

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237001**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **425597**

(22) Data zgłoszenia: **16.05.2018**

(51) Int.Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(54) **Nowy związek peptydowy jako czynnik stymulujący gojenie ran i rekonstrukcję skóry**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.11.2019 BUP 24/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

08.03.2021 WUP 05/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL
POLITECHNIKA GDAŃSKA, Gdańsk, PL
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, Gdańsk, PL
INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
IM. MARCELEGO NENCKIEGO POLSKIEJ AKADEMII
NAUK, Warszawa, PL
MEDVENTURES SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ W LIKWIDACJI, Poznań, PL
PROSCIENCE POLSKA SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

JUSTYNA SAWICKA, Gdańsk, PL
MARIA DZIERŻYŃSKA, Sopot, PL
MILENA DEPTUŁA, Gdańsk, PL
ANNA WARDOWSKA, Banino, PL
PIOTR SAS, Gdynia, PL
PAWEŁ SOSNOWSKI, Ruda, PL
EMILIA IŁOWSKA, Elbląg, PL
PAULINA LANGA, Gdańsk, PL
FRANCISZEK KASPRZYKOWSKI, Pruszcz Gdański, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Małgorzata Matyka

PL 237001 B1

Opis wynalazku

STAN TECHNIKI

Skóra jest największym organem ludzkiego ciała, który pełni niezwykle ważną rolę jaką jest ochrona przed czynnikami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi (wirusy, bakterie, grzyby). Zdolność skóry do regeneracji/naprawy jest niezbędna do utrzymania pełnej homeostazy organizmu oraz zapewnienia ochrony przed czynnikami zewnętrznymi. Proces naprawy i regeneracji skóry jest zależny od wielu rodzajów komórek i czynników takich jak: komórki macierzyste, komórki zróżnicowane (np. keratynocyty, fibroblasty), czynniki wzrostu, cytokiny oraz macierz zewnątrzkomórkowa. Naturalną odpowiedzią na uraz skóry jest m.in. aktywacja fibroblastów i uruchomienie procesu gojenia rany.

Fibroblasty posiadają zdolność do szybszego wypełniania dużych ubytków skóry w porównaniu do keratynocytów (odpowiedzialnych za naskórkowanie). Dlatego organizm jest w stanie naprawić uszkodzoną tkankę, wytworzyć nową tkankę, która ma właściwości podobne do pierwotnej tkanki. W przypadku niewielkich ran proces gojenia jest na tyle efektywny że nie powstają blizny. Jednak komórki tkanki łącznej i inne komórki narządów są zależne od zakotwiczenia i aby wykazywać normalne zachowanie fizjologiczne, wymagają one rusztowania. Gdy uszkodzenie tkanki jest rozległe lub występują duże przerwy, komórki migrujące do rany, mogą nie znaleźć właściwego zakotwiczenia i wytwarzać znaczne ilości kolagenu, aby wypełnić lukę pomiędzy zdrową tkanką na krawędziach rany. W ten sposób tworzą się blizny. Tkanka blizn nie ma takich samych właściwości mechanicznych i biologicznych jak pierwotna tkanka. Na przykład blizny w skórze nie są tak elastyczne jak pierwotna tkanka. Niektóre tkanki, takie jak chrząstka stawowa, nie regenerują się w sposób naturalny, a leczenie odbywa się jedynie poprzez tworzenie tkanki bliznowatej.

Gojenie rany to proces złożony z kilku nachodzących na siebie faz, spośród których można wymienić: stan zapalny, proliferację oraz przebudowę. Podczas gojenia rany aktywowane są zarówno komórki układu immunologicznego (szczególnie w pierwszych dniach gojenia) neutrofile, limfocyty, komórki tuczne oraz komórki naskórka (keratynocyty) i komórki skóry właściwej (fibroblasty). Z biologicznego i klinicznego punktu widzenia, krytycznym dla organizmu etapem gojenia rany jest jej zamknięcie, które wiąże się przede wszystkim z utworzeniem naskórka (naskórkowanie) na całej powierzchni rany a następnie odbudowa skóry właściwej. Proces naskórkowania poprzedzony jest często utworzeniem tzw. ziarniny, tkanki która ułatwia migrację keratynocytów i fibroblastów oraz poprawia ukrwienie miejsca rany. Ziarninowanie występuje szczególnie, gdy nie dochodzi do zamknięcia rany i pełnego naskórkowania. Utworzony naskórek we wstępnej fazie nie jest w pełni zróżnicowany zapewnia jednak utworzenie bariery między czynnikami zewnętrznymi (szczególnie mikroorganizmami) a tkankami organizmu człowieka. Niweluje to ryzyko rozwoju infekcji zarówno miejscowej, jak i systemowej (ogólnoustrojowej). W pełni wykształcony naskórek to nabłonek wielowarstwowy w skład którego wchodzi głównie keratynocyty (ponad 90%), jak również melanocyty, komórki dendrytyczne, komórki tuczne oraz limfocyty. Ze względu na kluczowe znaczenie utworzenia naskórka poszukuje się leków/związków, które będą przyspieszały naskórkowanie w ranach przewlekłych, rozległych ubytkach skóry oraz oparzeniach. Proces odnowy i naprawy naskórka jest uzależniony przede wszystkim od obecności komórek macierzystych oraz nisko zróżnicowanych keratynocytów, które mogą stanowić cel dla działania nowych leków. Proces naprawy skóry jest regulowany/stymulowany przez czynniki wzrostu, cytokiny oraz macierz zewnątrzkomórkową.

Współcześnie dużym problemem medycznym, obok trudno gojących się ran, na przykład u osób cierpiących na cukrzycę, są blizny przerostowe oraz keloidy, będące następstwem patologicznej przebudowy skóry. Nieprawidłowe gojenie ran jest poważnym problemem, który dotyka miliony ludzi na całym świecie. Przyspieszenie regeneracji skóry jest również coraz częściej potrzebne w dziedzinie chirurgii plastycznej, gdzie do leczenia problemów skórnych (np. trądzik bliznowy, blizny przerostowe, keloidy, znamiona i znamiona pigmentacyjne) używa się lasera. Obecnie po zabiegu laserowym, na skórę nakłada się maść oraz odpowiedni materiał opatrunkowy. Zwykle rekonstrukcja skóry trwa tydzień, co wiąże się z ryzykiem zakażeń bakteryjnych. Dlatego niezwykle potrzebne są materiały przyspieszające odbudowę i regenerację skóry.

Jedną z metod leczenia ran jest zastosowanie różnego rodzaju konstruktów tkankowych opartych na rusztowaniach i umieszczonych w nich komórkach. Rusztowania, najczęściej żelowe, powinny być biokompatybilne i nie wywierać efektów cytotoksycznych oraz nie indukować procesów immunologicznych (zapalenia, reakcji alergicznych). W rusztowaniach umieszcza się różnego rodzaju komórki, najczęściej wyhodowane in vitro, takie jak keratynocyty, fibroblasty lub mezenchymalne komórki macierzy-

ste. Wciąż poszukuje się nowych biomateriałów, które nie będą wywierały efektów niepożądanych oraz jednocześnie będą stymulowały gojenie ran. Przykładem takiego materiału jest żel fibrynowy.

Bardzo ważną właściwością rusztowań żelowych jest również ich struktura, która powinna pozwalać na przenikanie substancji odżywczych/czynników wzrostu do komórek. Pozwala to na przeżycie komórek nawet przez wiele dni w żelu oraz ich migrację z żelu do miejsca rany. Takie komórki mogą następnie odbudowywać naskórek i skórę właściwą poprzez proliferację/podziały komórek oraz wytwarzanie czynników wzrostu, które w sposób parakryny stymulują gojenie rany.

Konwencjonalne materiały opatrunkowe na rany wykonane są z kwasu alginowego lub polimeru syntetycznego i służą jedynie do ochrony powierzchni rany. Istnieją również opatrunki, które wchłaniają wysięk z rany oraz zachowują wilgotne środowisko rany przez co przyspieszają regenerację. Materiały te mają niewielki wpływ na pobudzanie infiltracji komórek zaangażowanych w gojenie się rany. Istnieją również materiały opatrunkowe, które stymulują gojenie rany zapewniając komórkom, infiltrującym ranę, rusztowanie, dzięki któremu mogą one lepiej spenetrować ubytek w tkance i odtworzyć go. Chociaż opracowano różne syntetyczne i naturalne materiały do regeneracji tkanek, często wywołują one odpowiedź i immunologiczną organizmu. Ponadto są one pochodzenia zwierzęcego i niosą potencjalne ryzyko infekcji wirusowej lub innej. W związku z tym wciąż poszukuje się materiałów, które mają lepszą kompatybilność biologiczną niż te całkowicie sztuczne, stanowią mniejsze ryzyko zakażenia i zapewniają tkankom właściwe i biomechaniczne właściwości po regeneracji.

Do tego typu materiałów należą samoorganizujące się peptydy, które tworzą hydrożele i są nowymi biomateriałami stosowanymi w inżynierii tkankowej. Samoorganizujące się peptydy posiadają sekwencję aminokwasową z powtórzeniami naprzemiennie ułożonych naładowanych aminokwasów hydrofitycznych i neutralnych aminokwasów hydrofobowych. W swojej sekwencji aminokwasowej posiadają aminokwasy które w łańcuchach bocznych posiadają naprzemiennie ładunki dodatnie i ujemne. Hydrożele peptydowe ulegają biodegradacji, a produkty degradacji nie mają niepożądanego wpływu na tkanki i posiadają wysoką bioabsorbowalność. Ponadto hydrożele peptydowe są produktami syntetycznymi, powstałymi podczas syntezy chemicznej, przez co pozbawione są ryzyka zakażeń pochodzenia zwierzęcego. Peptydy takie samoorganizują się w hydrożele zawierające nanowłókna o średnicy około 10 nm do 20 nm, które układają się w sieć. Tak utworzona struktura sieci ma rozmiary włókien i wielkości porów zbliżone do naturalnej macierzy pozakomórkowej (ECM). Stąd znalazły one zastosowanie jako rusztowania do hodowli komórkowej.

Hydrożele peptydowe można wykorzystać jako substancje ułatwiające gojenie się ran. Można je również stosować do gojenia ran przewlekłych, takich jak zmiany skórne i owrzodzenia cukrzycowe. Hydrożele peptydowe można również stosować do wzmożonej regeneracji tkanek w nieoperacyjnych ranach. Mogą one być wstrzykiwane, przez co nie ma potrzeby powiększania rozmiaru rany podczas zabiegu chirurgicznego. Hydrożel nie musi mieć kształtu dopasowanego do rany a raczej wypełnia miejsce rany tak, jak ciecz przez co jest łatwy w użyciu i łatwo penetruje mikroszczeliny na jej krawędziach.

Alternatywnie lub dodatkowo, żele peptydowe mogą być stosowane jako środki wypełniające. Na przykład, żele peptydowe lub ich roztwory mogą być wstrzykiwane pod skórę w celu wypełnienia ubytków tkankowych, powstałych na skutek operacji czy blizn. Mogą być również stosowane w medycynie estetycznej zamiast zastrzyków z kolagenu lub z kwasu hialuronowego, po to aby pobudzić zwiotczałą skórę do produkcji kolagenu i wypełnić zmarszczki. Duże wgłębienia mogą również powstać w wyniku dużych ran podskórnych, na przykład ciężkich uszkodzeń czaszki lub żuchwy. Żele peptydowe można stosować do ich wypełniania. Hydrożele peptydowe mogą również służyć do powiększania piersi. Można je wstrzykiwać również podskórnie, aby powodować rozciąganie skóry potrzebnej do zabiegu chirurgicznego (np. przeszczep skóry). Ciśnienie powstałe na skutek wstrzyknięcia hydrożelu rozciąga istniejącą skórę. Organizm, aby złagodzić to ciśnienie, wytwarza więcej skóry w obszarze hydrożelu.

Hydrożele peptydowe mogą być stosowane do wzmacniania wewnętrznych tkanek. Na przykład, mogą być wstrzykiwane do cewki moczowej, aby zapobiec refluksowi. W powiązaniu zastosowaniu opisane tutaj żele można stosować do embolizacji. Na przykład, żele peptydowe mogą być wstrzykiwane do naczyń krwionośnych wokół guza lub naczyń, które zostały odcięte podczas operacji, aby zatrzymać przepływ krwi. Alternatywnie lub dodatkowo, żele mogą być wstrzykiwane pomiędzy tkanki, szczególnie po zabiegu chirurgicznym, aby zapobiec przyleganiu tkanek. Żele wstrzyknięte w otwarte rany mogą pomóc w zapobieganiu przyleganiu opatrunków do leżących pod nimi tkanek. Alternatywnie, żele można wstrzykiwać pod brzuszną okostną, aby zapobiec tworzeniu zrostów po operacji brzusznej. Hydrożele można także wstrzykiwać do mięśnia sercowego, aby

stymulować wytwarzanie mięśni serca, co opisano w amerykańskim zgłoszeniu wynalazku US 2004/0242469, czy US 7 429 567.

Hydrożele można również wykorzystywać do leczenia wad ortopedycznych, gdzie żele samoorganizujące się mogą być umieszczone wokół implantów dentystycznych, aby wypełnić lukę pomiędzy implantem i otaczającą go tkanką oraz wzmocnić wrastanie tkanki w implanty. Żele można wstrzykiwać do zdeformowanej chrząstki lub defektów kostno-chrzęstnych, aby zapobiec tworzeniu się blizny i zwiększyć swobodę ruchu. Żele mogą być również stosowane do powlekania wewnętrznych powierzchni lub wypełniania porów w rusztowaniach kostnych (US 8,546,529 B2; US 9.670.249). Alternatywnie lub dodatkowo, cząsteczki ceramiczne, zwłaszcza krystaliczne, półkrystaliczne lub bezpostaciowe materiały z fosforanu wapnia, można łączyć z roztworami peptydu w celu wytworzenia kompozycji do wstrzykiwania.

W dowolnym z opisanych powyżej zastosowań roztwory peptydów można wstrzykiwać przed żelowaniem w dowolnym miejscu, do którego będą zdolne dotrzeć jednowartościowe jony z otaczającej tkanki. Na przykład, gdy wymagana jest długa lub wąska igła lub gdy korzystne jest, aby żel przeniknął gęstą tkankę, wówczas wstrzyknięcie przed żelowaniem pozwala na to, że płynny materiał, który generuje mniejsze przedwciśnienie podczas wstrzykiwania, będzie lepiej przenikał do gęstych tkanek włóknistych i pomiędzy zmineralizowanymi fragmentami kostnymi. Zamiast spływać po stronie rany, płyn ulega samozasilaniu nawet przed wystawieniem na działanie elektrolitu. Gdy siła jonowa płynu w miejscu wstrzyknięcia jest niewystarczająca, roztwór peptydu można wstrzyknąć po żelowaniu lub można dokonać dostrzyku z samym roztworem elektrolitu.

Opcjonalnie do żeli peptydowych można dodać jedną lub więcej biologicznie aktywnych substancji, na przykład, terapeutycznie aktywnych związków lub chemoatraktantów. Przykłady takich związków obejmują syntetyczne cząsteczki organiczne, naturalnie występujące cząsteczki organiczne, cząsteczki kwasu nukleinowego, białka biosyntetyczne, takie jak chemokiny i modyfikowane naturalnie występujące białka. Żele peptydowe mogą również służyć jako nośniki dla leków przeciwzapalnych lub przeciwbólowych. Ponieważ ulegają stosunkowo szybkiej degradacji, można do nich dodać środki przeciwzapalne lub przeciwbólne bez obawy, że będą w sposób ciągły dostarczane w miejscu rany przez wiele miesięcy. Ponadto silne środki przeciwbólne mogą być dostarczane lokalnie do miejsca rany, bez konieczności ich systematycznego aplikowania. Hydrożele peptydowe mogą również służyć do podawania leków przeciwnowotworowych w ściśle określone miejsce. Lek taki może się uwalniać szybko lub przez okres kilku dni lub tygodni w zależności od budowy hydrożelu peptydowego. Alternatywnie lub dodatkowo, środki przeciwnowotworowe mogą być lokalnie dostarczane do miejsca, z którego usunięto nowotwór. Żele peptydowe mogą być stosowane jako magazyny leków do przechowywania leków i uwalniania ich przez długi czas np. białka które mogą być uwalniane przez okres dni, tygodni lub miesięcy bez utraty ich aktywności biologicznej. Biologicznie aktywne substancje mogą być również kowalencyjnie związane z łańcuchami peptydowymi, pod warunkiem że nie zaburzają one samoorganizacji łańcuchów peptydowych.

