQ ID NO: 5), H12 (SEQ ID NO: 6), H13 (SEQ ID NO: 7) y H14 (SEQ ID NO: 8) se combinaron a una concentración final de 50 µg/ml y se sometieron a ensayo usando el mismo protocolo que para los péptidos individuales. Como se esperaba, el resultado obtenido en el punto temporal de 24 horas fue igual a la media de las puntuaciones de inducción individuales. La combinación de péptidos a las 48 horas, sin embargo, indujo colágeno a un nivel de 43 µg/ml. Sorprendentemente, esta cantidad fue muy superior a la media prevista (21 µg/ml) de los cuatro péptidos individuales (véase la Tabla 5). Por tanto, combinaciones específicas de péptidos pueden estimular la producción de colágeno en mayor grado que los péptidos individuales en la misma concentración. Adicionalmente, tetrapéptidos de diversas fuentes de MEC tales como colágeno, laminina y elastina pueden producir una inducción potenciada de diversas proteínas de la MEC (véanse las Tablas 1 y 5).

Ejemplo 5: Fabricación de COMBIKINE rentable para potenciar la estimulación de la producción de colágeno

El alto coste de la síntesis de péptidos limita la posibilidad de producir composiciones heterogéneas de péptidos bioactivos. La presente invención mitiga en gran medida esta limitación. Debido a que las secuencias desveladas actualmente tienen una característica común (por ejemplo, una glicina o prolina en ambos extremos), puede sintetizarse una gama de tetrapéptidos variados en las posiciones 2 y 3 en una sola ejecución de fabricación. Los péptidos sintéticos pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica. (Benito, N., *Chemistry of Peptide Synthesis*, CRC (2005)). Durante la fabricación de los péptidos, se añaden mezclas de aminoácidos en lugar de muestras homogéneas. La química para determinar las relaciones correctas de concentraciones de aminoácidos añadidas en las posiciones mixtas para obtener la relación deseada de péptidos resultantes se ha descrito anteriormente (Greenbaum et al., *Molecular and Cellular Proteomics* 1: 60-68, 2002; Krstenansky et al., *Letters in Drug Design and Discovery* 1: 6-13, 2004). Usando esta metodología, puede hacerse una biblioteca de péptidos heterogéneos por casi el mismo coste que el de la síntesis de un péptido.

La aplicación de este proceso de fabricación permite la producción rentable de combikines bioactivas. Esto es posible gracias a la composición única de los tetrapéptidos desvelados. Las mezclas de tetrapéptidos son más adecuadas para la incorporación en formulaciones de uso tópico que los péptidos más largos. Debido a su longitud, los tetrapéptidos tienen ventajas prácticas y químicas sobre los péptidos más largos, incluyendo las siguientes: incorporación y disolución más fácil en formulaciones, mayor permeabilidad de la piel y los poros y mayores rendimientos de producción con métodos más fáciles de fabricación de combinaciones de péptidos. Aunque no es necesario, las formulaciones ideales de tetrapéptidos, solos o en combinación, son formulaciones que mantienen una producción significativa de colágeno a las 24 horas y hasta a las 48 horas. Más preferentemente, las formulaciones inducirían la síntesis de MEC durante todo el período de 48 horas de manera que se produzca más colágeno en 48 horas que en 24 horas. Aunque dentro del alcance de la presente invención, los tetrapéptidos que promueven la producción de proteínas de la MEC a las 24 horas, pero que muestran una producción disminuida a las 48 horas, se favorecen menos. A este respecto, la Tabla 6 muestra los resultados de los péptidos desvelados actualmente. Los péptidos preferidos están en negrita.

Tabla 6: Péptidos desvelados

SEQ ID NO	Péptidos	Colágeno liberado (µg/ml) 24 h	Colágeno liberado (µg/ml) 48 h	Liberación de colágeno significativa a las 24 h y las 48 h	Aumento de la liberación de colágeno a las 48 h frente a las 24 h	Disminución de la liberación de colágeno a las 48 h frente a las 24 h
18	LL37	30	52	√	√	
-	H6	25	13			
1	H7	0	54		√	
2	H8	15	9			
3	H9	35	0			√
4	H10	34	0			√
5	H11	45	21			√
6	H12	2	37		√	
7	H13	18	2			
8	H14	30	26	√		
8	H38	29	28	√		
-	H15	25	43	√	√	
9	H16	31	3			√
10	H21	25	29	√		
11	H22	33	21			√
12	H23	1	17		√	

13	H25	13	7			√
14	H26	29	35	√		
15	H29	4	19		√	
16	H30	9	20		√	
17	H32 (cristales y toxicidad celular)	NA	12			
17	H37	11	22		√	
-	H33	14	21		√	
-	H34	22	34		√	
-	H35	9	23		√	
-	H36	21	36		√	

Ejemplo 6: Los estimuladores de colágeno también sirven como moléculas multifactoras que potencian el cierre de heridas de células epiteliales cutáneas

5 Los colágenos son componentes clave de todas las fases de la cicatrización de heridas. La estimulación de la producción de colágeno refleja que se ha producido daño a la red de colágeno (por ejemplo, por enzimas o destrucción física). De hecho, el colapso total de la red de colágeno provoca que tenga lugar la cicatrización. Por tanto, un estimulador de colágeno también puede servir como molécula multifactora orquestando cierta remodelación de la matriz y potenciando la cicatrización de heridas.

10 Se realizaron experimentos de cicatrización de heridas en monocapas de células epiteliales de piel humana (CRL-2592) colocadas en placas de 12 pocillos. Las células se privaron de suero durante 24 horas antes de la experimentación. Se hirieron monocapas confluentes de CRL-2592 usando una punta de pipeta P200 (200 µl). Las heridas se lavaron y se documentaron mediante imagen antes del tratamiento con péptido. Los péptidos se añadieron a una concentración final de 20 a 40 µg/ml. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO₂ y 92 % de humedad, excepto cuando se estaban capturando las imágenes durante un corto período de tiempo a temperatura ambiente. El cierre de la herida se siguió en los puntos temporales de 6 horas y 10 horas. Se usaron heridas tratadas con PBS como controles negativos con fines comparativos.