Znane są hydrożele peptydowe RADA gdzie do sekwencji samoorganizującego się hydrożelu dołączona jest sekwencja aminokwasowa odpowiedzialna za rozpoznawanie komórki. Sekwencja peptydowa RADA została opisana w patentach USA nr 5,670,483 B i US 5,955,343 B oraz w zgłoszeniu patentowym US 09/778200 A. Hydrożele takie promują proliferację komórek oraz mogą działać jak chemoatraktanty. Aby zwiększyć wytrzymałość mechaniczną rusztowań peptydowych do sekwencji aminokwasowej peptydu można wprowadzić resztę cysteiny. Umożliwia ona tworzenie sieciujących wiązań disulfidowych. Okres półtrwania in vivo rusztowań może być także modulowany przez włączenie w sekwencję aminokwasową miejsc cięcia przez proteazy (najczęściej metaloproteiny), umożliwiając szybką, enzymatyczną degradację rusztowania peptydowego.

Materiał do gojenia się rany i rekonstrukcji skóry według niniejszego wynalazku zawiera jako główny składnik samoorganizujący się amfifilowy peptyd, mający od 28 do 200 reszt aminokwasowych. Fragment peptydu posiada okresowe powtórzenia naprzemiennych aminokwasów hydrofitycznych i aminokwasów hydrofobowych, które tworzą stabilną strukturę β -kartki w wodnym roztworze w obecności jednowartościowego jonu. Ponadto, C-koniec peptydu jest amidem. W zgłoszeniu tym aminokwas hydrofityczny kwasowy to kwas asparaginowy lub kwasu glutaminowy oraz hydrofityczny aminokwas zasadowy to arginina, lizyna lub histydyna. Alanina, walina, leucyna, izoleucyna, metionina, fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan, seryna, treonina lub glicyna mogą być stosowane jako aminokwasy hydrofobowe. Dla samoorganizujących się peptydów można zastosować sekwencje z okresowymi powtórzeniami naprzemiennie argininy, alaniny, kwasu asparaginowego i alaniny (RADA).

CEL WYNAŁAZKU

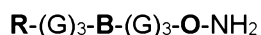
Celem wynalazku jest dostarczenie nowych struktur peptydu RADA, sposobu ich wytwarzania oraz zastosowanie samoorganizujących się hydrożeli peptydowych do regeneracji skóry. Hydrożele te składają się wyłącznie z peptydów, które ulegają samoorganizacji. Peptydy RADA-2, 3, 4 i 6 mają od 28 do 36 reszt aminokwasowych i występują w postaci ciekłej, gdy pH roztworu nie jest wyższe niż 5,0 ale zwiększając jego pH powyżej 5,0 do ok. 8,0 peptydy o stężeniu 0,25–1% w/w formują się w nanowłókna, około 10 nm średnicy, w wyniku czego roztwór peptydu tworzy hydrożel.

Peptydy te posiadają trzy charakterystyczne fragmenty sekwencji aminokwasowej tj. fragment pierwszy posiada sekwencję aminokwasową RADARADARADARADA, fragment drugi sekwencję aminokwasową specyficzną dla elastazy neutrofilowej AAPV, enzymu uczestniczącego w przebudowie uszkodzonej skóry, a fragment trzeci to sekwencja aminokwasowa o potwierdzonych właściwościach proliferacyjnych, regeneracyjnych, angiogennych lub przeciwzapalnych.

Istotą wynalazku jest użycie sekwencji aminokwasowej specyficznej dla elastazy, która po cięciu enzymatycznym uwalnia sekwencję aktywną biologicznie do otoczenia. Znane są przykłady hydrożeli zawierających w sekwencji miejsce cięcia dla metaloproteinaz. Sekwencje te są wprowadzane w celu przyspieszenia degradacji rusztowania peptydowego w otoczeniu komórek. W niniejszym wynalazku sekwencja specyficzna dla enzymu stanowi miejsce odcięcia peptydu o określonej aktywności biologicznej.

Biomateriał służący do gojenia się rany i rekonstrukcji skóry według niniejszego wynalazku przyspiesza gojenie obszaru rany ssaków, a jednocześnie materiał nie posiada ryzyka związanego z wywołaniem reakcji alergicznej czy przenoszenia choroby zakaźnej. Biomateriały te mogą znaleźć zastosowanie jako środki do regeneracji tkanki złożonej i/lub leczenia ran wywołanych przez uszkodzenia mechaniczne i/lub chemiczne i/lub termiczne i/lub radiacyjne i/lub operacje chirurgiczne i/lub inne stany patologiczne.

Przedmiotem wynalazku jest związek o ogólnym wzorze:



gdzie:

R- oznacza sekwencję aminokwasową **RADARADARADARADA**

B oznacza sekwencję aminokwasową AAPV specyficzną dla elastazy neutrofilowej

G oznacza aminokwas o nazwie glicyna

O oznacza sekwencję aminokwasową aktywną biologicznie w zakresie przyspieszenia gojenia ran skóry.

Związek, gdzie **O** = HK, KGHK, RDKVYR, RLIDRTNANF

Związek posiada sekwencję przedstawioną na Seq.ID 1–4.

Sposób otrzymywania związku zdefiniowanego powyżej, który obejmuje następujące etapy:

- a) przygotowanie żywicy amidowej TentGel R RAM;
- b) deprotekcję osłony blokującej Fmoc, w 20% roztworze piperidyny w DMF;
- c) przemywanie żywicy 4 x DMF;
- d) wykonanie testu chloranilowego;
- e) reakcję acylowania poprzez przyłączenie Fmoc-chronionego aminokwasu wspomaganie promieniowaniem mikrofalowym, przy użyciu 0,5 M roztworu DIC w DMF oraz 1 M (Fhydroksyimino)cyjanooctanu etylu;
- f) przemywanie żywicy DMF;
- g) wykonanie testu chloranilowego;
- h) powtarzanie etapów od b) do g) aż do momentu uzyskania peptydu z zastrzeżenia 1;
- i) odszczepienie peptydu od żywicy z jednoczesnym usunięciem osłon znajdujących się na łańcuchach bocznych za pomocą mieszaniny TFA:TIPSI:H₂O (92:4:4, v/v/v);
- j) odsączenie, wytrącenie eterem schłodzonym w ciekłym azocie, rozpuszczenie osadu Et₂O, przemycie trzykrotne i liofilizacja;
- k) analizę i oczyszczanie za pomocą HPLC;
- l) wykonanie widm spektrometrii mas w celu potwierdzenia tożsamości peptydu.

Sposób żelowania związku zdefiniowanego powyżej, który obejmuje następujące etapy:

- a) 5 mg peptydu odważa się do naczynia, dodaje się 0,5 ml wody Mili-Q, miesza się,
- b) naczynie odstawia się w temperaturze pokojowej na 2 h do uzyskania półpłynnego roztworu, następnie dodaje się 0 2 ml PBS o pH 7,4,

- c) uzyskany roztwór inkubuje się przez 1 h w temperaturze pokojowej, następnie usuwa się nadmiar cieczy z powierzchni żelu.

Sposób, gdzie peptyd RADA o Seq. ID 4 w etapie b) umieszcza się w cieplarni w temperaturze 37°C na 3 godziny po upływie tego czasu uzyskuje się gęsty żel.

Kompozycja farmaceutyczna, która zawiera związek określony powyżej oraz co najmniej jeden dopuszczalny farmaceutycznie rozcieńczalnik.

Kompozycja farmaceutyczna może być aplikowana miejscowo a także stosowana doodbytniczo.

Kompozycja farmaceutyczna, gdzie aplikacje mogą być w formie roztworu lub hydrożelu.

Kompozycja ma zastosowanie do pobudzania gojenia i regeneracji ran, w tym do odtwarzania wytworów skóry i mięśniówki.

Związek określony powyżej do zastosowania do pobudzania gojenia ran wywołanych przez uszkodzenia mechaniczne, chemiczne, termiczne, radiacyjne, operacje chirurgiczne lub stany patologiczne.

Związek do zastosowania do pobudzenia gojenia ran następuje poprzez przyspieszone naskórkowanie rany.

Związek do zastosowania do gojenia ran obejmuje rany skóry, naskórka, mieszków włosowych, włosów, gruczołów potowych i mięśniówki.

Zestaw do pobudzenia gojenia ran, który zawiera związek określony w zastrzeżeniu 1 oraz urządzenie aplikujące.

Zestaw, gdzie urządzeniem aplikującym może być na przykład cewnik, igła, strzykawka lub ich kombinacja.

Określenia stosowane powyżej oraz w opisie i zastrzeżeniach patentowych, mają następujące znaczenie:

Termin „**zranienie**” odnosi się do rany, takiej jak otarcie oparzenie, rozerwanie, owrzodzenie podudzi, rany szarpane, głębokie cięcie, przeszczep narządu, rana po kuli, nacięcie, owrzodzenie dolnej części nogi, odleżyna, blizna po oparzeniu, zadrapanie, spalona skóra, obolała skóra, blizna odleżynowa, rana kłuta, przeszczep, wrzód żylny lub rana związana z operacją lub po operacji plastycznej.

Termin „**rekonstrukcja skóry**” odnosi się do odbudowanej skóry w chirurgii plastycznej w miejscu po zabiegu, na przykład wycięcie skóry, pryszczce, depilacją blizn potrądzikowych, blizną przerosłą, keloid, znamię i nevus pigmentosus.

Termin „**rusztowania**” oznacza strukturę przestrzenną sieci nanowłókien, stanowiących podporę (rusztowanie) dla namnażających się komórek, tkanek czy narządów.

Termin „**samoorganizujący się peptyd**” – oznacza peptyd, który w określonych warunkach samoistnie, bez ingerencji człowieka tworzy strukturę nanowłókna.

Opis figur:

- Fig. 1** – przedstawia chromatogram oczyszczonego peptydu RADA-2
Fig. 2 – przedstawia chromatogram oczyszczonego peptydu RADA-3
Fig. 3 – przedstawia chromatogram oczyszczonego peptydu RADA-4
Fig. 4 – przedstawia chromatogram oczyszczonego peptydu RADA-6
Fig. 5 – przedstawia widmo ESI-MS jonów wielokrotnie naładowanych odpowiadających masie po dekonwolucji (3210.284) peptydu RADA-2
Fig. 6 – przedstawia widmo ESI-MS jonów wielokrotnie naładowanych odpowiadających masie po dekonwolucji (2658.042) peptydu RADA-3
Fig. 7 – przedstawia widmo ESI-MS jonów wielokrotnie naładowanych odpowiadających masie po dekonwolucji (2844.438) peptydu RADA-4
Fig. 8 – przedstawia widmo ESI-MS jonów wielokrotnie naładowanych odpowiadających masie po dekonwolucji (3595.448) peptydu RADA-6
Fig. 9 – przedstawia zdjęcia hy drożeli RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 w naczyniach
Fig. 10 – przedstawia widma CD dla peptydów RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 (0.25 mg/ml)
Fig. 11 – przedstawia zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) dla peptydów RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 (0.2 mg/ml)
Fig. 12 – przedstawia zdjęcia z mikroskopu sił atomowych (AFM) dla peptydów RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 (0.001%)

- Fig. 13**– przedstawia badania stabilności peptydu RADA-2 w wodzie. Stabilność była badana w czasie 24 godzin. Obecność peptydu RADA-2 była monitorowana za pomocą techniki HPLC z detektorem PDA.
- Fig. 14**– przedstawia badania stabilności peptydu RADA-3 w wodzie. Stabilność była badana w czasie 24 godzin. Obecność peptydu RADA-3 była monitorowana za pomocą techniki HPLC z detektorem PDA.
- Fig. 15**– przedstawia badania stabilności peptydu RADA-4 w wodzie. Stabilność była badana w czasie 24 godzin. Obecność peptydu RADA-4 była monitorowana za pomocą techniki HPLC z detektorem PDA.
- Fig. 16**– przedstawia badania stabilności peptydu RADA-6 w wodzie. Stabilność była badana w czasie 24 godzin. Obecność związku RADA-6 była monitorowana za pomocą techniki HPLC z detektorem PDA.
- Fig. 17**– przedstawia badania stabilności peptydu RADA-2 w osoczu ludzkim. Stabilność była badana w czasie 24 godzin. Obecność peptydu RADA-2 była monitorowana za pomocą techniki HPLC z detektorem PDA.
- Fig. 18** – przedstawia badania stabilności peptydu RADA-3 w osoczu ludzkim. Stabilność była badana w czasie 24 godzin. Obecność peptydu RADA-3 była monitorowana za pomocą techniki HPLC z detektorem PDA.
- Fig. 19**– przedstawia badania stabilności peptydu RADA-4 w osoczu ludzkim. Stabilność była badana w czasie 24 godzin. Obecność peptydu RADA-4 była monitorowana za pomocą techniki HPLC z detektorem PDA.
- Fig. 20** – przedstawia badania stabilności peptydu RADA-6 w osoczu ludzkim. Stabilność była badana w czasie 24 godzin. Obecność peptydu RADA-6 była monitorowana za pomocą techniki HPLC z detektorem PDA.
- Fig. 21** – przedstawia wpływ peptydu RADA-1 na proliferację (test XTT) keratynocytów HaCaT i fibroblastów 46BR.1N oraz jego cytotoksyczność wobec tych komórek (test LDH). Wykresy przedstawiają zestawienie wyników z 3 cykli doświadczeń (w każdym 4 powtórzenia, n = 12). *– różnice istotne statystycznie względem kontroli (komórki hodowane w medium bez surowicy), test U-Manna Whitneya ($p < 0,05$, n = 12); FBS – kontrola pozytywna w teście XTT (komórki hodowane w medium z 10% surowicy), TRITON X – kontrola pozytywna w teście LDH (komórki inkubowane w medium z dodatkiem 1% triton X, maksymalna cytotoksyczność).
- Fig. 22** – przedstawia wpływ peptydu RADA-3 na proliferację (test XTT) keratynocytów HaCaT i fibroblastów 46BR.1N oraz jego cytotoksyczność wobec tych komórek (test LDH). Wykresy przedstawiają zestawienie wyników z 3 cykli doświadczeń (w każdym 4 powtórzenia, n = 12). *- różnice istotne statystycznie względem kontroli (komórki hodowane w medium bez surowicy), test U-Manna Whitneya ($p < 0,05$, n = 12); FBS – kontrola pozytywna w teście XTT n = 12). (komórki hodowane w medium z 10% surowicy), TRITON X – kontrola pozytywna w teście LDH (komórki inkubowane w medium z dodatkiem 1% triton X, maksymalna cytotoksyczność).
- Fig. 23** – przedstawia wpływ peptydu RADA-4 na proliferację (test XTT) keratynocytów HaCaT i fibroblastów 46BR.1N oraz jego cytotoksyczność wobec tych komórek (test LDH). Wykresy przedstawiają zestawienie wyników z 3 cykli doświadczeń (w każdym 4 powtórzenia, n = 12). *– różnice istotne statystycznie względem kontroli (komórki hodowane w mediu bez surowicy), test U-Manna Whitneya ($p < 0,05$, n=12); FBS- kontrola pozytywna w teście XTT (komórki hodowane w medium z 10% surowicy), TRITON X – kontrola pozytywna w teście LDH (komórki inkubowane w medium z dodatkiem 1% triton X, maksymalna cytotoksyczność).
- Fig. 24** – przedstawia wpływ peptydu RADA-6 na proliferację (test XTT) keratynocytów HaCaT i fibroblastów 46BR.1N oraz jego cytotoksyczność wobec tych komórek (test LDH). Wykresy przedstawiają zestawienie wyników z 3 cykli doświadczeń (w każdym 4 powtórzenia, n = 12). *- różnice istotne statystycznie względem kontroli (komórki hodowane w medium bez surowicy), test U-Manna Whitneya ($p < 0,05$, n=12); FBS- kontrola pozytywna w teście XTT (komórki hodowane w medium z 10% surowicy), TRITON X – kontrola pozytywna w teście LDH (komórki inkubowane w medium z dodatkiem 1% triton X, maksymalna cytotoksyczność).