20 **Tabla 7: Efecto de péptidos sobre el cierre de heridas epiteliales de piel humana *in vitro***

Compuesto	0 h		6 h		10 h	
	Tamaño H*	Tamaño H	% de cierre	Tamaño H	% de cierre	
PBS-1	36	29	19,40 %	21	41,70 %	
PBS-2	52	42	19,20 %	30	42,30 %	
SEQ ID NO: 14	25	12	52 %	2,75	89 %	
SEQ ID NO: 5	48	39	19 %	30	37,50 %	

* Tamaño H: tamaño de la herida (arbitrario)

25 El cierre de la herida de la monocapa *in vitro* es el resultado de la migración celular, que es importante en muchos procesos biológicos, tales como la embriogénesis, la angiogénesis, las reacciones inflamatorias y la reparación de heridas. Se cree que estos procesos están regulados por interacciones con otras células, citocinas y proteínas de la MEC. Como se muestra en la Tabla 7, la SEQ ID NO: 14 induce significativamente el cierre de la herida en comparación con los efectos del PBS solo. Dicha actividad es específica de péptido, así como específica de tipo celular puesto que la SEQ ID NO: 14 no induce el cierre de la herida en una monocapa de fibroblastos de piel humana (datos no mostrados). La SEQ ID NO: 5 también es un inductor de colágeno, pero no potencia el cierre de la herida ni la migración de células epiteliales en gran medida en comparación con los efectos del PBS solo. El hecho de que la SEQ ID NO: 14 indujera la migración celular o el cierre de heridas de manera específica para las células epiteliales cutáneas (es decir, no recluta fibroblastos) puede añadir una ventaja al uso de este péptido para el cuidado de la piel, puesto que se cree que el reclutamiento de gran número de fibroblastos activos a un sitio de herida da como resultado una deposición en exceso y una contracción de tejido que da como resultado la retracción cicatricial.

35 Todas las composiciones o métodos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden hacerse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y métodos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y/o métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas de los métodos descritos en el presente documento. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes descritos en el

presente documento aunque se conseguirían los mismos resultados o similares.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Harris, Scott M.
Falla, Timothy J.
Zhang, Lijuan
- 10 <120> FRAGMENTOS PEPTÍDICOS PARA INDUCIR LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE LA MATRIZ
EXTRACELULAR
- <130> 11181.0034.NPUS00
<150> US 60/813.284
- 15 <151> 13-06-2006
<160> 46
- <170> PatentIn versión 3.4
- 20 <210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> Péptido sintético H7
- <400> 1
- Pro Glu Gly Pro**
1
- 30
- <210> 2
<211> 4
<212> PRT
35 <213> Artificial
- <220>
<223> Péptido sintético H8
- 40 <400> 2
- Gly Phe Pro Gly**
1
- 45 <210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
- 50 <220>
<223> Péptido sintético H9
- <400> 3
- Gly Ser Pro Gly**
1
- 55 <210> 4
<211> 4
<212> PRT
60 <213> Artificial

ES 2 680 022 T3

<220>
<223> Péptido sintético H10

5 <400> 4

Pro Gly Pro Arg
1

<210> 5
<211> 4
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
15 <223> Péptido sintético H11

<400> 5

Gly Glu Pro Gly
1

20 <210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético H12

<400> 6

Gly Ala Gly Pro
1

30

<210> 7
<211> 4
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
40 <223> Péptido sintético H13

<400> 7

Gly Pro Pro Gly
1

45 <210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> Péptido sintético H14

<400> 8

Gly Glu Lys Gly
1

55 <210> 9
<211> 4
<212> PRT

ES 2 680 022 T3

<213> Artificial
<220>
<223> Péptido sintético H16
5 <400> 9

Pro Glu Lys Pro
1

10 <210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido sintético H21

<400> 10

Pro Lys Gly Pro
1

20 <210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético H22

<400> 11

30 Pro Gly Gln Pro
1

<210> 12
<211> 4
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético H23
40 <400> 12

Pro Gly Thr Pro
1

45 <210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Péptido sintético H25

<400> 13

Pro Met Gly Pro
1

55

ES 2 680 022 T3

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Péptido sintético H26

10

<400> 14

Pro Gly Pro Pro
1

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Péptido sintético H29

20

<400> 15

Pro Gln Gly Pro
1

25

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> Péptido sintético H30

<400> 16

Pro Gly Asn Pro
1

35

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

40

<220>
<223> Péptido sintético H32

45

<400> 17

Lys Thr Thr Lys Ser
1 5

50

<210> 18
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial

55

<220>
<223> Péptido LL37

<400> 18

ES 2 680 022 T3

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val Pro
20 25 30

Arg Thr Glu Ser
35

5 <210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 19

Gly Ala Ala Gly
1

15 <210> 20
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 20

Gly Ala Lys Gly
1

25 <210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 21

Gly Ala Pro Gly
1

35 <210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 22

Gly Asp Lys Gly
1

50 <210> 23

<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 23

Gly Asp Arg Gly
1

10

<210> 24
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido sintético

20 <400> 24

Gly Glu Arg Gly
1

25

<210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 25

Gly Ile Pro Gly
1

35

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 26

45

Gly Lys Asp Gly
1

50

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 27

Gly Lys Pro Gly
1

5 <210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 28

Gly Leu Lys Gly
1

15 <210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 29

Gly Leu Pro Gly
1

25 <210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético

35 <400> 30

Gly Asn Pro Gly
1

40 <210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 31

Gly Pro Ala Gly
1

50 <210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>

ES 2 680 022 T3

<223> Péptido sintético
<400> 32

5 Gly Pro Lys Gly
1

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

15 <400> 33

Gly Pro Gln Gly
1

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
25 <223> Péptido sintético

<400> 34

Gly Pro Arg Gly
1

30 <210> 35
<211> 4
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

40 <400> 35

Gly Pro Ser Gly
1

<210> 36
<211> 4
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

50 <400> 36

Gly Pro Thr Gly
1

55

ES 2 680 022 T3

5 <210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <400> 37

Gly Pro Val Gly
1

15 <210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

20 <400> 38

Gly Gln Pro Gly
1

25 <210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 39

Gly Arg Asp Gly
1

35 <210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

40 <400> 40

Gly Arg Pro Gly
1

45 <210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

50 <400> 41

55 <210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

55 <400> 41

ES 2 680 022 T3

Gly Thr Pro Gly
1

5 <210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 42

Gly Val Lys Gly
1

15 <210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 43

Gly Val Pro Gly
1

25

30 <210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

35 <400> 44

Gly Tyr Pro Gly
1

40 <210> 45
<211> 1669
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 45

ES 2 680 022 T3

Met Gly Pro Arg Leu Ser Val Trp Leu Leu Leu Leu Pro Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Leu His Glu Glu His Ser Arg Ala Ala Ala Lys Gly Gly Cys Ala
 20 25 30

Gly Ser Gly Cys Gly Lys Cys Asp Cys His Gly Val Lys Gly Gln Lys
 35 40 45

Gly Glu Arg Gly Leu Pro Gly Leu Gln Gly Val Ile Gly Phe Pro Gly
 50 55 60

Met Gln Gly Pro Glu Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Gln Lys Gly Asp
 65 70 75 80

Thr Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Thr Lys Gly Thr Arg Gly Pro Pro
 85 90 95

Gly Ala Ser Gly Tyr Pro Gly Asn Pro Gly Leu Pro Gly Ile Pro Gly
 100 105 110

Gln Asp Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ile Pro Gly Cys Asn Gly Thr
 115 120 125

Lys Gly Glu Arg Gly Pro Leu Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Phe Ala
 130 135 140

ES 2 680 022 T3

Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Met Lys Gly Asp Pro Gly
 145 150 155 160
 Glu Ile Leu Gly His Val Pro Gly Met Leu Leu Lys Gly Glu Arg Gly
 165 170 175
 Phe Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Leu
 180 185 190
 Gln Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Phe Thr Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 195 200 205
 Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Gln Met Gly Leu Ser Phe
 210 215 220
 Gln Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Asp Gln Gly Val Ser Gly Pro Pro
 225 230 235 240
 Gly Val Pro Gly Gln Ala Gln Val Gln Glu Lys Gly Asp Phe Ala Thr
 245 250 255
 Lys Gly Glu Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Phe Gln Gly Met Pro
 260 265 270
 Gly Val Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly Lys
 275 280 285
 Pro Gly Lys Asp Gly Asp Lys Gly Glu Lys Gly Ser Pro Gly Phe Pro
 290 295 300
 Gly Glu Pro Gly Tyr Pro Gly Leu Ile Gly Arg Gln Gly Pro Gln Gly
 305 310 315 320
 Glu Lys Gly Glu Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ile Val Ile Gly
 325 330 335
 Thr Gly Pro Leu Gly Glu Lys Gly Glu Arg Gly Tyr Pro Gly Thr Pro
 340 345 350
 Gly Pro Arg Gly Glu Pro Gly Pro Lys Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly
 355 360 365
 Gln Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Val Pro Gly Gln Ala Gly Ala Pro
 370 375 380
 Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Glu Lys Gly Asp Arg Gly Phe Pro Gly
 385 390 395 400
 Thr Ser Leu Pro Gly Pro Ser Gly Arg Asp Gly Leu Pro Gly Pro Pro
 405 410 415
 Gly Ser Pro Gly Pro Pro Gly Gln Pro Gly Tyr Thr Asn Gly Ile Val
 420 425 430
 Glu Cys Gln Pro Gly Pro Pro Gly Asp Gln Gly Pro Pro Gly Ile Pro
 435 440 445
 Gly Gln Pro Gly Phe Ile Gly Glu Ile Gly Glu Lys Gly Gln Lys Gly
 450 455 460
 Glu Ser Cys Leu Ile Cys Asp Ile Asp Gly Tyr Arg Gly Pro Pro Gly
 465 470 475 480

ES 2 680 022 T3

Pro Gln Gly Pro Pro Gly Glu Ile Gly Phe Pro Gly Gln Pro Gly Ala
485 490 495

Lys Gly Asp Arg Gly Leu Pro Gly Arg Asp Gly Val Ala Gly Val Pro
500 505 510

Gly Pro Gln Gly Thr Pro Gly Leu Ile Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly
515 520 525

Glu Pro Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys Gly
530 535 540

Asp Pro Gly Phe Pro Gly Gln Pro Gly Met Pro Gly Arg Ala Gly Ser
545 550 555 560

Pro Gly Arg Asp Gly His Pro Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Ser Pro
565 570 575

Gly Ser Val Gly Leu Lys Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Gly Val Gly
580 585 590

Phe Pro Gly Ser Arg Gly Asp Thr Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Tyr
595 600 605

Gly Pro Ala Gly Pro Ile Gly Asp Lys Gly Gln Ala Gly Phe Pro Gly
610 615 620

Gly Pro Gly Ser Pro Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Lys
625 630 635 640

Ile Val Pro Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Glu Gly Leu Pro Gly Ser
645 650 655

Pro Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Asp Arg Gly Phe Pro Gly Thr Pro
660 665 670

Gly Arg Pro Gly Leu Pro Gly Glu Lys Gly Ala Val Gly Gln Pro Gly
675 680 685

Ile Gly Phe Pro Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Val Asp Gly Leu Pro
690 695 700

Gly Asp Met Gly Pro Pro Gly Thr Pro Gly Arg Pro Gly Phe Asn Gly
705 710 715 720

Leu Pro Gly Asn Pro Gly Val Gln Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Val
725 730 735

Gly Leu Pro Gly Leu Lys Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Ile Pro Gly
740 745 750

Thr Pro Gly Glu Lys Gly Ser Ile Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Glu
755 760 765

His Gly Ala Ile Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Ile Arg Gly Glu Pro
770 775 780

Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Ser Val Gly Ser Pro Gly Val Pro Gly
785 790 795 800

Ile Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Pro Pro Gly Gly Gln Gly Pro Pro
805 810 815

ES 2 680 022 T3

Gly Leu Ser Gly Pro Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Phe Pro Gly
820 825 830

Phe Pro Gly Leu Asp Met Pro Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Ala Gln
835 840 845

Gly Leu Pro Gly Ile Thr Gly Gln Ser Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly
850 855 860