- Fig. 25** – przedstawia zdjęcia skórných fibroblastów pierwotnych hodowanych przez 11-dni na hydrożelach peptydowych RADA-3 (1%) i RADA-6 (1%) (wybarwione komórki żywe).
- Fig. 26** – przedstawia udział procentowy (mediana z 3 powtórzeń) zaktywowanych komórek: limfocytów T cytotoksycznych (CTL), komórek NK (Natural Killer) oraz pomocniczych (Th) po 24 godz. (lewy panel) oraz 48 godz. (prawy panel) inkubacji z żelami RADA-1 (kontrola – peptyd o sekwencji RADARADARADARADA), RADA-2, RADA-3 oraz RADA-6. Analiza aktywacji opierała się na badaniu ekspresji charakterystycznych markerów: CD25, CD69, CD71, HLA-DR.
- Fig. 27** – przedstawia udział procentowy (mediana z 3 powtórzeń) zaktywowanych komórek dendrytycznych (DC) po 24 godz. (lewy panel) oraz 48 godz. (prawy panel) inkubacji z żelami RADA-1 (kontrola – peptyd o sekwencji RADARADARADARADA), RADA-2, RADA-3 oraz RADA-6. Analiza aktywacji opierała się na badaniu ekspresji charakterystycznych markerów: CD11, CD80, CD83.
- Fig. 28** – przedstawia kinetyki zarastania ran skóry po zastosowaniu peptydów RADA. Na wykresach pokazano średnią powierzchnię rany względem powierzchni początkowej.
- Fig. 29** – przedstawia preparaty histologiczne z wczesnych faz gojenia rany. Preparaty pobrane zostały w dniu 4 po zranieniu po podaniu: u góry po lewej soli fizjologicznej (kontrola); u góry po prawej – hydrożelu RADA-1 (kontrola – peptyd RADARADARADARADA); na dole po lewej – CD11 hydrożelu RADA-6; na dole po prawej hydrożelu RADA-3.
- Fig. 30** – przedstawia preparaty histologiczne skór mysich po podaniu hydrożeli peptydowych. Skóry pobrano w dniu 21 po zranieniu po podaniu: od góry po lewej kontrola (brak podawanej substancji); hydrożelu RADA-1 (kontrola – peptyd RADARADARADARADA); hydrożelu RADA-2; na dole od lewej hydrożelu RADA-3, hydrożelu RADA-4, hydrożelu RADA-6.
- Fig. 31** – przedstawia preparat histologiczny skóry mysiej z odtworzoną mięśniówką po podaniu hydrożelu RADA-4.

RADA-2: RADARADARADARADAGGGAAPVGGGRDKVYR (SEQ ID nr 1)

RADA-3: RADARADARADARADAGGGAAPVGG-GHK (SEQ ID nr 2)

RADA-4: RADARADARADARADAGGGAAPVGGGKGHK (SEQ ID nr 3)

RADA-6: RADARADARADARADAGGGAAPVGGGRLIDRTNANF (SEQ ID nr 4).

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania, nie stanowiące jego ograniczenia:

Przykład 1

Synteza chemiczna

Samoskładający się peptyd stosowany w niniejszym wynalazku jest syntetyzowany chemicznie, nie zawiera niebezpiecznych składników macierzy pozakomórkowej pochodzenia zwierzęcego. Nie ma więc potencjalnego ryzyka zakażenia, w tym BSE, przez co samoorganizujący się peptyd jest bezpieczny dla zastosowań medycznych.

Synteza peptydów RADA-2, 3, 4 i 6 została wykonana na nośniku stałym w automatycznym syntezatorze mikrofalowym Liberty Blue™ (CEM Corporation), zgodnie z metodologią chemii Fmoc. W syntezie wykorzystano żywicę TentaGel R RAM o stopniu osadzenia równym 0.18 mmol/g.

Odczynniki wykorzystane do syntezy:

DMF suszony nad sitami molekularnymi A3 oraz A4, 0.2 M roztwory N^α – Fmoc-pochodnych aminokwasów w DMF: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, 20% roztwór piperidyny w DMF, 1 M Oxyma pure ((Hydroksyimino)cyjanooctan etylu) w DMF, 0,5 M DIC w DMF, 0,5 M N-Acetyloimidazol w DMF.

W pierwszym etapie syntezy odblokowano grupę aminową na stałym nośniku, osłoniętą ugrupowaniem Fmoc (9H-fluoren-9-ylometyloksykarbonylowym). Etap ten wykonano traktując żywicę 20% roztworem piperidyny w DMF i poddając ją promieniowaniu mikrofalowemu o mocy 125 W przez 25 sekund (temperatura równa 70°C), następnie mocą równą 30 W w czasie 65 sekund (temperatura w zakresie 89–90°C). Stały nośnik przesączono i przemywano 4-krotnie DMF. Pierwsza N-chroniona reszta aminokwasowa została przyłączona do nośnika stałego z wykorzystaniem 0,5 M roztworu DIC w DMF jako odczynnika sprzęgającego oraz 1 M roztworu Oxymy pure ((Hydroksyimino)cyjanooctan etylu), jako supresora racemizacji. W reakcji acylowaniu użyto 4-krotnego nadmiaru aminokwasu w stosunku do osadzenia stałego nośnika. Reakcję sprzęgania prowadzono wykorzystując indukcję

mikrofalową o mocy 170 W przez 15 sekund (temperatura równa 75°C), następnie o mocy 30 W przez 110 sekund, utrzymując temperaturę w zakresie 89–90°C. Peptydylożycię przesączono i dodano roztwór 20% piperydyny w DMF, w celu odblokowania grupy N-chronionej pierwszej, reszty (chronionej ugrupowaniem Fmoc). Etap deprotekcji prowadzono z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego o mocy 125 W przez 25 sekund (temperatura równa 70°C), następnie mocą równą 30 W w czasie 65 sekund (temperatura w zakresie 89–90°C). Peptydylożycię przesączono i przemyto 4-krotnie DMF. Przyłączenie kolejnych N-osłoniętych aminokwasowych reszt oraz deprotekcję ich N-chronionych grup funkcyjnych wykonano analogicznie do powyższego opisu. Po zakończeniu syntezy peptydylożycię wytrząsano przez 6 godzin w 0,5 M N-acetyloimidazolu w celu wprowadzenia grupy acetylowej na N-końcowym fragmencie peptydu. Po zakończeniu reakcji, peptydylożycię przemyto 4-krotnie DMF, następnie 3-krotnie MeOH i pozostawiono ją na noc w próżniowym eksykatorze. Opisana procedura syntezy została zastosowana dla wszystkich peptydów: RADA-2, RADA-3, RADA-4, RADA-6.

Odszczenie peptydu od nośnika:

Do odczepienia peptydu z nośnika z jednoczesnym usunięciem osłon bocznych użyto mieszanki 75,3% TFA (SigmaAldrich) + 6,7% H₂O + 6,7% fenol + 1,3% TIPS1 + 6,7% tioanizol (SigmaAldrich) + 3,3% DODt (SigmaAldrich) + 6,7% tioanizol(SigmaAldrich) (v/v/v/v/v/v). Reakcję prowadzono przez trzy i pół godziny z wykorzystaniem wytrząsarki laboratoryjnej, a następnie żywicę odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto kwasem trifluorooctowym, a przesącz odparowano do niewielkiej objętości przy pomocy wyparki próżniowej. Otrzymany roztwór zalano schłodzonym do temperatury 4°C eterem dietylowym, a następnie zwirowano (20 min). Osad przemyto trzykrotnie Et₂O w celu usunięcia zanieczyszczeń (wirując po każdym przemyciu), po czym pozostawiono do wysuszenia w eksykatorze próżniowym. Tak uzyskany surowy produkt został rozpuszczony w wodzie i poddany procesowi liofilizacji. Procedura została zastosowana dla wszystkich peptydów: RADA-2, RADA-3, RADA-4, RADA-6.

Oczyszczanie:

Związek został oczyszczony z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Produkt surowy syntezy został rozpuszczony w wodzie i naniesiony na kolumnę semipreparatywną Jupiter® Proteo C12 (Phenomenex) o wymiarach 250 x 21,2 mm, 90 Å, 4 µm. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w liniowym gradiencie 5–100% B w 120 min z wykorzystaniem eluentów: A = 0,1% TFA w H₂O i B = 0,1% TFA, 40% ACN w H₂O. Przepływ eluentów wynosił 15 ml/min, detekcja UV przy λ = 223 nm. Procedura została zastosowana dla wszystkich analogów: RADA-2, RADA-3, RADA-4, RADA-6.

Chromatogramy oczyszczonych peptydów RADA znajdują się na **Fig. 1** do **Fig. 4**. Oczyszczone peptydy mogą być przechowywane w postaci proszku w temperaturze 4°C.

Charakterystyka otrzymanego produktu – HPLC oraz spektrometria masowa:

Uzyskane surowe produkty poddano analizie chromatograficznej z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej na fazach odwróconych (RP-HPFC). Kolumna chromatograficzna: Jupiter 4 µm Proteo 90 Å, 250 x 4.6 mm. Układ faz: A = 0,1% TFA w wodzie, B = 0,1 % TFA, 80% ACN w wodzie, przepływ 1 ml/min, detekcja UV przy λ = 223 nm, gradient 5% B → 100% B w 60 minut. Masę cząsteczkową związków potwierdzono za pomocą spektrometru masowego FC-MS ESI TOF na kolumnie Kromasil C8, 5 µm 100 Å (250 mm x 1 mm). Teoretyczna, średnia masa cząsteczkowa związków, masa eksperymentalna oraz czasy retencji zostały przedstawione w tabeli poniżej. Surowe widma masowe peptydów RADA znajdują się na **Fig. 5** do **Fig. 8**.

NAZWA	t_R	MASA TEORETYCZNA	MASA EKSPERYMENTALNA
RADA-2	17.038	3211.445	3210.284
RADA-3	15.455	2658.810	2658.042
RADA-4	15.300	2844.041	2844.438
RADA-6	23.073	3594.83	3595.448

Wymiana przeciwionu trifluorooctowego na jon octanowy:

Wymiana przeciwionu trifluorooctowego na jon octanowy została wykonana ma kolumnie Strata C18-E (55 μm , 70 \AA) według procedury:

- na zrównowagowaną kolumnę naniesiono peptyd rozpuszczony w wodzie,
- postęp wiązania się peptydu ze złożem kolumny był monitorowany przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych,
- po związaniu się peptydu na kolumnie, przemyto ją 0,1 M wodnym roztworem octanu amonu.
- peptyd wyeluowano za pomocą 0,1 M roztworu octanu amonu w MeOH.

Uzyskany eluat odparowano przy pomocy wyparki próżniowej, a następnie odsublimowano nadmiar octanu amonu na liofilizatorze. W celu usunięcia resztek amonu, liofilizat ponownie rozpuszczono w wodzie i powtórnie zliofilizowano. Procedura została wykonana dla wszystkich peptydów: RADA-2, RADA-3, RADA-4, RADA-6.

Przykład 2

Procedura żelowania peptydów samoorganizujących się RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6

Procedura żelowania samoorganizujących się peptydów w tym zgłoszeniu zależy od pH, temperatury i obecności jonów sodu i potasu, znajdujących się w buforze PBS. Proces żelowania peptydów RADA-2, RADA-3, RADA-4 został wykonany według następującej procedury:

- peptyd nważono do naczynia – 5 mg
- dodano 0,5 ml wody Mili-Q, zvortexowano
- naczynie odstawiono w temperaturze pokojowej 2 h aż roztwór był półpłynny
- do półpłynnego roztworu dodano 0,2 ml PBS o pH 7,4
- roztwór inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej
- po godzinie usunięto nadmiar cieczy z powierzchni żelu.

W przypadku peptydu RADA-6 dodatek PBS powodował wytrącenie się peptydu z roztworu, w związku z tym, peptyd był podawany procesowi żelowania wg następującej procedury:

- peptyd nważono do naczynia – 5 mg
- dodano 0,5 ml wody Mili-Q, zvortexowano
- naczynie umieszczono w cieplarni w temperaturze 37°C na 3 godziny po upływie tego czasu uzyskano gęsty żel.

pH sporządzonych żeli było mierzone z wykorzystaniem uniwersalnych papierków wskaźnikowych i oscylowało w granicach 5,5–7. Stężenie peptydów w roztworze może się zmieniać w zależności od pożądanej konsystencji oraz zastosowania. Stężenie peptydów samoorganizujących się może wynosić od około 0,25% do około 10% (wszystkie stężenia są podane w procentach wagowych).

Peptydy RADA-2, 3, 4 i 6 w roztworze samorzutnie tworzą rusztowania poprzez oddziaływania elektrostatyczne. Samoorganizujące się łańcuchy peptydowe tworzą hydrożel, który jest lepki ale ciągliwy (**Fig. 9**) i podatny na przepływ po zastosowaniu odpowiedniego bodźca.

Do przygotowania hydrożeli peptydowych można zastosować, oprócz roztworu wodnego buforowanego fosforanami (PBS), pożywkę do hodowli tkankowej w przypadku użycia ich do hodowli komórek. Po przygotowaniu żelu jego pH można łatwo zbadać przez usunięcie roztworu i umieszczenie paska papierka pH w lub na żelu.

Przykład 3

Tworzenie struktury β -kartki przez hydrożele peptydowe RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6

W celu określenia struktury drugorzędowej badanych peptydów RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6, wykonano pomiary z użyciem dichroizmu kołowego. Peptydy rozpuszczono w roztworze PBS pH 7,4 do stężenia 0,25 mg/ml. Inkubację roztworów peptydów do wykonania pomiarów CD prowadzono przez 7 dni i w temperaturze 37°C. Widma CD zmierzone były na aparacie JASCO J-815. Uzyskane widma CD wskazują na formowanie struktury β -kartki przez peptydy RADA-2, RADA-3, RADA-4 oraz RADA-6 (**Fig. 10**). Należy jednak zauważyć, że największą zawartość struktury β -kartki zawiera peptyd RADA-4.

Przykład 4

Tworzenie rusztowań przez samoorganizujące się peptydy RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6

Do sprawdzenia obecności sieci włókien w hydrożelu zastosowano metodą obserwacji pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym. Peptydy zostały przygotowane poprzez rozpuszczenie ich do stężenia 0,2 mg/ml w wodzie MiliQ. Do pomiarów użyto po 5 μl poszczególnych roztworów pepty-

dów, które naniesiono na cienką warstwę siateczki z mikrocelulozową błoną i wybarwiono za pomocą 2 μl 1,5% wodnego roztworu octanu uranylu. Barwnik, po związaniu się z powierzchnią włókien peptydowych spowodował pojawienie się ciemnego zabarwienia. Zdjęcia zostały wykonane na mikroskopie TECNAI SPIRIT BIO TWIN FEI przy wzbudzeniu 120 kV. Na zdjęciach (**Fig. 11**) widać, iż wszystkie peptydy RADA-2, 3, 4 i 6 tworzą włókna i układają się w sieć, potwierdzając zdolność badanych związków do samoasocjacji. Włókna mają rozmiar ok 100–700 nm natomiast średnica i rozmiar porów w rusztowaniu wynoszą od 10 do 200 nm, czyli podobnie jak pory włókien w naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej np. kolagenu, elastyny.

W kolejnym eksperymencie do sprawdzenia obecności rusztowań peptydowych w hydrożelu zastosowano metodą obserwacji mikroskopii sił atomowych (AFM). Do badań tych peptydy zostały rozpuszczone do stężenia 0,001% w wodzie MiliQ. Roztwory peptydów naniesiono na specjalną mikę (ok. 5 μl) umieszczoną na szkiełku mikroskopowym. Następnie nadmiar utworzonego hydrożelu odmyto wodą a hydrożel pozostały na mierce wysuszone. Próbkę analizowano pod Mikroskopem JPK Nanowizard 4. Pomiar wykonany został w trybie QI (quantitative imaging mode). Na zdjęciach (**Fig. 12**) widać, iż wszystkie peptydy RADA-2, 3, 4 i 6 tworzą włókna, potwierdzając zdolność badanych związków do samoasocjacji i tworzenia rusztowań. Włókna mają rozmiar ok 0,1–0,7 μm .

Przykład 5

Badanie stabilności peptydów RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 w wodzie i w ludzkim osoczu

W celu sprawdzenia stabilności chemicznej peptydów RADA w wodzie na początku peptydy o stężeniu 0,5 mg/ml inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C z zastosowaniem ciągłego wytrząsania. Stabilność peptydów badano w następujących punktach czasowych 1, 2, 3, 6 i 24 h. Analizy zostały prowadzone za pomocą HPLC, na kolumnie Phenomenex Luna 08(2) (5 μm , 100 Å 250 x 4,6 mm) z detektorem PDA. 0,01% roztwór TFA w H₂O (A) oraz 0,01% TFA w 80% MeCN w wodzie (B) został użyty jako bufor. Do analizy zastosowano liniowy gradient 5–100% w 60 min z przepływem 1 mL/min. Obliczenia powierzchni pod pikami zostały wykonane przy pomocy oprogramowania Shimadzu LCsolution. Peptydy RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 są stabilne w wodzie w ciągu 24-godzinnej inkubacji w 37°C (**Fig. 13**, **Fig. 14**, **Fig. 15** i **Fig. 16**).