Gln Gln Gly Ala Pro Gly Ile Pro Gly Phe Pro Gly Ser Lys Gly Glu
865 870 875 880

Met Gly Val Met Gly Thr Pro Gly Gln Pro Gly Ser Pro Gly Pro Val
885 890 895

Gly Ala Pro Gly Leu Pro Gly Glu Lys Gly Asp His Gly Phe Pro Gly
900 905 910

Ser Ser Gly Pro Arg Gly Asp Pro Gly Leu Lys Gly Asp Lys Gly Asp
915 920 925

Val Gly Leu Pro Gly Lys Pro Gly Ser Met Asp Lys Val Asp Met Gly
930 935 940

Ser Met Lys Gly Gln Lys Gly Asp Gln Gly Glu Lys Gly Gln Ile Gly
945 950 955 960

Pro Ile Gly Glu Lys Gly Ser Arg Gly Asp Pro Gly Thr Pro Gly Val
965 970 975

Pro Gly Lys Asp Gly Gln Ala Gly Gln Pro Gly Gln Pro Gly Pro Lys
980 985 990

Gly Asp Pro Gly Ile Ser Gly Thr Pro Gly Ala Pro Gly Leu Pro Gly
995 1000 1005

Pro Lys Gly Ser Val Gly Gly Met Gly Leu Pro Gly Thr Pro Gly
1010 1015 1020

Glu Lys Gly Val Pro Gly Ile Pro Gly Pro Gln Gly Ser Pro Gly
1025 1030 1035

Leu Pro Gly Asp Lys Gly Ala Lys Gly Glu Lys Gly Gln Ala Gly
1040 1045 1050

Pro Pro Gly Ile Gly Ile Pro Gly Leu Arg Gly Glu Lys Gly Asp
1055 1060 1065

Gln Gly Ile Ala Gly Phe Pro Gly Ser Pro Gly Glu Lys Gly Glu
1070 1075 1080

Lys Gly Ser Ile Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Ser Pro Gly Leu
1085 1090 1095

Lys Gly Ser Pro Gly Ser Val Gly Tyr Pro Gly Ser Pro Gly Leu
1100 1105 1110

Pro Gly Glu Lys Gly Asp Lys Gly Leu Pro Gly Leu Asp Gly Ile
1115 1120 1125

Pro Gly Val Lys Gly Glu Ala Gly Leu Pro Gly Thr Pro Gly Pro
1130 1135 1140

ES 2 680 022 T3

Thr Gly Pro Ala Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Ser Asp Gly Ile
1145 1150 1155

Pro Gly Ser Ala Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Arg
1160 1165 1170

Gly Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ala Lys Gly Asp Lys Gly Ser Lys
1175 1180 1185

Gly Glu Val Gly Phe Pro Gly Leu Ala Gly Ser Pro Gly Ile Pro
1190 1195 1200

Gly Ser Lys Gly Glu Gln Gly Phe Met Gly Pro Pro Gly Pro Gln
1205 1210 1215

Gly Gln Pro Gly Leu Pro Gly Ser Pro Gly His Ala Thr Glu Gly
1220 1225 1230

Pro Lys Gly Asp Arg Gly Pro Gln Gly Gln Pro Gly Leu Pro Gly
1235 1240 1245

Leu Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Ile Asp Gly
1250 1255 1260

Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro Gly
1265 1270 1275

Val Pro Gly Pro Lys Gly Asp Pro Gly Phe Gln Gly Met Pro Gly
1280 1285 1290

Ile Gly Gly Ser Pro Gly Ile Thr Gly Ser Lys Gly Asp Met Gly
1295 1300 1305

Pro Pro Gly Val Pro Gly Phe Gln Gly Pro Lys Gly Leu Pro Gly
1310 1315 1320

Leu Gln Gly Ile Lys Gly Asp Gln Gly Asp Gln Gly Val Pro Gly
1325 1330 1335

Ala Lys Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Tyr Asp
1340 1345 1350

Ile Ile Lys Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Pro Glu Gly Pro Pro
1355 1360 1365

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Gln Gln
1370 1375 1380

Gly Val Thr Gly Leu Val Gly Ile Pro Gly Pro Pro Gly Ile Pro
1385 1390 1395

Gly Phe Asp Gly Ala Pro Gly Gln Lys Gly Glu Met Gly Pro Ala
1400 1405 1410

Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Pro Pro Gly Pro Asp
1415 1420 1425

Gly Leu Pro Gly Ser Met Gly Pro Pro Gly Thr Pro Ser Val Asp
1430 1435 1440

His Gly Phe Leu Val Thr Arg His Ser Gln Thr Ile Asp Asp Pro
1445 1450 1455

ES 2 680 022 T3

Gln Cys Pro Ser Gly Thr Lys Ile Leu Tyr His Gly Tyr Ser Leu
 1460 1465 1470

Leu Tyr Val Gln Gly Asn Glu Arg Ala His Gly Gln Asp Leu Gly
 1475 1480 1485

Thr Ala Gly Ser Cys Leu Arg Lys Phe Ser Thr Met Pro Phe Leu
 1490 1495 1500

Phe Cys Asn Ile Asn Asn Val Cys Asn Phe Ala Ser Arg Asn Asp
 1505 1510 1515

Tyr Ser Tyr Trp Leu Ser Thr Pro Glu Pro Met Pro Met Ser Met
 1520 1525 1530

Ala Pro Ile Thr Gly Glu Asn Ile Arg Pro Phe Ile Ser Arg Cys
 1535 1540 1545

Ala Val Cys Glu Ala Pro Ala Met Val Met Ala Val His Ser Gln
 1550 1555 1560

Thr Ile Gln Ile Pro Pro Cys Pro Ser Gly Trp Ser Ser Leu Trp
 1565 1570 1575

Ile Gly Tyr Ser Phe Val Met His Thr Ser Ala Gly Ala Glu Gly
 1580 1585 1590

Ser Gly Gln Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Cys Leu Glu Glu Phe
 1595 1600 1605

Arg Ser Ala Pro Phe Ile Glu Cys His Gly Arg Gly Thr Cys Asn
 1610 1615 1620

Tyr Tyr Ala Asn Ala Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Thr Ile Glu Arg
 1625 1630 1635

Ser Glu Met Phe Lys Lys Pro Thr Pro Ser Thr Leu Lys Ala Gly
 1640 1645 1650

Glu Leu Arg Thr His Val Ser Arg Cys Gln Val Cys Met Arg Arg
 1655 1660 1665

Thr

<210> 46
 <211> 1466
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 46

Met Met Ser Phe Val Gln Lys Gly Ser Trp Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

His Pro Thr Ile Ile Leu Ala Gln Gln Glu Ala Val Glu Gly Gly Cys
 20 25 30

Ser His Leu Gly Gln Ser Tyr Ala Asp Arg Asp Val Trp Lys Pro Glu
 35 40 45

Pro Cys Gln Ile Cys Val Cys Asp Ser Gly Ser Val Leu Cys Asp Asp
 50 55 60

10

ES 2 680 022 T3

Ile Ile Cys Asp Asp Gln Glu Leu Asp Cys Pro Asn Pro Glu Ile Pro
65 70 75 80

Phe Gly Glu Cys Cys Ala Val Cys Pro Gln Pro Pro Thr Ala Pro Thr
85 90 95

Arg Pro Pro Asn Gly Gln Gly Pro Gln Gly Pro Lys Gly Asp Pro Gly
100 105 110

Pro Pro Gly Ile Pro Gly Arg Asn Gly Asp Pro Gly Ile Pro Gly Gln
115 120 125

Pro Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Pro Pro Gly Ile Cys Glu Ser Cys
130 135 140

Pro Thr Gly Pro Gln Asn Tyr Ser Pro Gln Tyr Asp Ser Tyr Asp Val
145 150 155 160

Lys Ser Gly Val Ala Val Gly Gly Leu Ala Gly Tyr Pro Gly Pro Ala
165 170 175

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Thr Ser Gly His Pro Gly
180 185 190

Ser Pro Gly Ser Pro Gly Tyr Gln Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Gln
195 200 205

Ala Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Ile Gly Pro Ser
210 215 220

Gly Pro Ala Gly Lys Asp Gly Glu Ser Gly Arg Pro Gly Arg Pro Gly
225 230 235 240

Glu Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ile Lys Gly Pro Ala Gly Ile
245 250 255

Pro Gly Phe Pro Gly Met Lys Gly His Arg Gly Phe Asp Gly Arg Asn
260 265 270

Gly Glu Lys Gly Glu Thr Gly Ala Pro Gly Leu Lys Gly Glu Asn Gly
275 280 285

Leu Pro Gly Glu Asn Gly Ala Pro Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Ala
290 295 300

Pro Gly Glu Arg Gly Arg Pro Gly Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Arg
305 310 315 320

Gly Asn Asp Gly Ala Arg Gly Ser Asp Gly Gln Pro Gly Pro Pro Gly
325 330 335

Pro Pro Gly Thr Ala Gly Phe Pro Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Glu
340 345 350

Val Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Ser Asn Gly Ala Pro Gly Gln Arg
355 360 365

Gly Glu Pro Gly Pro Gln Gly His Ala Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly
370 375 380

Pro Pro Gly Ile Asn Gly Ser Pro Gly Gly Lys Gly Glu Met Gly Pro
385 390 395 400

ES 2 680 022 T3

Ala Gly Ile Pro Gly Ala Pro Gly Leu Met Gly Ala Arg Gly Pro Pro
405 410 415

Gly Pro Ala Gly Ala Asn Gly Ala Pro Gly Leu Arg Gly Gly Ala Gly
420 425 430

Glu Pro Gly Lys Asn Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Pro Arg Gly Glu
435 440 445

Arg Gly Glu Ala Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Ala Lys Gly Glu Asp
450 455 460

Gly Lys Asp Gly Ser Pro Gly Glu Pro Gly Ala Asn Gly Leu Pro Gly
465 470 475 480

Ala Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro
485 490 495

Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro
500 505 510

Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Ala Ala Gly Glu Pro Gly Arg Asp Gly
515 520 525

Val Pro Gly Gly Pro Gly Met Arg Gly Met Pro Gly Ser Pro Gly Gly
530 535 540

Pro Gly Ser Asp Gly Lys Pro Gly Pro Pro Gly Ser Gln Gly Glu Ser
545 550 555 560

Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Gln Pro Gly
565 570 575

Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Asn Asp Gly Ala Pro Gly Lys
580 585 590

Asn Gly Glu Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro
595 600 605

Gly Lys Asn Gly Glu Thr Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly
610 615 620

Pro Gly Gly Asp Lys Gly Asp Thr Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu
625 630 635 640

Gln Gly Leu Pro Gly Thr Gly Gly Pro Pro Gly Glu Asn Gly Lys Pro
645 650 655

Gly Glu Pro Gly Pro Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly
660 665 670

Gly Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Leu
675 680 685

Ala Gly Ala Pro Gly Leu Arg Gly Gly Ala Gly Pro Pro Gly Pro Glu
690 695 700

Gly Gly Lys Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Ala Gly
705 710 715 720

Thr Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Gly Leu Gly Ser
725 730 735

ES 2 680 022 T3

Pro Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Glu Pro Gly Gly Pro Gly Ala Asp
 740 745 750
 Gly Val Pro Gly Lys Asp Gly Pro Arg Gly Pro Thr Gly Pro Ile Gly
 755 760 765
 Pro Pro Gly Pro Ala Gly Gln Pro Gly Asp Lys Gly Glu Gly Gly Ala
 770 775 780
 Pro Gly Leu Pro Gly Ile Ala Gly Pro Arg Gly Ser Pro Gly Glu Arg
 785 790 795 800
 Gly Glu Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Pro Gly Ala Pro Gly
 805 810 815
 Gln Asn Gly Glu Pro Gly Gly Lys Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu
 820 825 830
 Lys Gly Glu Gly Gly Pro Pro Gly Val Ala Gly Pro Pro Gly Gly Ser
 835 840 845
 Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Val Lys Gly Glu Arg Gly
 850 855 860
 Ser Pro Gly Gly Pro Gly Ala Ala Gly Phe Pro Gly Ala Arg Gly Leu
 865 870 875 880
 Pro Gly Pro Pro Gly Ser Asn Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser
 885 890 895
 Gly Ser Pro Gly Lys Asp Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Asn Thr Gly
 900 905 910
 Ala Pro Gly Ser Pro Gly Val Ser Gly Pro Lys Gly Asp Ala Gly Gln
 915 920 925
 Pro Gly Glu Lys Gly Ser Pro Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Ala Pro
 930 935 940
 Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Ala Gly
 945 950 955 960
 Pro Pro Gly Met Pro Gly Pro Arg Gly Ser Pro Gly Pro Gln Gly Val
 965 970 975
 Lys Gly Glu Ser Gly Lys Pro Gly Ala Asn Gly Leu Ser Gly Glu Arg
 980 985 990
 Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Leu Ala Gly Thr Ala Gly
 995 1000 1005
 Glu Pro Gly Arg Asp Gly Asn Pro Gly Ser Asp Gly Leu Pro Gly
 1010 1015 1020
 Arg Asp Gly Ser Pro Gly Gly Lys Gly Asp Arg Gly Glu Asn Gly
 1025 1030 1035
 Ser Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly His Pro Gly Pro Pro Gly
 1040 1045 1050
 Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Ser Gly
 1055 1060 1065