W celu sprawdzenia stabilności peptydów RADA w osoczu pobrana została krew od zdrowych dawców i zwirowana na probówkach pokrytych heparyną litową. Jako antykoagulant użyto EDTA. Peptydy RADA były inkubowane w osoczu w temperaturze 37°C (końcowe stężenie peptydu: 144 μM), a postęp ich degradacji w osoczu przeanalizowany został w punktach czasowych: 1, 2, 3, 6 i 24 h. Próbkę zostały przygotowane w sterylnych warunkach. Po odpowiednim czasie, został dodany 4-krotny nadmiar etanolu, a następnie próbka została przetrzymana na lodzie przez kolejne 15 min. Następnie próbka została zwirowana (32000 rcf, 4°C, 20 min) na wirówce. Supernatant został zebrany i odparowany, a pozostałość została rozpuszczona w 100 μL 0,01% roztworu TFA w H₂O oraz 20 μL 80% MeCN. Analizy zostały prowadzone za pomocą HPLC, na kolumnie Phenomenex Luna C18(2) (5 μm , 100 Å 250 x 4,6 mm) z detektorem PDA. 0,01% roztwór TFA w H₂O (A) oraz 0,01% TFA w 80% MeCN w wodzie (B) został użyty jako bufor. Do analizy zastosowano liniowy gradient 5–100% w 60 min z przepływem 1 mL/min. Obliczenia powierzchni pod pikami zostały wykonane przy pomocy oprogramowania Shimadzu LCsolution. Otrzymane wyniki skazują na szybą degradację peptydu RADA-2 (**Fig. 17**), który po 2 h ulega degradacji w osoczu. Peptyd RADA-4 (**Fig. 18**) ulega degradacji po 6 h a peptydy RADA-3 oraz RADA-6 są stabilne w osoczu do 24 h (**Fig. 19**).

Przykład 6

Wpływ peptydów RADA-2, RADA-3, RADA-4 oraz RADA-6 na proliferację oraz ich cytotoksyczność wobec komórek HaCaT i 46BR.1N

Zbadano wpływ peptydów RADA-2, RADA-3, RADA-4 oraz RADA-6 na proliferację uniesmiertelniczonych, ludzkich komórek linii fibroblastów skórnych 46BR.1N i keratynocytów skórnych HaCaT (dla każdego peptydu 3 cykle doświadczeń). Sprawdzone również ich cytotoksyczność wobec tych komórek. Komórki inkubowano z peptydami uprzednio rozpuszczonymi w podwójnie destylowanej, sterylnej wodzie. Testy proliferacyjne (XTT) wykonano dla stężeń: 0,01; 0,1; 1; 10; 25; 50; 100; 150 $\mu\text{g/ml}$, a cytotoksyczności (LDH) dla stężeń: 50, 100, 150 $\mu\text{g/ml}$.

Wpływ peptydu RADA-2 na proliferację i cytotoksyczność komórek skóry:

Peptyd RADA-2 stymuluje proliferację keratynocytów HaCaT – wzrost proliferacji o 10–60% wobec kontroli w stężeniach 0,1; 1; 10; 25; 50 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h i 72 h inkubacji, a także fibroblastów 46BR.1N – wzrost proliferacji o 10–80% względem kontroli w stężeniach 0,1; 10; 25 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h

i 1;10;25;50 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h inkubacji (różnice istotne statystycznie, test U-Manna Whitneya, $p < 0,05$). Powoduje również niewielkie zahamowanie proliferacji keratynocytów HaCaT – 10–20% względem kontroli w stężeniach 0,01 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h i 150 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h i 72 h. Związek ten nie jest cytotoksyczny wobec badanych komórek (Fig. 21).

Wpływ peptydu RADA-3 na proliferację i cytotoksyczność komórek skóry:

Peptyd RADA-3 stymuluje proliferację keratynocytów HaCaT – wzrost proliferacji o 20–90% wobec kontroli w stężeniach 1;10 ;25 ;50 ;100 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h i 0,1; 1; 10; 25; 50; 100 72 h inkubacji, a także fibroblastów 46BR.1N – wzrost proliferacji o 10–80% względem kontroli w stężeniach 0,1; 1; 10; 25; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h i 0,1; 1; 10;25 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h inkubacji (różnice istotne statystycznie, test U-Manna Whitneya, $p < 0,05$). W stężeniu 0,01 $\mu\text{g/ml}$ powoduje również niewielkie (ok. 10%) zahamowanie proliferacji HaCaT (po 48 h) oraz fibroblastów 46BR.1N (po 72 h). Związek ten w stężeniu 150 $\mu\text{g/ml}$ wykazuje nieznaczną (10–20%) cytotoksyczność wobec komórek 46BR.1N (Fig. 22).

Wpływ peptydu RADA-4 na proliferację i cytotoksyczność komórek skóry:

Peptyd RADA-4 stymuluje proliferację keratynocytów HaCaT – wzrost proliferacji o 25–70% wobec kontroli w stężeniach 1; 10; 25; 50 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h i 0,1; 10; 25; 50 72 h inkubacji, a także fibroblastów 46BR.1N – wzrost proliferacji o 10–80% względem kontroli w stężeniach 0,1; 1; 10; 25; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h i 0,1; 1 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h inkubacji (różnice istotne statystycznie, test U-Manna Whitneya, $p < 0,05$). RADA-4 powoduje również niewielkie (ok. 10–20%) zahamowanie proliferacji HaCaT (0,01 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h i 150 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h) oraz fibroblastów 46BR.1N (0,01 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h). Związek ten w stężeniu 150 $\mu\text{g/ml}$ wykazuje cytotoksyczność wobec komórek HaCaT (10–40%) oraz 46BR.1N (15–30%) (Fig. 23).

Wpływ peptydu RADA-6 na proliferację i cytotoksyczność komórek skóry:

Peptyd RADA-6 stymuluje proliferację keratynocytów HaCaT – wzrost proliferacji o 20–70% wobec kontroli w stężeniach 0,1; 1; 10; 25; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h i 1; 10; 25; 50 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h inkubacji, a także fibroblastów 46BR.1N – wzrost proliferacji o 15–80% względem kontroli w stężeniach 0,1; 10; 25; 50; 100; 150 $\mu\text{g/ml}$ po 48 h i 1; 10; 25; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h inkubacji (różnice istotne statystycznie, test U-Manna Whitneya, $p < 0,05$). RADA-6 powoduje również niewielkie (ok. 15%) zahamowanie proliferacji HaCaT (0,01 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h). Związek ten w stężeniu 150 $\mu\text{g/ml}$ wykazuje cytotoksyczność wobec komórek 46BR.1N (10–15%) (Fig. 24).

Przykład 7

Badanie żywotności fibroblastów pierwotnych na hydrożelach RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 w aspekcie zastosowania hydrożeli jako rusztowania dla komórek

Hydrożele peptydowe RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 tworzą sieci włókien, które mają podobne właściwości mechaniczne do naturalnej macierzy pozakomarkowej. Mogą więc być stosowane jako rusztowania dla ludzkich fibroblastów i mogą służyć inżynierii tkankowej i regeneracji skóry.

W celu zbadania żywotności skórnych fibroblastów pierwotnych, izolowanych metodą eksplantów z materiału klinicznego, po inkubacji na żelach RADA komórki zawieszono w medium DMEM HG z 2% FBS, wysiewano na żelu (1%) umieszczonym w insercie (0,4 μm) znajdującym się w 24-dołkowej płytce. Medium zmieniano co 2 dni. Po 11 dniach inkubacji w celu oceny żywotności komórek wybarwiono je CFSE i jodkiem propidyny a następnie analizowano przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej (Fig. 25 – żywe komórki są zaznaczone na białą). Struktura hydrożeli RADA-2 i RADA-4 uniemożliwiła analizę żywotności komórek w badanym modelu (komórki zapadły się w żelu przez co niemożliwa była ocena ich żywotności). Otrzymane wyniki pokazują, że skórne fibroblasty pierwotne po 11 dniach hodowli na żelach RADA-3 i RADA-6 pozostają żywe (w polu widzenia nie zaobserwowano martwych komórek). Jednocześnie widać, że na żelu RADA-6 jest znacznie więcej komórek niż na żelu RADA-3.

Opisane tu żele peptydowe stanowią matrycę do hodowli komórkowej pierwotnych fibroblastów. Samoorganizujące się peptydy tworzą rusztowanie – sieć nanowłókien umożliwiających infiltrację komórek i oddziaływanie komórka-komórka w sposób, zbliżony do warunków naturalnych. W ten sposób cały obszar rany może jednocześnie podlegać regeneracji.

W innym aspekcie hydrożele RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 mogą stanowić zestaw do dostarczania komórek tj. fibroblastów pierwotnych pacjentowi. Zestaw może zawierać oczyszczoną kompozycję peptydów, która może być przygotowana w postaci wodnego roztworu zawierającego jeden peptyd lub ich mieszaninę. Zestaw może ponadto zawierać instrukcje przygotowania komórek do dostarczenia ich przy jego użyciu, na przykład opis typu komórek odpowiednich do zastosowania, pobierania materiału klinicznego od pacjenta, izolacji komórek z materiału kliniczne-

go i ich hodowli in vitro oraz sposobu zawieszania komórek w hydrożelu itp. Wodny roztwór może ponadto zawierać elektrolit z jonami sodu i potasu.

Przykład 8

Ocena i mmunogenności dla hydrożeli RADA-2, RADA-3 i RADA-6

Materiałem do badań były tzw. kożuszki leukocytarne, z których izolowano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) wykorzystując wirowanie w gradiencie gęstości (Histopaque, Sigma). Po dwukrotnym płukaniu PBMC w PBS, lizie erytrocytów, komórki zliczano (licznik komórek Bio-Rad). Następnie przygotowywano płytkę 24-dołkową do testu. Do wybranych dołków nakładano po 100 μ l badanych żeli (RADA-1 (kontrola – peptyd o sekwencji RADARADARADARADA), RADA-2, RADA-3, RADA-6), potem umieszczano w dołkach inserty o średnicy porów 0,8 μ m i do nich wprowadzano komórki w ilości 0,5 mln kk/0,5 ml RPMI 1640 (P/S, 10% FBS)/dołek. Całość uzupełniano następnie samą pożywką do objętości końcowej 1 ml/dołek. Komórki inkubowano w cieplarni przez 24 h i 48 h. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane, hodowane w insercie, w dołku bez żeli. Komórki zbierano z insertów po zakończeniu inkubacji, płukano w PBS, zliczano i przygotowywano do analizy cytometrycznej: 100 tys. kk/100 μ l wybarwiano przeciwciałami przeciwko wybranym markerom powierzchniowym (tabela), a po 30 minutowej inkubacji w temp. pokojowej w ciemności analizowano z wykorzystaniem cytometru przepływowego – LSRFortessa, BD.

Badania i mmunogenności: badania wpływu rusztowań żelowych na komórki układu i immunologicznego wykonano z wykorzystaniem izolowanych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). Komórki te były inkubowane w insertach w obecności badanych żeli – RADA-1, RADA-2, RADA-3, RADA-6 przez 24 i 48 h, następnie efekty ich działania analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Określono stopień pobudzenia limfocytów T (CD3/CD4/CD8) i komórek NK (CD16/CD56) poprzez ocenę ekspresji markerów aktywacji: CD69, CD71, CD25, HLA-DR. Analizowano również odpowiedź komórek dendrytycznych (CD1c, HLA-DR), które przy aktywacji zwiększają ekspresję CD80 CD83.

Aktywacja limfocytów T i komórek NK:

Po 24 h inkubacji, limfocyty cytotoksyczne (CTL) w próbie kontrolnej charakteryzowały się stosunkowo wysokim odsetkiem HLA-DR+ oraz minimalną ilością markerów aktywacji CD25, CD69 i CD71. W przypadku badanych żeli poziom **HLA-DR** oscylował na poziomie kontrolnym z niewielkimi odchyleniami (spadek: RADA-2, wzrost: RADA-3 i 6). Zaobserwowano zwiększenie ekspresji markerów **CD25**, **CD69** i **CD71** po inkubacji z RADA-6. Ekspresja CD25 na limfocytach pomocniczych Th – nieznacznie wzrastała po inkubacji z żelami, szczególnie w przypadku RADA-2 i RADA-6. Ekspresja pozostałych analizowanych markerów odpowiadała wynikom uzyskanym dla próby kontrolnej. Jedynie RADA-6 zwiększała ekspresję CD69 i CD71. Natomiast komórki NK po 24-godzinnej inkubacji z żelami odznaczały się wyraźnym wzrostem badanych cząsteczek powierzchniowych (CD25, CD69, CD71), w porównaniu do kontroli. Jedynie poziomy HLA-DR nie odbiegał znacznie od wartości kontrolnych. Przy czym warto podkreślić, że głównie RADA-3 i RADA-6 indukowały wzrost ekspresji badanych antygenów, a RADA-2 prowadziła do utrzymania ekspresji markerów na poziomie zbliżonym do kontroli lub nieznacznie obniżonym. W przypadku komórek Th zaobserwowano wzrost aktywacji – głównie markery: CD25 i HLA-DR (RADA-1) oraz CD69 (RADA-2).

Komórki dendrytyczne:

Badania wykazały, iż żel RADA-2 nie stymulował aktywacji komórek DCs – niższa niż w kontroli pula komórek CD80+ CD83+. Jedynie w przypadku izolowanej analizy CD11c+ CD83+ widać, że odsetek komórek aktywnych zwiększa się w porównaniu do kontroli. Podobne wyniki były dla RADA-6, natomiast przy RADA-3 dominują komórki nieaktywne o fenotypie CD11c+ CD83-. Drugi marker aktywności DC – CD80- przy izolowanej analizie CD11c CD80- wzrasta nieznacznie w obecności RADA-3 i 6, a maleje przy RADA-2.

Wnioski:

Żele RADA według wynalazku wpływają na komórki układu immunologicznego w złożony sposób. Spośród badanych żeli największą aktywację ludzkich limfocytów powodował żel kontrolny RADA-1, w nieco mniejszym stopniu RADA-2, RADA-3 i RADA-6. Żele RADA aktywowały również komórki dendrytyczne (komórki prezentujące antygen), co przejawiało się wzrostem udziału procentowego komórek CD80+CD83+ w warunkach in vitro. Aktywacja limfocytów (zapalenie), uwidoczniła przez zwiększoną ekspresję markerów CD69 i CD71, może zmieniać przebieg gojenia rany. W ranach przewlekłych może prowadzić do opóźnionego gojenia rany, jednak w ranach ostrych może doprowadzać do szybszego jej zamknięcia. Proces zapalenia prowadzi bowiem do uruchomienia wczesnych

kaskad gojenia rany. Dochodzi do stymulacji proliferacji i migracji komórek skóry – keratynocytów i fibroblastów. Jednocześnie w przypadku ran zakażonych bakteriami aktywacja limfocytów może prowadzić do szybszej eliminacji patogenów. Limfocyty są natomiast stymulowane przez zaktywowane komórki dendrytyczne (synergia działania). Żele RADA-2, RADA-3 i RADA-6 mogą służyć jako rusztowania oraz jako nośniki peptydów do zastosowania np. na trudno gojące się rany powstałe na podłożu infekcji bakteryjnej.

Przykład 9

Wpływ miejscowego podania hydrożeli RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 na gojenie ran skóry

Wpływ miejscowego podania hydrożeli RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 na gojenie ran skóry u myszy określono przy użyciu modelu uszkodzenia skóry grzbietowej. Przetestowano wpływ pięciu hydrożeli peptydowych: RADA-1 (kontrola – peptyd RADARADARADARADA), RADA-2, RADA-3, RADA-4 oraz RADA-6 na proces gojenia ran w skórze grzbietowej u myszy. Grupą kontrolną były zwierzęta nie otrzymujące żadnego peptydu.

Badania na zwierzętach wykonano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach w Bydgoszczy, zgoda nr 49/2016. Do eksperymentów wykorzystano 8-ty godni owe samice szczepu Balb/C po 6 osobników na grupę. Dla grupy kontrolnej oraz peptydów RADA-1, RADA-3 oraz RADA-6 wykonano doświadczenia na dwóch dodatkowych osobnikach, które uśmiercono w dniu 4 po wykonaniu zranienia w celu zbadania ich wpływu na wczesne etapy gojenia. Skórę grzbietową ogolono i zdezynfekowano. Skórę zebrano w fałd biegnący równolegle do kręgosłupa, który następnie przebito sztancą biopsyjną $\phi 6$ mm. Na powstałe w ten sposób dwie symetryczne rany nałożono po 25 μ l peptydu. Po zestaleniu się hydrożelu rany przykryto przezroczystym opatrunkiem Tegaderm. Całość zabezpieczono plastrem adhezyjnym owiniętym wokół klatki piersiowej myszy. W pierwszym tygodniu eksperymentu peptydy podawano raz dziennie przez 5 dni łącznie z dniem wykonania zranienia. W drugim tygodniu opatrunek zmieniano co drugi dzień.

Opatrunek zdjęto na początku trzeciego tygodnia. Podczas zmiany opatrunku wykonywano zdjęcia dokumentujące przebieg gojenia rany. Po upływie trzeciego tygodnia zwierzęta poddano eutanazji. Po uśmierceniu skórę grzbietową pobrano, rozpięto na korku i umieszczono w formalinie. Tkanki utrwalano przez przynajmniej tydzień po czym zatopiono w parafinie, pocięto na 5 mm preparaty i wybarwiono hematoksyliną oraz eozyną lub trójkolorowym barwieniem Massona. Preparaty analizowano pod mikroskopem świetlnym. W trakcie eksperymentu prowadzono dokumentację fotograficzną w celu pomiaru powierzchni ran w różnych punktach czasowych.

Kinetyka zarastania ran:

Zastosowanie peptydów RADA-1 i RADA-2 nie polepsza w znacznym stopniu tempa zarastania ran. W przypadku RADA-1 następuje spowolnienie tempa gojenia po dniu 7. Warto jednak zauważyć, że dla RADA-2 po dniu 9 średnia powierzchnia rany spada poniżej poziomu obserwowanego w kontroli. Hydrożele RADA-3, RADA-4 i RADA-6 w znaczący sposób przyśpieszają zamykanie rany zwłaszcza we wczesnych etapach gojenia. Efekt ten jest najsilniejszy dla RADA-4 (Fig. 28).

Wczesne fazy gojenia – dzień 4 po zranieniu:

W preparatach kontrolnych wyraźnie widać cienką błonkę w świetle rany. Analiza histologiczna pokazuje, że błonka ta składa się z od jednej do kilku warstw komórek. Jest ona grubsza na brzegach rany. W preparatach z grup, w których zastosowano RADA-1 (kontrola – peptyd RADARADARADARADA) czy RADA-6 widać wyraźnie grubszą, kilkunastowarstwową błonkę. Preparaty po zastosowaniu RADA-3 pokazują silnie rozwiniętą tkankę o dużej gęstości komórek z wyraźnie zaznaczonym kolagenem (Fig. 29).

Późne fazy gojenia – dzień 21 po zranieniu:

Zastosowanie peptydów RADA prowadzi do zmniejszenia obszaru blizny. Najmniej skuteczny pod tym względem jest hydrożel kontrolny RADA-1 gdzie następuje tylko niewielkie zmniejszenie szerokości blizny. W przypadku RADA-3, RADA-4 oraz RADA-6 następuje znaczące zmniejszenie obszaru blizny. W preparatach kontrolnych, gdzie podawana była sól fizjologiczna, obszar rany jest wypełniony głównie kolagenem w postaci grubych włókien ułożonych równolegle na całej głębokości blizny, przy niewielkiej gęstości komórek. W preparatach RADA-1 i RADA-2 nie obserwujemy znaczących zmian w strukturze kolagenu. W preparatach RADA-3, RADA-4 i RADA-6 kolagen jest podobnie ułożony jak w przypadku preparatów kontrolnych tylko w górnych rejonach blizny. W głębszych obszarach zaobserwowano dużą gęstość komórek oraz obszary o odmiennej morfologii od otaczających komórek. W przypadku RADA-4 zaobserwowano także zwiększoną gęstość komórek w górnych

warstwach blizny. Naskórek w preparacie kontrolnym po podaniu soli fizjologicznej jest wyraźnie grubszy w obszarze blizny w porównaniu do obszaru nienaruszonego. W przypadku RADA-2, RADA-4 i RADA-6 zaobserwowano naskórek bardziej zbliżony w grubości i wygładzie do naskórka w obszarze niezranionym. Zastosowanie hydrożeli RADA poprawia ukrwienie blizn. Naczynia krwionośne występują częściej i są bardziej równomiernie rozłożone. Efekt ten widać szczególnie w preparatach, gdzie stosowano hydrożel RADA-4, w których widoczne są liczne naczynia włosowate. W preparatach z grupy kontrolnej po podaniu soli fizjologicznej nie zaobserwowano powstawania przy dawkach skóry w obszarze rany, podczas gdy w tkankach traktowanych peptydami RADA można zaobserwować powstawanie mieszków włosowych na skraju rany (Fig. 30). W żadnym preparacie, poza grupą otrzymującą hydrożel RADA-4, gdzie można zauważyć wzmożony wzrost mięśniówki na obrzeżach rany, nie dochodzi do jej odtworzenia (Fig. 31).

Wnioski:

Zastosowanie hydrożeli peptydowych według wynalazku RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6 w znaczący sposób przyspiesza naskórkowanie oraz znacznie poprawia jakość powstałej tkanki ostatecznie prowadząc do regeneracji skóry. Dodatkowo badane hydrożele peptydowe w znacznym stopniu zmniejszają obszar blizny oraz stymulują tkankę do lepszego odtworzenia pierwotnej struktury, do regeneracji.

Przykład 10

Kompozycja farmaceutyczna

Kompozycja farmaceutyczna, która zawiera nowe związki (RADA-2, RADA-3, RADA-4 i RADA-6) zawiera co najmniej jeden związek i/lub rozcieńczalnik.

„Farmaceutycznie dopuszczalny” jest rozumiany jako substancja zawarta w rozcieńczeniach, buforach i nośnikach, w stężeniu nie wykazującym efektów niepożądanych u pacjentów go przyjmujących. Farmaceutycznie dopuszczalne bufony, nośniki i substancje pomocnicze, które są powszechnie stosowane w produktach farmaceutycznych (zobacz Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990), Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)). Kompozycja farmaceutyczna może zostać poddana typowym procesom farmaceutycznym jak sterylizacja i/lub może zawierać dodatek w postaci środka/środków konserwujących, stabilizatorów, środków zwilżających, emulsji, buforów itp., które nie zostały zmieszane w tym miejscu.

Formy stałe i/lub ciekłe kompozycji mogą być w postaci: granulek, proszku, tabletek, tabletek pokrywanych, kapsułek (w tym mikrokapsułek), czopków, syropu, emulsji, żelu, maści, zawiesiny, kremu, aerozolu, kropelek, wlewów, ampułek. Kompozycja farmaceutyczna może być dostarczona również w opatrunkach, plastrach itp.

Kompozycja farmaceutyczna będzie dostarczana pacjentowi w „stężeniu farmaceutycznie efektywnym” rozumianym jako dawka wystarczająca do wywołania pożądanego efektu, w korelacji do sposobu jej podawania. Dokładna dawka jest zależna od aktywności związku, sposobu dostarczania, typu i rozległości obrażeń pacjenta oraz jego masy ciała i wieku. Podawanie substancji może odbywać się w postaci dostarczania pojedynczej dawki lub dawek dostarczanych w odpowiednich interwałach. Kompozycja farmaceutyczna wynalazku może być podawana osobno lub w kombinacji z innymi substancjami terapeutycznymi jak antybiotyki czy substancjami antyseptycznymi. Przykładowo: penicyliny, cefalosporyny.

Przykłady kompozycji farmaceutycznej do gojenia się ran i rekonstrukcji skóry obejmują roztwór i żel. Samoorganizujący się peptyd ulega żelowaniu w wyniku zmiany pH roztworu, może być rozprowadzany w postaci cieczy, która ulega żelowaniu w kontakcie z żywą tkanką po podaniu lub po nałożeniu. Możliwe jest także umieszczenie żelu na gazie lub bandażu, które są zwykle używane w tej dziedzinie techniki. Można zastosować napylenie hydrożelu typu strumieniowego, gdzie roztwór stanowi roztwór samoorganizującego się peptydu. Po rozpyleniu na objęty raną obszar, pH roztworu zwiększa się w kontakcie z żywą tkanką, a tym samym roztwór ulega żelowaniu.

W innym zastosowaniu, oczyszczony produkt peptydowy może być dostarczony jako część zestawu. Zestaw może zawierać oczyszczoną kompozycję peptydów albo w postaci suchej, albo w roztworze, i jeden lub więcej elektrolitów, bufor, urządzenie dostarczające, naczynie odpowiednie do mieszania kompozycji peptydowej z jednym lub więcej innych środków, instrukcje do przygotowania kompozycji peptydowej do zastosowania, instrukcje do mieszania kompozycji peptydowej z innymi środkami i instrukcje do wprowadzania kompozycji peptydowej do osobnika. Urządzeniem dostarczającym może być na przykład cewnik, igła, strzykawka lub ich kombinacja. Gdy zestawy

są dostarczane z wodnym roztworem samoorganizujących się peptydów, roztwór może mieć określony okres ważności wynoszący co najmniej dziewięć tygodni w określonych warunkach i może obejmować elektrolit.

Takie zestawy mogą posiadać biologicznie aktywny środek oprócz oczyszczonej kompozycji peptydów. Biologicznie aktywny środek może być dostarczony wstępnie zmieszany z kompozycją peptydową lub oddzielnie. Biologicznie aktywny środek może być obecny w nanosferach, mikrosferach itp. (Określanych również jako nanokapsułki, mikrokapsułki itp.). Liczne sposoby i odczynniki do wytwarzania takich sfer, kapsułek itp., Podobnie, zestawy mogą być stosowane do dostarczania komórek pacjentowi. Zestaw może ponadto zawierać instrukcje przygotowania komórek do dostarczenia przy jego użyciu. Na przykład, instrukcje mogą opisywać typy komórek odpowiednie do zastosowania, sposób pobierania materiału kliniczny od pacjenta, metody izolacji i hodowli komórek in vitro, sposób zawieszania komórek w hydrożelu peptydowym/roztworze peptydu itp.

LITERATURA:

- Lee CH.; Singla A.; Lee Y.; Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*; **2001**; 221:1–22.
- Vukicevic S.; Kleinman HK.; Luyten FP.; Roberts AB.; Roche NS.; Reddi AH.; Identification of multiple active growth factors in basement membrane matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res*. **1992**; 202:1–8.
- Vallier L.; Alexander M.; Pedersen RA.; Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*; **2005**; 118 (19); 4495–509.
- Lowik D.; van Hest JCM. Peptide based amphiphiles. *Chem Soc Rev*. **2004**; 33(4); 234–245.
- Schneider JP.; Pochan DJ.; Ozbas B.; Rajagopal K.; Pakstis L.; Kretsinger J.; Responsive hydrogels from the intramolecular folding and self-assembly of a designed peptide. *J Am Chem Soc*. **2002**; 124(50); 15030–15037.
- Kim S.; Kim JH.; Lee JS.; Park CB.; Beta-sheet-forming, self-assembled peptide nanomaterials towards optical, energy, and healthcare applications. *Small*; **2015**; 11(30); 3623–3640.
- Klok HA.; Protein-inspired materials: synthetic concepts and potential applications. *Angew Chem Int Ed*; **2002**; 41(9); 1509–1513.
- Caplan MR.; Schwartzfarb EM.; Zhang SG.; Kamm RD.; Lauffenburger DA.; Control of self-assembling oligopeptide matrix formation through systematic variation of amino acid sequence. *Biomaterials*.; **2002**; 23(1); 219–227.
- Marini DM.; Hwang W.; Lauffenburger DA.; Zhang SG.; Kamm RD.; Left-handed helical ribbon intermediates in the self-assembly of a beta-sheet peptide. *Nano Lett*; **2002**; 2(4); 295–299.
- Bielefeld KA.; Amini-Nik S.; Alman BA.; Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci*; **2013**; 70; 2059–2081.
- Deptuła M.; Zieliński J.; Wardowska A.; Piкуła M.; Wound healing complications in oncological patients: perspectives for cellular therapy. *Adv Dermatol Allergol*; **2018**.
- Kukowska M.; Piкуła M.; Kukowska-Kaszuba M.; Schumacher A.; Dzierzbicka K.; Trzonkowski P.; Synthetic Lipopeptides as potential topical therapeutics in wound and skin care: In vitro studies of permeations and cells behaviour. *RSC Advances*; **2016**; 6; 115120–115131.
- Piкуła M.; Langa P.; Kosikowska P.; Trzonkowski P.; Komórki macierzyste i czynniki wzrostu w gojeniu ran. Stem cells and growth factors in wound healing. *Post Hig Med Dośw*, **2015**; 69; 874–885.
- Piкуła M.; Trzonkowski P.; Biology of epidermal stem cells: impact on medicine. *Postępy Hig Med Dosw*; **2009**, 63; 449–56.
- Deptuła M.; Wardowska A.; Dzierżyńska M.; Rodziejcz-Motowidło S.; Piкуła M.; Antibacterial Peptides in Dermatology-Strategies for Evaluation of Allergic Potential. *Molecules*; **2018**; 23(2); 414;
- Kosikowska P.; Piкуła M.; Langa P.; Trzonkowski P.; Obuchowski M.; Lesner A.; Synthesis and evaluation of biological activity of antimicrobial – pro-proliferative peptide conjugates. *PLoS ONE*; **2015**.
- Langa P.; Wardowska A.; Zieliński J.; Podolak-Popinigis J.; Sass P.; Sosnowski P.; Kondej K.; Renkielska A.; Sachadyn P.; Trzonkowski P.; Piкуła M; Transcriptional profile of in vitro expanded human epidermal progenitor cells for the treatment of non-healing wounds. *J Dermatol Sci*; **2018**, 89(3); 272–281.

Pikuła M.; Marek-Trzonkowska N.; Wardowska A.; Renkielska A.; Trzonkowski P.; Adipose tissue-derived stem cells in clinical applications. *Expert Opin Biol Ther*; **2013**, 13(10);1357-1370.

Schreml S.; Szeimies R.M.; Prantl L.; Landthaler M.; Babilas P.; Wound healing in the 21st century. *J. Am. Acad. Dermatol*; **2010**; 63; 866–881.

Sun G.; Shen Y.I.; Harmon J.W.; Engineering Pro-Regenerative Hydrogels for Scarless Wound Healing. *Adv Healthc Mater*; **2018**.

Yokoi H.; T Zhang Kinoshita, S.; Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold; *Proc. Natl. Acad. Sci*; **2005**, 102; 8414–8419,.

Genové E.; Shen C.; Zhang S.; Semino C. E.; The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function,; *Biomaterials*; **2005**; 3341–3351.

Gelain F.; Bottai D.; Vescovi A.; Zhang S.; Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures; *PLoS One*; **2006**.

Koutsopoulos S.; Unsworth L. D.; Nagai Y.; Zhang S.; Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 2009; 106; 4623–4628.

Wang T.; Zhong X.; Wang S.; Lv F.; Zhao X.; Molecular mechanisms of RADA16-1 peptide on fast stop bleeding in rat models; *Int. J. Mol. Sci.*; **2012**; 13; 11, 15279–15290.

Arosio P.; Owczarż M.; Wu H.; Butté A.; Morbidelli M.; End-to-end self-assembly of RADA 16-1 nanofibrils in aqueous solutions, *Biophys. J.*; **2012**; 102; 7; 1617–1626.

Bagrov D; Gelation Behavior of β -Sheet Peptide RADA16 Coexisting with Synthetic Polymers; *Mater. Today*, **2014**; 546; 6; 225–235.

Opisy patentowe:

Zhang S.; Lockshin C.; Rich A.; Homles T.; *patent amerykański*, **US 5670483 A**, wrzesień 23, 1997

Holmes T.; Zhang S.; Rich A.; DiPersio C.M.; Lockshin C.; *patent amerykański*, **US 5955343 A**, wrzesień 21. 1999.

Lev B. *patent amerykański*, **US 778200 A**, sierpień 1, 1901.

Olsen N. S. *patent amerykański*, **US 968790A**, sierpień 18, 1908

Rapaport H., *patent amerykański*, **US 674612 P**, maj 6, 2017

Sun X.S; Huang. H.; *patent amerykański*, **US 20040242469 A**, grudzień 4, 2014

Haraguchi K.; Mizuno T.; Myonaka Y.; Ota K.; Takehisa K.; Ta tum i E. patent japoński, **JP 2007117275 A**, październik 26, 2005.

Non-patent literature cited in the description

teeth regeneration journal, 2005, vol. 3 (1), 1–11

Biomaterials and biodevices for alternative methods to animal testing. CMC publishing Co, **2007**

Rein V.; Ulijn, Nurguse Bibi.; Jayawarna V.; Thornton P. D.; Todd S.; Mart. R.J.; Smith A.M.; Gough J.E.; Bioresponsive hydrogels, *Mater. Today*. **2007**, 10; 40–48.

O.D. Krishna., K.L. Kiick.; Protein- and peptide-modified synthetic polymeric biomaterials.; *Biopolymers*; **2010**. 94; 32–48.

Lutolf M.P.; Lauer-Fields J.L.; Schmoekel H.G.; Metters A.T.; Weber F.E.; Fields G.B.; Hubbell J.A; Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics, *Proc. Natl. Acad. Sci*; **2003**; 100; 5413–5418.