ES 2 680 022 T3

Pro Ala Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Ser Arg Gly
 1070 1075 1080

Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly
 1085 1090 1095

Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile Lys Gly His Arg Gly Phe Pro Gly
 1100 1105 1110

Asn Pro Gly Ala Pro Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Gln Gln Gly
 1115 1120 1125

Ala Ile Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Gly Pro Val Gly
 1130 1135 1140

Pro Ser Gly Pro Pro Gly Lys Asp Gly Thr Ser Gly His Pro Gly
 1145 1150 1155

Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Asn Arg Gly Glu Arg Gly
 1160 1165 1170

Ser Glu Gly Ser Pro Gly His Pro Gly Gln Pro Gly Pro Pro Gly
 1175 1180 1185

Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Cys Cys Gly Gly Val Gly Ala Ala
 1190 1195 1200

Ala Ile Ala Gly Ile Gly Gly Glu Lys Ala Gly Gly Phe Ala Pro
 1205 1210 1215

Tyr Tyr Gly Asp Glu Pro Met Asp Phe Lys Ile Asn Thr Asp Glu
 1220 1225 1230

Ile Met Thr Ser Leu Lys Ser Val Asn Gly Gln Ile Glu Ser Leu
 1235 1240 1245

Ile Ser Pro Asp Gly Ser Arg Lys Asn Pro Ala Arg Asn Cys Arg
 1250 1255 1260

Asp Leu Lys Phe Cys His Pro Glu Leu Lys Ser Gly Glu Tyr Trp
 1265 1270 1275

Val Asp Pro Asn Gln Gly Cys Lys Leu Asp Ala Ile Lys Val Phe
 1280 1285 1290

Cys Asn Met Glu Thr Gly Glu Thr Cys Ile Ser Ala Asn Pro Leu
 1295 1300 1305

Asn Val Pro Arg Lys His Trp Trp Thr Asp Ser Ser Ala Glu Lys
 1310 1315 1320

Lys His Val Trp Phe Gly Glu Ser Met Asp Gly Gly Phe Gln Phe
 1325 1330 1335

Ser Tyr Gly Asn Pro Glu Leu Pro Glu Asp Val Leu Asp Val Gln
 1340 1345 1350

Leu Ala Phe Leu Arg Leu Leu Ser Ser Arg Ala Ser Gln Asn Ile
 1355 1360 1365

Thr Tyr His Cys Lys Asn Ser Ile Ala Tyr Met Asp Gln Ala Ser
 1370 1375 1380

ES 2 680 022 T3

Gly	Asn	Val	Lys	Lys	Ala	Leu	Lys	Leu	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Gly
1385						1390					1395			
Glu	Phe	Lys	Ala	Glu	Gly	Asn	Ser	Lys	Phe	Thr	Tyr	Thr	Val	Leu
1400						1405					1410			
Glu	Asp	Gly	Cys	Thr	Lys	His	Thr	Gly	Glu	Trp	Ser	Lys	Thr	Val
1415						1420					1425			
Phe	Glu	Tyr	Arg	Thr	Arg	Lys	Ala	Val	Arg	Leu	Pro	Ile	Val	Asp
1430						1435					1440			
Ile	Ala	Pro	Tyr	Asp	Ile	Gly	Gly	Pro	Asp	Gln	Glu	Phe	Gly	Val
1445						1450					1455			
Asp	Val	Gly	Pro	Val	Cys	Phe	Leu							
1460						1465								

DM_US:20506893_1

5 FRAGMENTOS PEPTÍDICOS PARA INDUCIR LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

11181.0034.NPUS00

ADN Seq. ver. 3.4

10 ??
 ??
 ??
 ??
 1

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un tetrapéptido que comprende la SEQ. ID NO: 10 (PKGP) o la SEQ ID NO: 9 (PEKP) para su uso como medicamento.
2. Un tetrapéptido que comprende la SEQ. ID NO: 10 (PKGP) o la SEQ ID NO: 9 (PEKP) para su uso como medicamento para el tratamiento de la piel dañada o en el mantenimiento de una piel sana.
- 10 3. Uso de un tetrapéptido que comprende la SEQ. ID NO: 10 (PKGP) o la SEQ ID NO: 9 (PEKP) como producto cosmético.
4. El tetrapéptido de las reivindicaciones 1-2 o el uso de un tetrapéptido de la reivindicación 3, en donde el tetrapéptido está amidado en el extremo carboxi.
- 15 5. Una composición farmacéutica para su uso como medicamento que comprende un tetrapéptido que comprende la SEQ. ID NO: 10 (PKGP) o la SEQ ID NO: 9 (PEKP) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el tetrapéptido está amidado en el extremo carboxi.
7. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en la que el tetrapéptido está presente en una concentración eficaz que varía de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml y, más preferentemente, varía de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml.
- 25 8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la composición está en forma de un aerosol, una emulsión, un líquido, una loción, una crema, una pasta, una pomada o una espuma.
- 30 9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso en un tratamiento de cuidado de la piel
- 35 10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en la que dicho uso comprende el tratamiento de la piel dañada y dicha piel dañada es resultado de envejecimiento, enfermedad, lesión, traumatismo o cirugía.
- 40 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho cuidado de la piel aborda la formación de arrugas, la tonificación, la firmeza y la flacidez de la piel.
12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en la que el tetrapéptido estimula la producción de colágeno cuando se aplica a la piel.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicho uso comprende la administración de la composición a la herida de un animal.
- 45 14. Un método in vitro para estimular la producción de colágeno por una célula, comprendiendo el método exponer una célula a un tetrapéptido que comprende la SEQ. ID NO: 10 (PKGP) o la SEQ ID NO: 9 (PEKP) induciendo de este modo la producción de colágeno por parte de la célula.
- 50 15. El método de la reivindicación 14, en el que la célula es un fibroblasto.