Bonefeld, CM.; Geisler C.; The role of innate lymphoid cells in healthy and inflamed skin *Immunol Lett.*; **2016**; 179; 25–28.

Sonnenberg G.F.; Artis D.; Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med.*; **2015**; 21(7), 698–708.

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek o ogólnym wzorze:
R-(G)3-B-(G)₃-O-NH₂
gdzie:
R- oznacza sekwencję aminokwasową **RADARADARADARADA**
B oznacza sekwencję aminokwasową AAPV specyficzną dla elastazy neutrofilowej
G oznacza aminokwas o nazwie glicyna
O oznacza sekwencję aminokwasową aktywną biologicznie w zakresie przyspieszenia gojenia ran skóry.
2. Związek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że:
O = HK, KGHK, RDKVYR, RLIDRTNANF
3. Związek według zastrz. 1–2, **znamienny tym**, że posiada sekwencję przedstawioną na Seq.ID 1-4.
4. Sposób otrzymywania związku zdefiniowanego w zastrzeżeniu 1, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - a) przygotowanie żywicy amidowej TentGel R RAM;
 - b) deprotekcję osłony blokującej Fmoc w 20% roztworze piperydyny w DMF;
 - c) przemywanie żywicy 4 x DMF;
 - d) wykonanie testu chloranilowego;
 - e) reakcję acylowania poprzez przyłączenie Fmoc-chronionego aminokwasu wspomaganie promieniowaniem mikrofalowym, przy użyciu 0,5 M roztworu DIC w DMF oraz 1 M (Hydroksyimino)cyjanooctanu etylu,
 - f) przemywanie żywicy DMF;
 - g) wykonanie testu chloranilowego;
 - h) powtarzanie etapów od b) do g) aż do momentu uzyskania peptydu z zastrzeżenia 1;
 - i) odszczepienie peptydu od żywicy z jednoczesnym usunięciem osłon znajdujących się na łańcuchach bocznych za pomocą mieszaniny TFA:TIPSI:H₂O (92:4:4, v/v/v);
 - j) odsączenie, wytrącenie eterem schłodzonym w ciekłym azocie, rozpuszczenie osadu Et₂O, przemycie trzy-krotne i liofilizacja;
 - k) analizę i oczyszczanie za pomocą HPLC;
 - l) wykonanie widm spektrometrii mas w celu potwierdzenia tożsamości peptydu.
5. Sposób żelowania związku zdefiniowanego w zastrzeżeniu 1, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - a) 5 mg peptydu odważa się do naczynia, dodaje się 0.5 ml wody Mili-Q, miesza się,
 - b) naczynie odstawia się w temperaturze pokojowej na 2 h do uzyskania półpłynnego roztworu, następnie dodaje się 0,2 ml PBS o pH 7,4,
 - c) uzyskany roztwór inkubuje się przez 1 h w temperaturze pokojowej, następnie usuwa się nadmiar cieczy z powierzchni żelu.
6. Sposób według zastrz.5, **znamienny tym**, że peptyd RADA o Seq. ID 4 w etapie b) umieszcza się w cieplarni w temperaturze 37°C na 3 godziny po upływie tego czasu uzyskuje się gesty żel.
7. Kompozycja farmaceutyczna, **znamienna tym**, że zawiera związek określony w zastrzeżeniu 1 oraz co najmniej jeden dopuszczalny farmaceutycznie rozcieńczalnik.
8. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 7, **znamienna tym**, że może być aplikowana miejscowo a także stosowana doodbytniczo.
9. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 7–8, **znamienna tym**, że aplikacje mogą być w formie roztworu lub hydrożelu.
10. Kompozycja według zastrz. 7–9, **znamienna tym**, że ma zastosowanie do pobudzania gojenia i regeneracji ran, w tym do odtwarzania wytworów skóry i mięśniówki.
11. Związek określony w zastrzeżeniu 1 do zastosowania do pobudzania gojenia ran wywołanych przez uszkodzenia mechaniczne, chemiczne, termiczne, radiacyjne, operacje chirurgiczne lub stany patologiczne.
12. Związek do zastosowania według zastrz. 11, **znamienny tym**, że pobudzenie gojenia ran następuje poprzez przyspieszone naskórkowanie rany.

13. Związek do zastosowania według zastrz. 11–12, **znamienny tym**, że gojenie ran obejmuje rany skóry, naskórka, mieszków włosowych, włosów, gruczołów potowych i mięśniówki.
14. Zestaw do pobudzenia gojenia ran **znamienny tym**, że zawiera związek określony w zastrzeżeniu 1 oraz urządzenie aplikujące.
15. Zestaw według zastrz. 14, **znamienny tym**, że urządzeniem aplikującym może być na przykład cewnik, igła, strzykawka lub ich kombinacja.

Rysunki

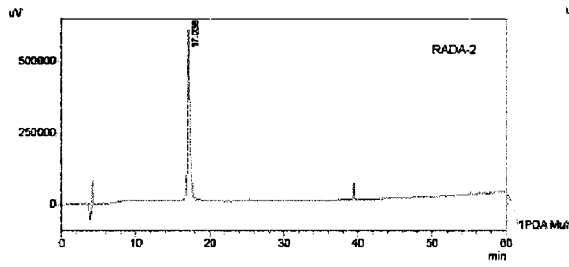


Fig. 1

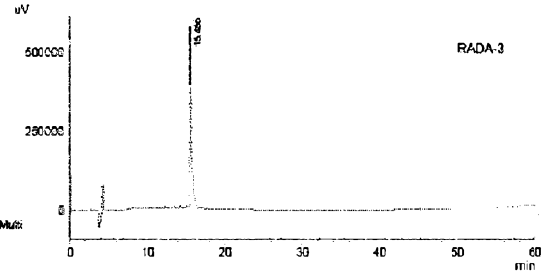


Fig. 2

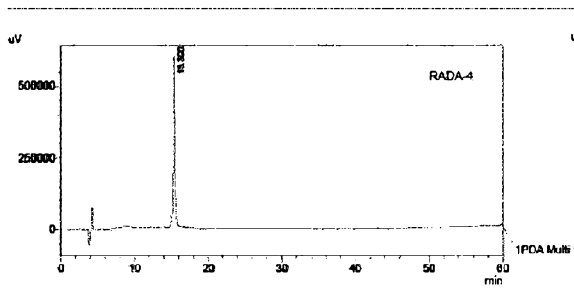


Fig. 3

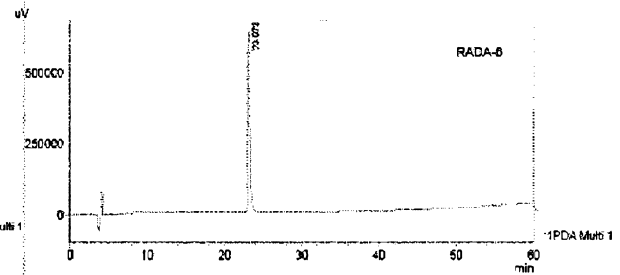


Fig. 4

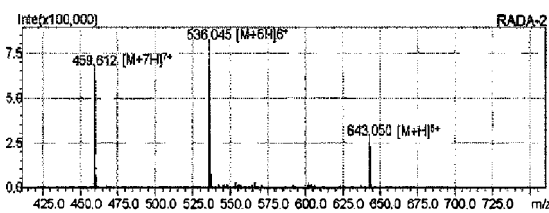


Fig. 5

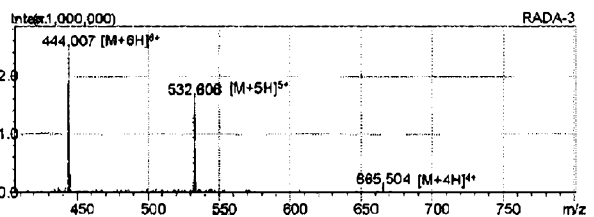


Fig. 6

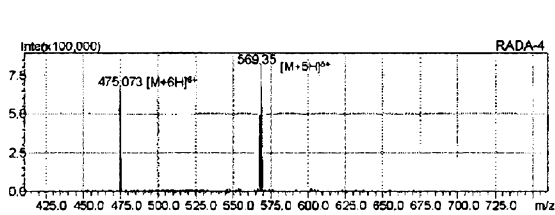


Fig. 7

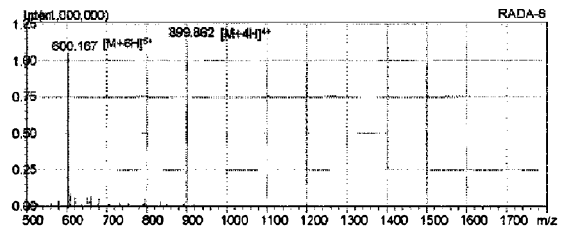


Fig. 8

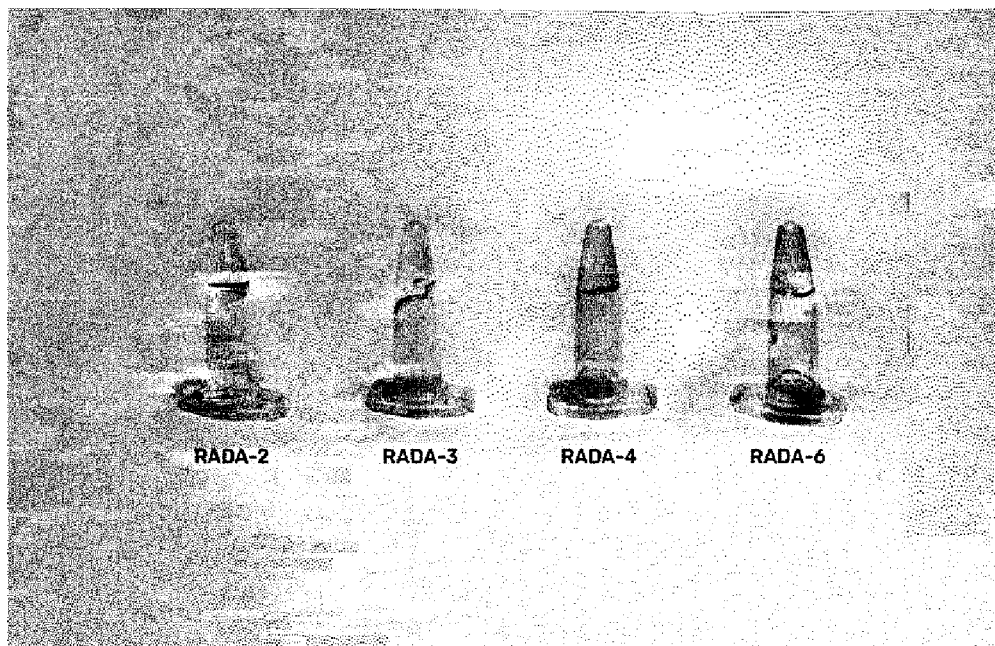


Fig. 9

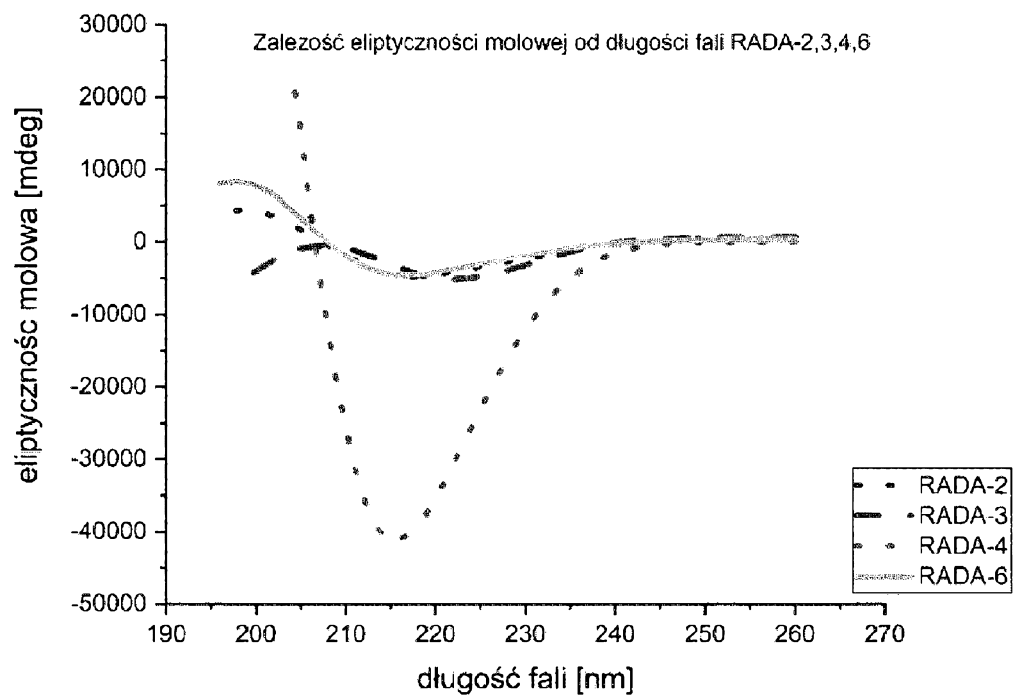


Fig. 10

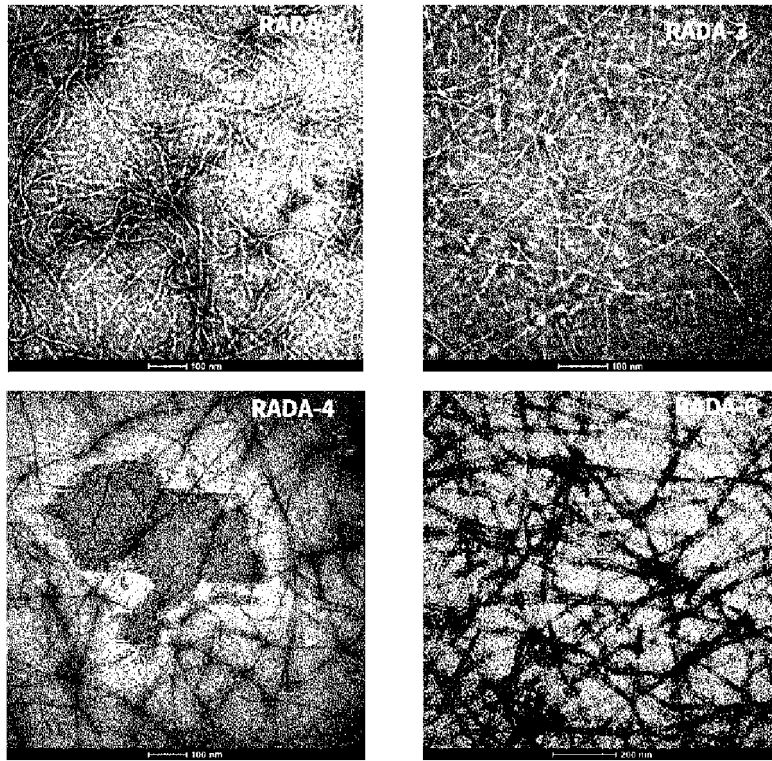


Fig. 11

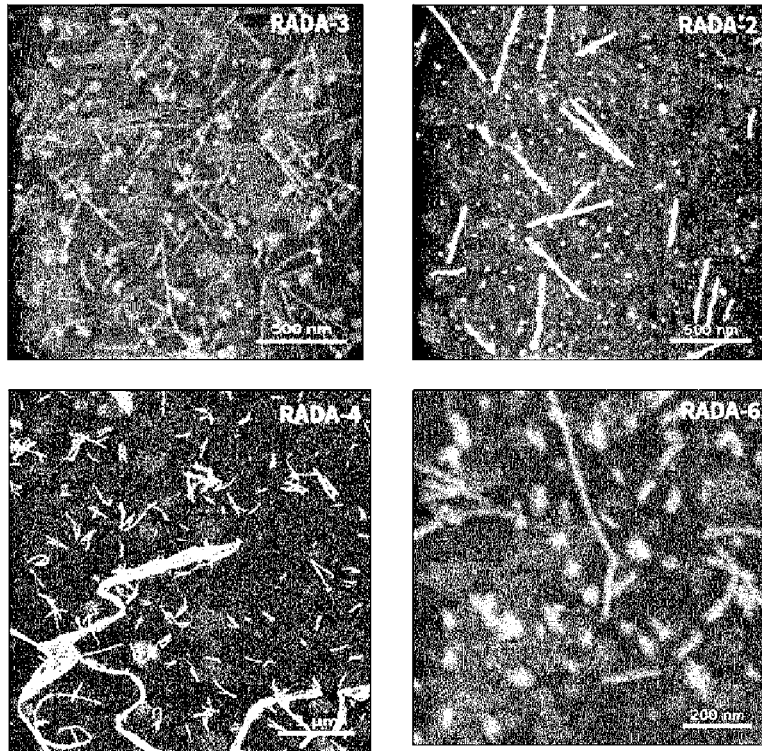


Fig. 12

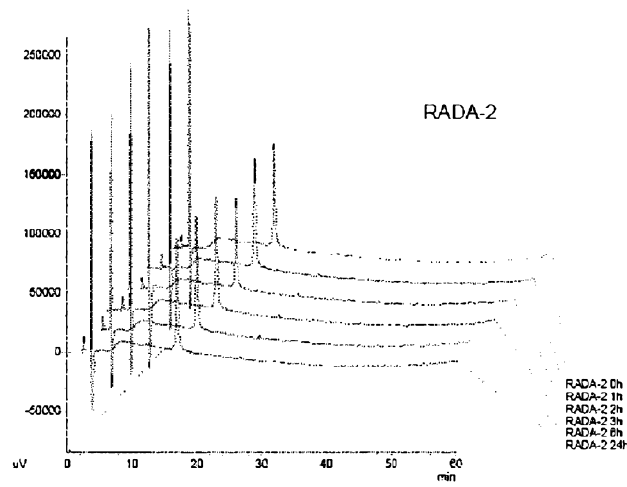


Fig. 13

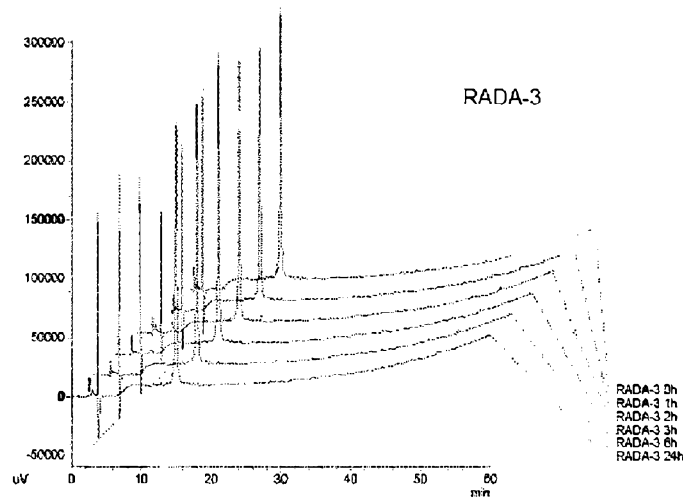


Fig. 14

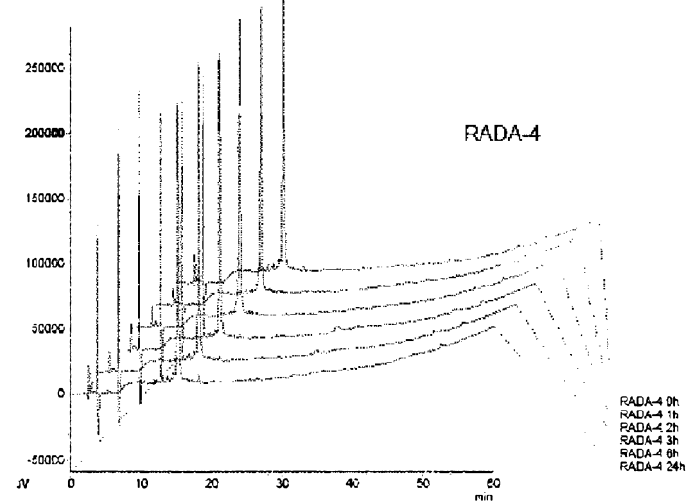


Fig. 15

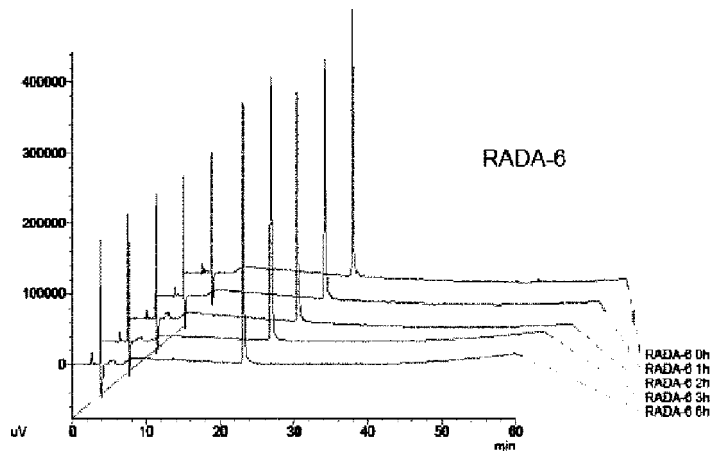


Fig. 16

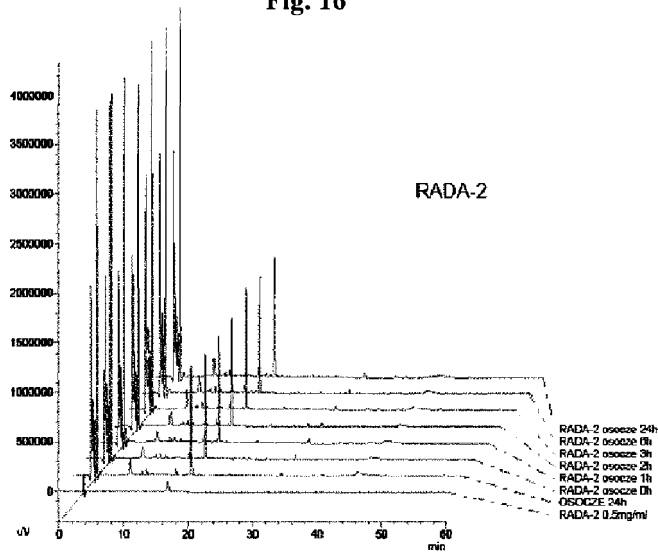


Fig. 17

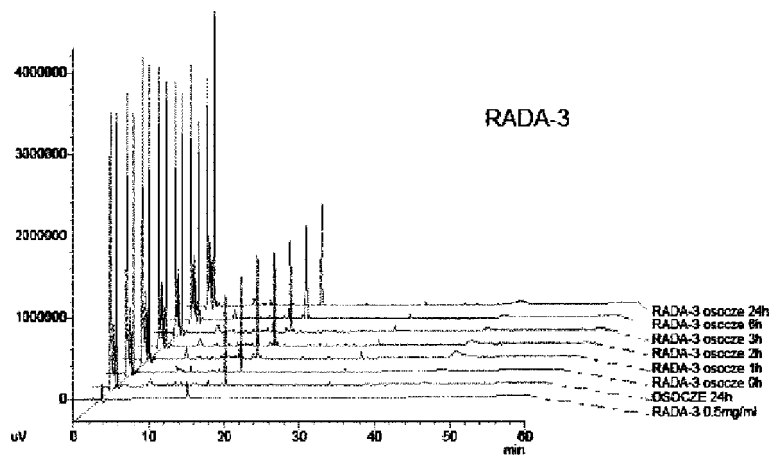


Fig. 18

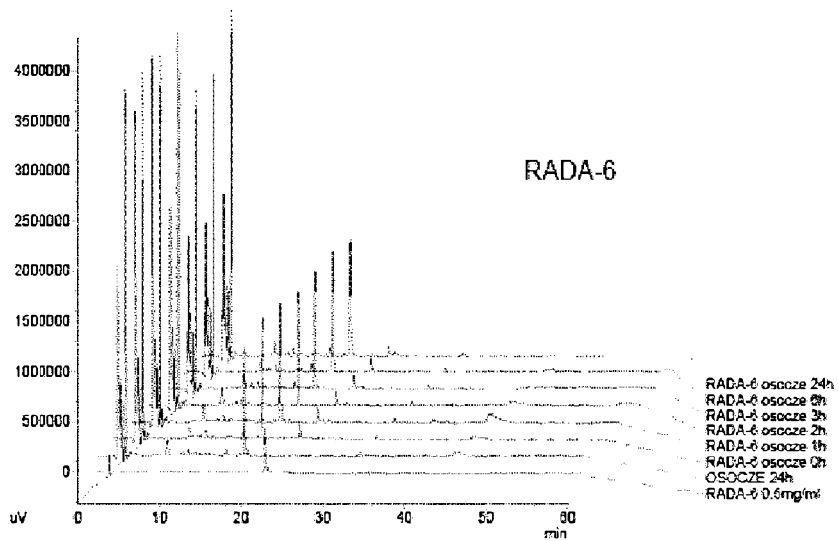


Fig. 19

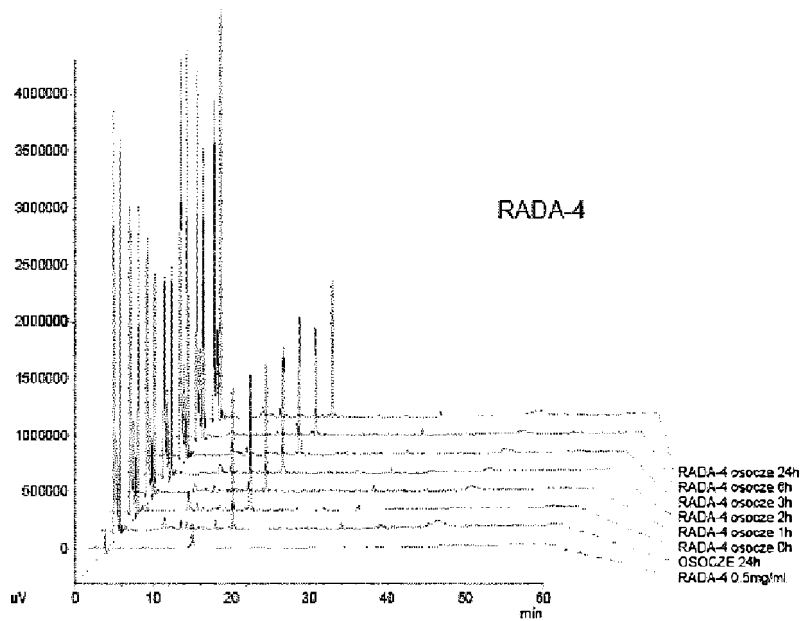


Fig. 20

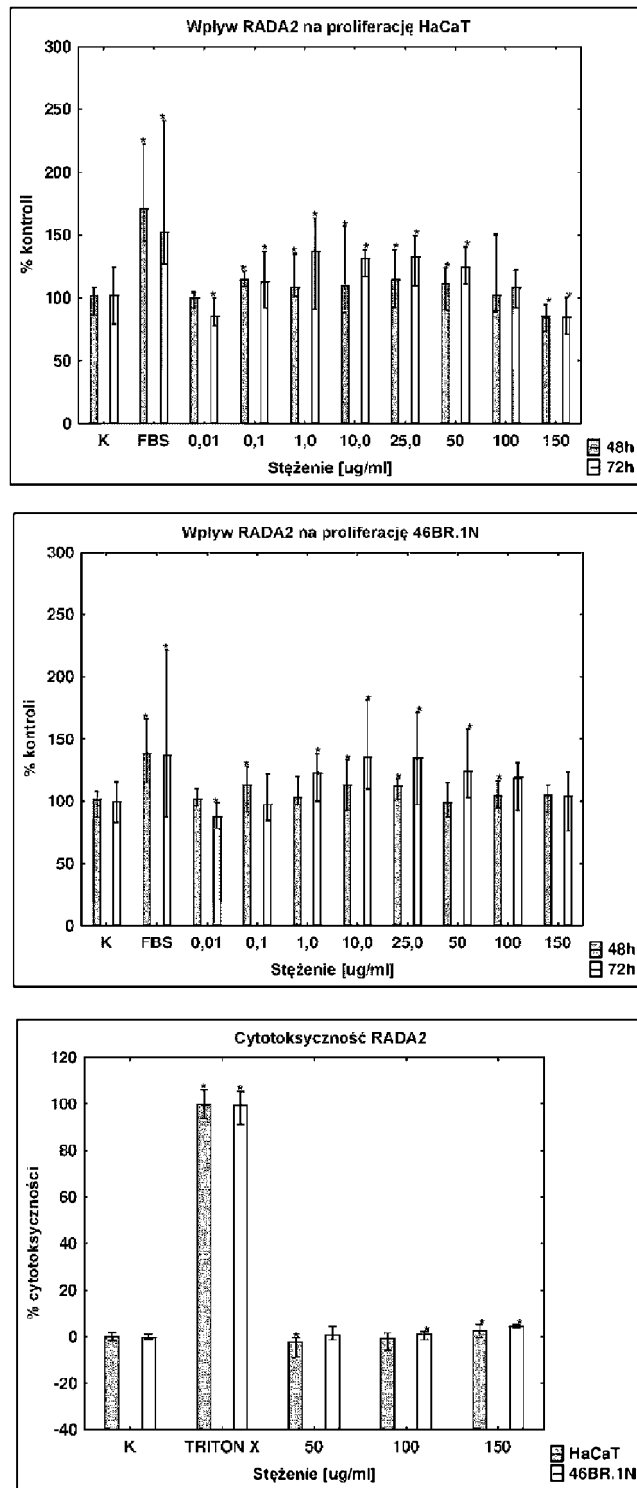


Fig. 21

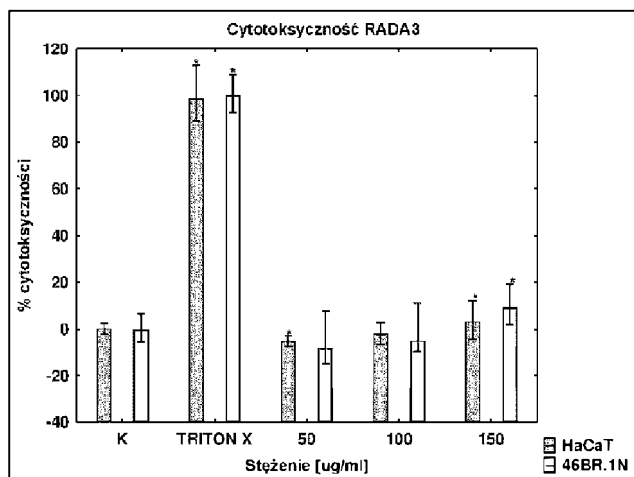
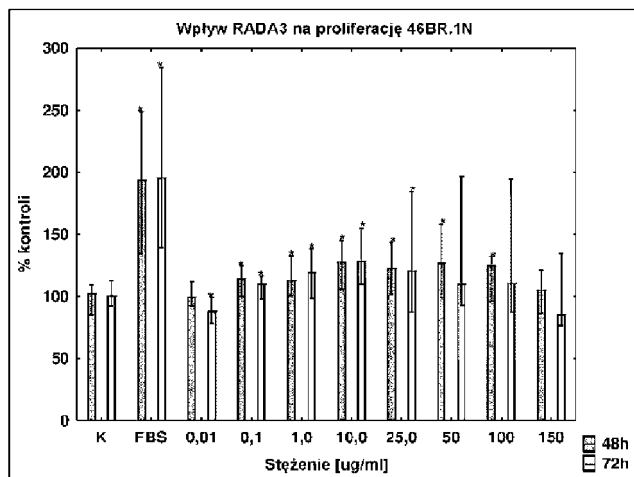
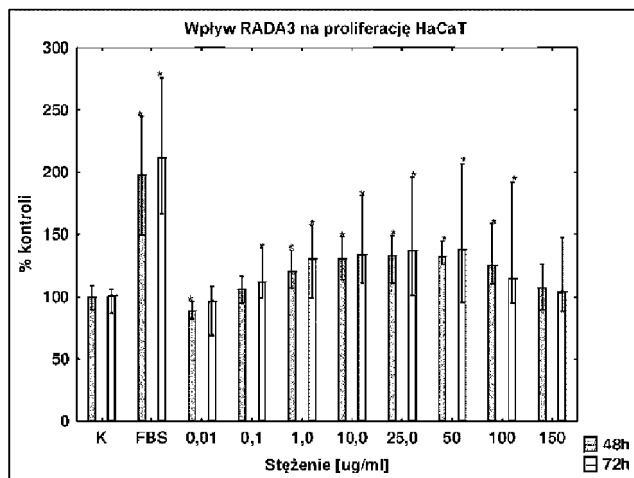