MGPRLSVWLL LLPAALLLHE EHSRAAAKGG CAGSGCGKCD CHGVKGQKGE
 RGLPGLQGVI GFPMQGP POGPPGQKGD TGEPGLPGTK GTRGPPGASG
 YPGNPGLPGI PGQDGPPGPP GIPGCNGTKG ERGPLGPPGL PGFAGNPGPP
GLPGMKGDPG EILGHVPGML LKGERGFPGI PGTPGPPGLP GLQGPVGP
FTGPPGPPGP PGPPGEGKQOM GLSFQGP KGDQGVSGPP GVPGQAQVQE
 KGDFATKGEK GQKGEPPGFQ MPGVGEKGEPP GKPGPRGKPG KDGDKGEKGS
PGFPGEPPYP GLIGRQGPQ EKGEAGPPGP PGIVIGTGPL GEKGERGYPG
 TPGPRGEPGP KGFPLGQ GPPGLPVP AGAPGFPER GEKDRGFPG
 TSLPGPSGRD GLP PPGQPYTNG IVECQPPG DQGPPGIPGQ
PGFIGEIGEK GQKGESCLIC DIDGYRPPG PGPPGEIGF PGQPGA
GLPGRDGVAG VPGQGTPL IGQPGA GEFYFDLRLK GDKGDPGFP
QPGMPGRAGS PGRDGHG GPKSGPSVG LKGERGPPG VGFP
GPPGPPGYGP AGPIGDKQA GFPGGPPG LP IVPLP
EGLPGSPGFP GPQDRGFPG TPGRPGLPE KGAVGQPGIG FPGPPGPKGV
DGLPGDMGPP GTPGRPGFNG LPGNPGVQ KGEPVGLPG LKGLPGLPGI
PGTPGEKGS IVPGVPEHG AIGPPGLQGI RGEPGPPGLP GSVGSPPG
IGPPGARGPP GGQPPGLSG PPGIKGEKGF PGFPGLDMPG PKGDKGAQGL
PGITGQSLP GLPQOAGP IPGFPSKGE MGVMGTPGQ GSPGVP
LPGEKGDHGF PGSSGPRGDP GLKGDKGDVG LP VDMGSMKGQK
 GDQGEKQIG PIGEKSRGD PGTPGVPGKD GQAGQPGOPG PKGDPGISGT
PGAPGLPGPK GSVGGMGLPG TPGEKGVPGI PGPQSPGLP GDKGAKGEK
QAGPPGIGIP GLRGEKGDQ IAGFPSPGE KGEKSGIGIP GMPGSPGLK
SPG PGLPGEKGD GLPGLDGIPG VKGEAGLPGT PGPTGPAGQK
GEPSDGI SAGEKGEPL PGRGFPGFP AKGDKGSKGE VGFPGLAGSP
GIPGSKGEQ FMGPPGQ PGLPGSPGHA TEGPKGDRGP QOQGLPGLP
GPMGPPGLPG IDGVKGDKN PGWPGAPVP GPKGDPGFQ MPGIGGSPGI
TGSKGDMGPP GVPGFQGP LPGLQGIKGD QGDQGVPAK GLP
PYDIKGEPP LPGPEGPPGL KGLQGLPGPK GQQVTVLVG IPGPPGIPGF
DGAPGQK GPAGPTGPRG FPGPPGPDGL PGSMGPPGTP SVDHGFLVTR
 HSQTIIDPQC PSGTKILYHG YSLLYVQNE RAHQDLGTA GSCLRKFSTM
 PFLFCNINNV CNFASRNDYS YWLSTPEPMP MSMAPITGEN IRPFISRC
 CEAPAMVMAY HSQTIQIPPC PSGWSSLWIG YSFVMHTSAG AEGSQALAS
 PGSCLEEFRS APFIECHGRG TCNYYANAYS FWLATIERSE MFKKPTPSTL
 KAGELRTHVS RCQVCMRRT

FIG. 1

MMSFVQKGSW LLLALLHPTI ILAQQEAVEG GCSHLGQSYA DRDVWKPEPC
 QICVCDSGSV LCDDIICDDQ ELDCPNPEIF FGECCAACPQ PPTAPTRPPN
 QGGPQGPCKGD PGPPGIPGRN GDPGIPGQPG SPGSPGPPGI CESCPTGPQN
 YSPQYDSYDV KSGVAVGGLA GYPGPAGPPG PPGPPGTSGH PGSPGSPGYQ
 GPPGEPGQAG PSGPPGPPGA IGPSGPAGKD GESGRPGRPG ERGLPGPPGI
 KGPAGIPGFP GMKGHRGFDG RNGEKGETGA PGLKGENGLP GENGAPGPMG
 PRGAPGERGR PGLPGAAGAR GNDGARGSDG QPGPPGPPGT AGFPSPGAK
 GEVGPAGSPG SNGAPGORGE PGQGHAGAQ GPPGPPGING SPGGKGEMGP
 AGIPGAPGLM GARGPPGAG ANGAPGLRGG AGEPGKNGAK GE**PGPR**GERG
 EAGIPGVPGA KGEDGKDGSP GEPGANGLPG AAGERGAPGF RGPAGPNGIP
 GEKGPAGERG APGPAGPRGA AGEPRDGVV GPGMRGMPG SPGGPGSDGK
 PGPPGSQGES GRPGPPGPSG PRGQPGVMGF PGPKGNDGAP GKNGERGGPG
 GPGPQGPCK NGETGPQGGP GPTGPGGDKG DTGPPGPQGL QGLPGTGGPP
 GENGKPGEPG PKGDAGAPGA PGGKGDAGAP GERGPPGLAG APGLR**GAGP**
 PGPEGKGA GPPGPPGAAG TPGLQGMPE RGGLGSPGPK GDKGEPGGPG
 ADGVPKGDGP RGPTGPIGPP GPAGQPGDKG EGGAPGLPGI AGPRGSPGER
 GETGPPGPAG FPGAPQNGE PGGKGERGAP GEKGEPPG VAGPPGSGP
 AGPPGPQGVK GERGSPGGPG AAGFPARGL PGPPGSNGNP GPPGSPGSPG
 KDGP GPAGN TGAPGSPGVS GPKGDAGQPG EKGSPGAQGP PGAPGPLGIA
 GITGARGLAG PPGM**PGPRGS** PGQGVKGES GKPGANGLSG ERGPPGPQGL
 PGLAGTAGEP GRDGNPGSDG LPGRDGSPPG KDRGENGSP GAPGAPGHPG
 PPGPVGPAGK SGDRGESGPA GPAGAPGPAG SRGAPGPQGP RGDKGETGER
 GAAGIKGHRG FPGNPGAPGS PGPAGQQGAI GSPGPAGPRG PVGSPGPPGK
 DGTSGHGPI G**PPGPRGNRG** ERGSEGSPPH PGQPGPPGPP GAPGPCCGV
 GAAAIAGIGG EKAGGFAPYY GDEPMDFKIN TDEIMTSLKS VNGQIESLIS
 PDGSRKNPAR NCRDLKFCHP ELKSGEYWVD PNQGCKLDAI KVFCNMETGE
 TCISANPLNV PRKHWWTDSS AEKKHVWFGE SMDGGFQFSY GNPELPELVL
 DVQLAFLRLI SRRASQNTY HCKNSIAYMD QASGNVKKAL KLMGSNEGEF
 KAEGNSKFTY TVLEDGCTKH TGEWSKTVFE YRTRKAVRLP IVDIAPYDIG
 GPDQEFQVDV GPVCFI

FIG. 2

MGPRLSVWLL LLPAALLLHE EHSRAAAKGG CAGSGCGKCD CHGVKGQKGE
 RGLPGLQGVI GFPGMQGPPEG PQGPPGQKGD TGEPGLPGTK GTRGPPGASG
 YPGNPGLPGI PGQDGP**PGPP** GIPGCNGTKG ERGPLGPPGL PGFAGN**PGPP**
 GLPGMKGDPG EILGHVPGML LKGERGFPGI PGT**PGPP**GLP GLQGPVGPFG
 FTGPP**PGPP**GF **PGPP**GEKQOM GLSFQGPKGD KGDQGVSGPP GVPGQAQVQE
 KGDFATKGEK **GQKGE**PGFQG MPGVGEKGEK GKPGPRGKPG KDGDKGEKGS
 PGFFGEPGYP GLIGRQGPQG EKGEAG**PGP** **PG**IVIGTGPL GEKGERGYPG
 TPGRGEPGP KGFPGLPGQP GPPGLPVPQO AGAPGFPPER GEKGDGRFPG
 TSLPGPSGRD **GLPGPP**GSPP PPGQPGYTNG IVECQ**PGPP**G DQGPPGIPGQ
 PGFIGEIGEK GQKGESCLIC DIDGYRGPFG PQGPPGEIGF PGQPGAKGDR
 GLPGRDGVAG VPGPQGTPL IGQPGAKGEP GEFYFDLRLK GDKGDPGFPG
 QPGMPGRAGS PGRDGHGGLP GPKGSPGSVG LKGERGPPGG VGFPGSRGDT
 GPP**PGPP**GYGP AGPIGDKGQA GFFGGPGSPG LPGPKGEPGK IVPL**PGPP**GA
 EGLPGSPGFP GPQGDGRGFP TPGRPGLPGE KGAVGQPGIG **FGPP**GPKGV
 DGLPGDMGPP GTPGRPGFNG LPGNPGVQGO KGEFVGLPG LKGLPGLPGI
 PGTPGEKGS I GVPGVPEHG AIGPPGLQGI RGE**PGPP**GLP GSVGSPGVPG
 IGPPGARGPP GGQPPGLSG PPGIKGEKGF PGFPGLDMPG PKGDKAQGL
 PGITGQSGLP GLPGQQGAPG IPGFPGSKGE MGVMGTPGQP GSPGPVGAAG
 LPGEKGDHGF PGSSGPRGDP GLKGDKGDVG LPGKPGSMDK VDMGSMKGQK
 GDQGEKQIG PIGEKGSRGD PGTPGVPGKD GQAGQPGQPG PKGDPGISGT
 PGAPGLPGPK GSVGGMGLPG TPGEKGVPGI PGPQSPGLP GDKGAKGEK
 QAGPPGIGIP GLRGEKGDQG IAGFPSPGPE KGEKSGIGIP GMPGSPGLK
 SPGSVGYPGS PGLPGEKGDK GLPGLDGI PG VKGEAGLPGT PGPTGPAGQK
 GEPGSDGIPG SAGEKGEFGL PGRGFPGFPG AKGDKGSKGE VGFPLAGSP
 GIPGSKGEQG FMGPPGPQGO PGLPGSPGHA TEGPKGDRGP QGQPLPGLP
 GPMGPPGLPG IDGVKGDKGN PGWPGAPGVF GPKGDPGFQG MPGIGGSPGI
 TGSKGDMGPP GVPGFQGPKG LPGLQGIKGD QGDQGVPGAK **GLPGPP**GPPG
 PYDIIKGEPE LPGPEGPPGL KGLQGLPGPK GQQGVTGLVG **IPGPP**GIPGF
 DGAPGQKGEM GPAGPTGPRG **FGPP**PGDGL PGSMGPPGTP SVDHGFLVTR
 HSQTIDDPQC PSGTKILYHG YSLLYVQNE RAHQDLGTA GSCLRKFSTM
 PFLFCNINNV CNFASRNDYS YWLSTPEPMP MSMAPITGEN IRPFISRCV
 CEAPAMVMAV HSQTIQIPPC PSGWSSLWIG YSFVMHTSAG AEGSGQALAS
 PGSCLEEFRS APFIECHGRG TCNYYANAYS FWLATIERSE MEKKPTPSTL
 KAGELRTHVS RCQVCMRRT

FIG. 3