Fig.22

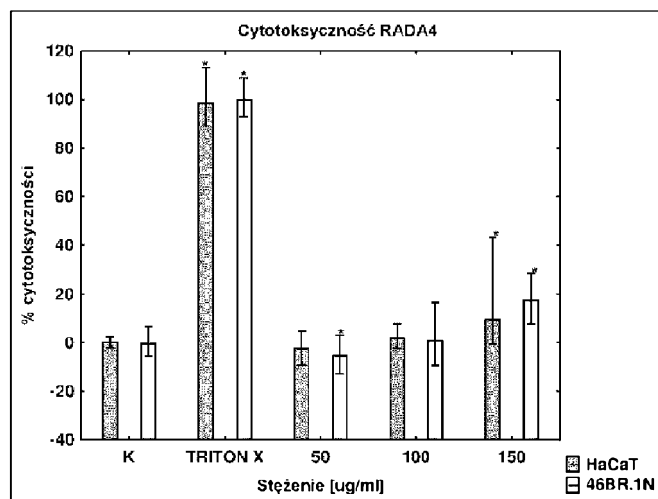
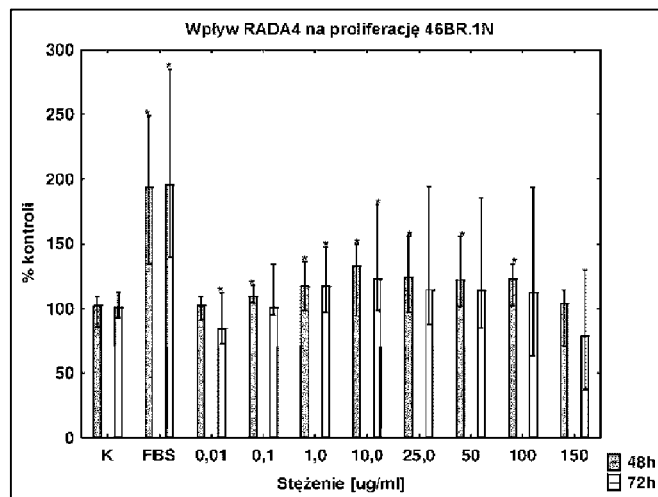
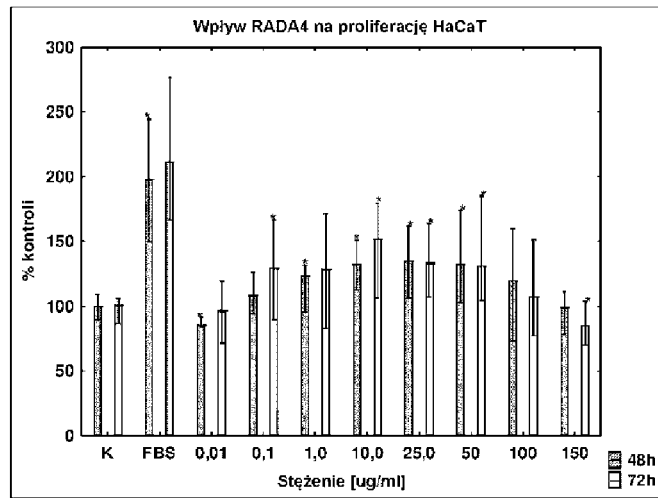


Fig.23

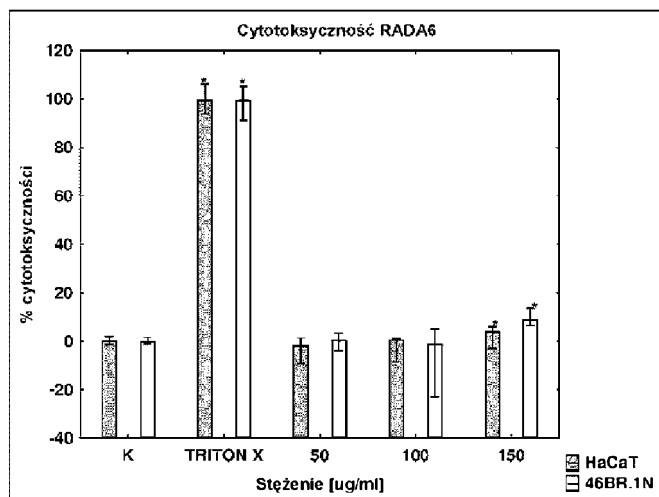
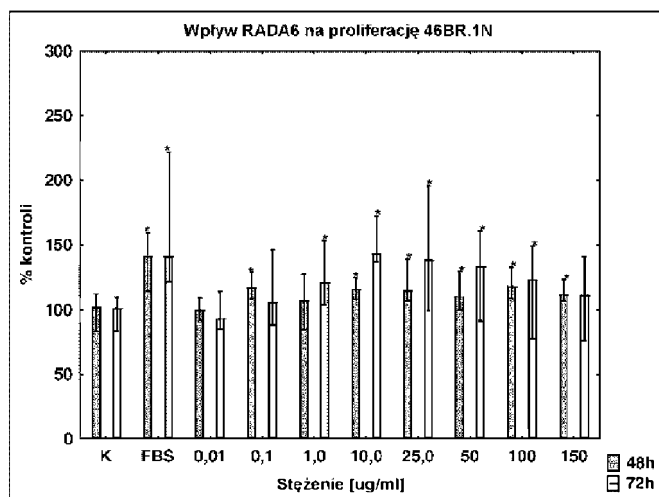
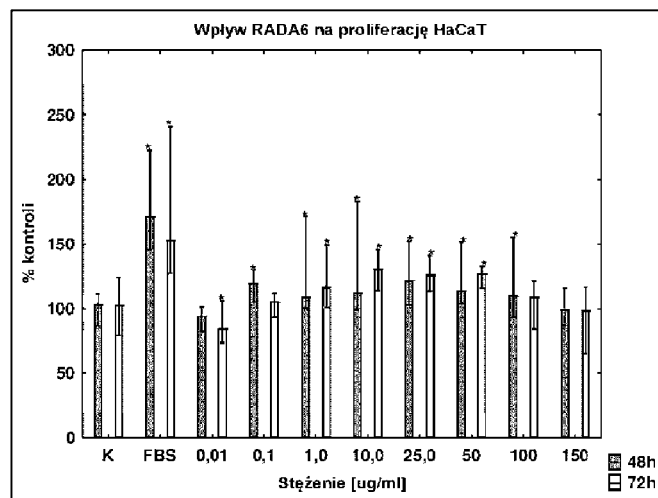


Fig.24

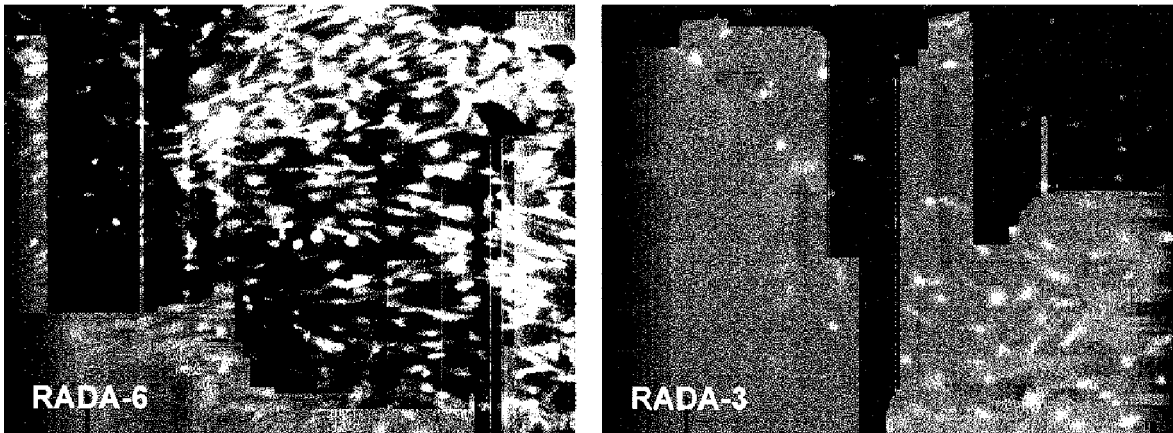


Fig. 25

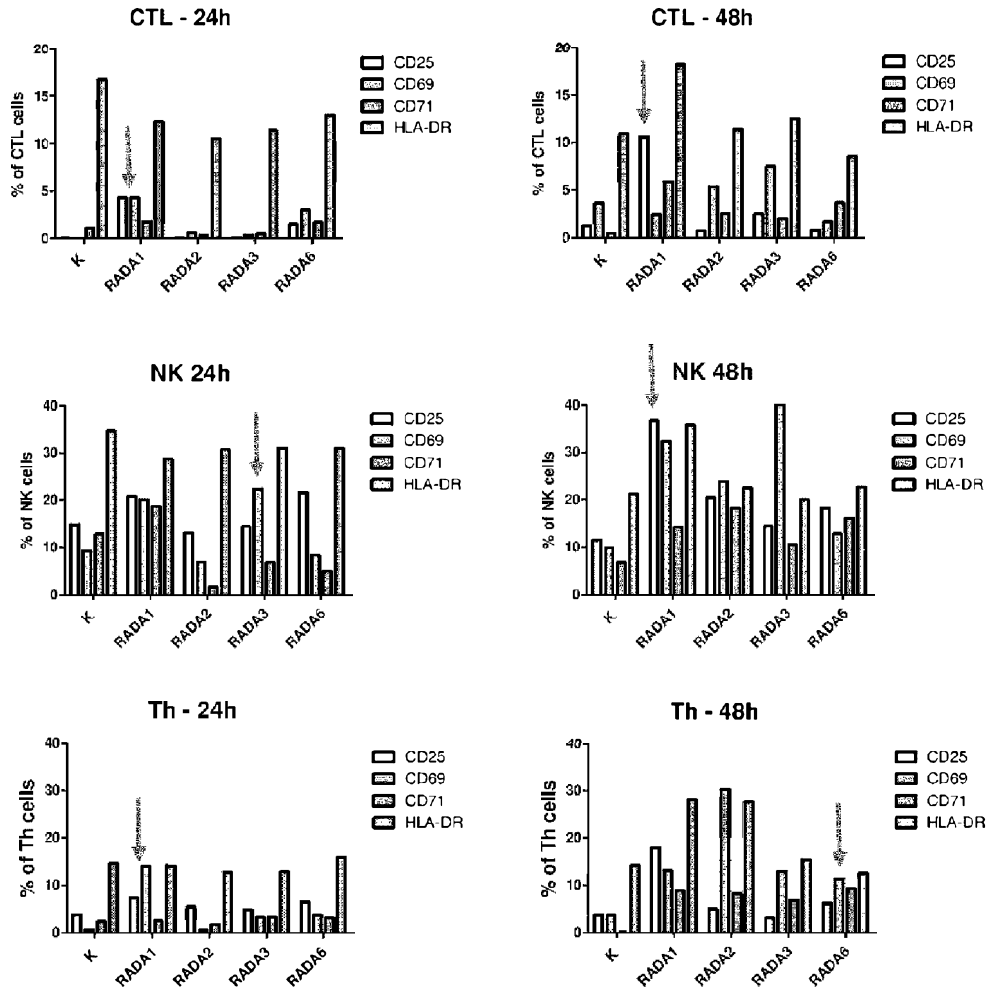


Fig. 26

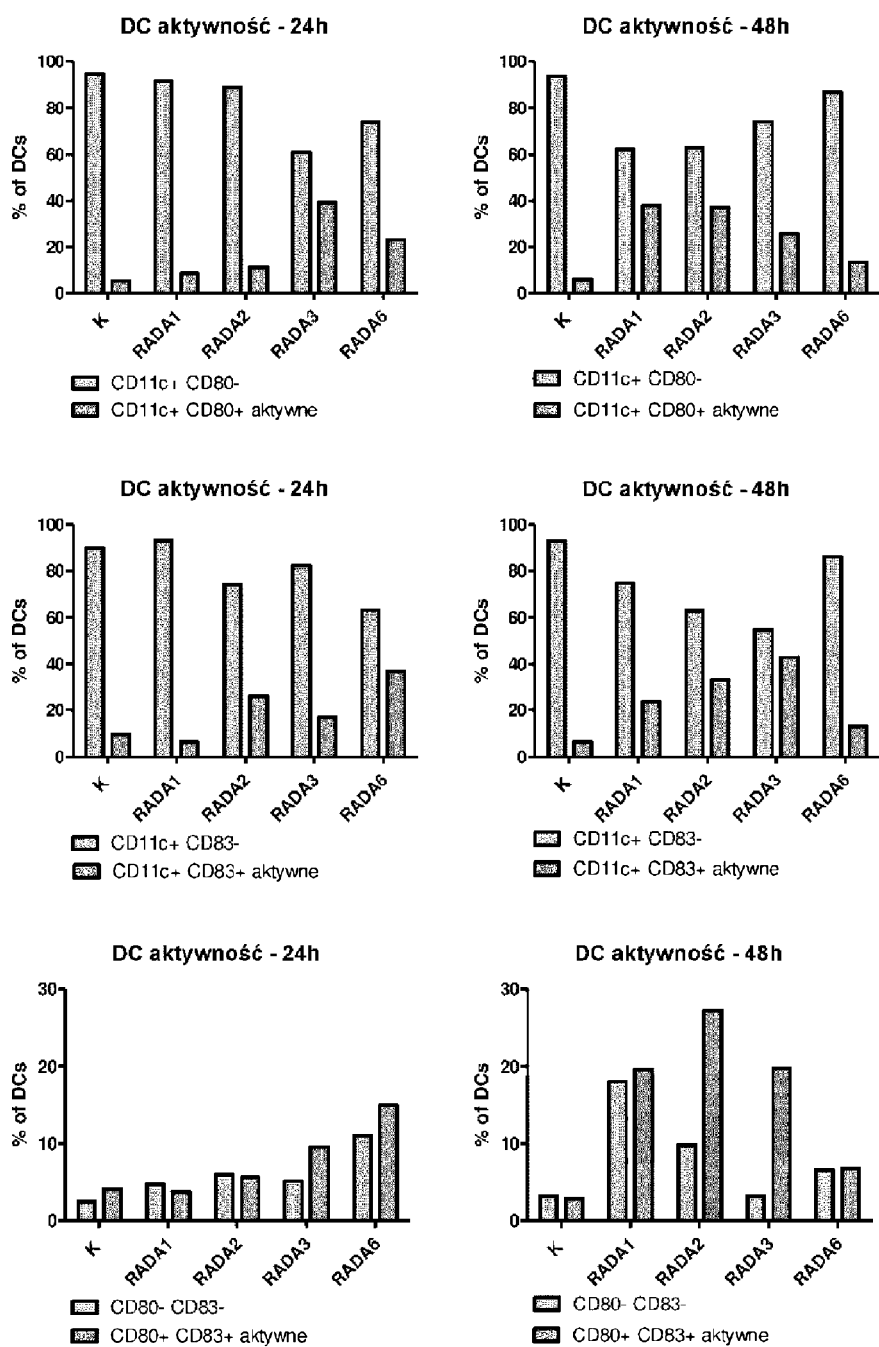


Fig. 27

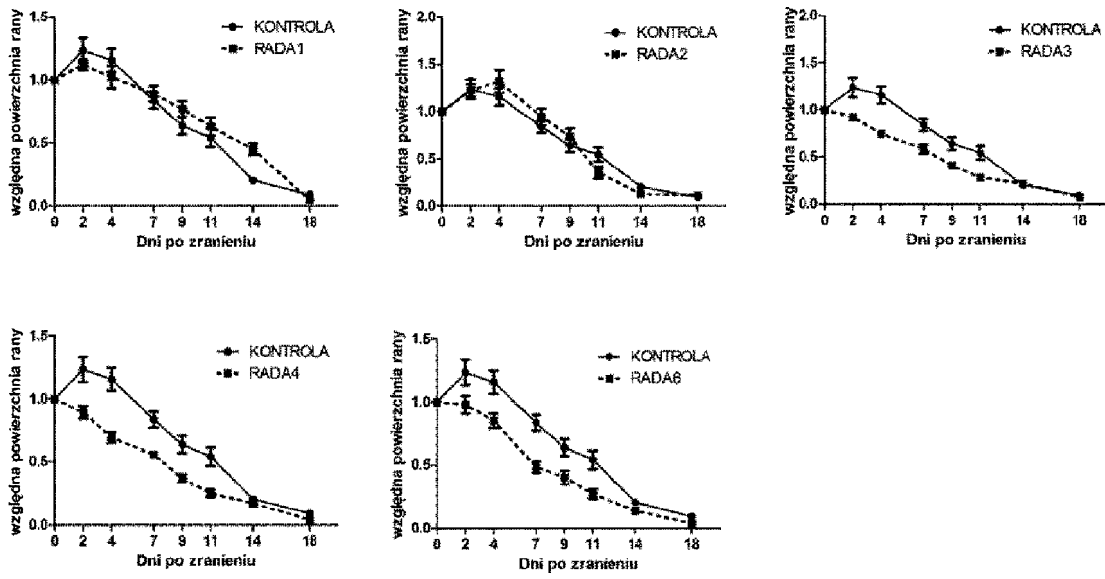


Fig. 28

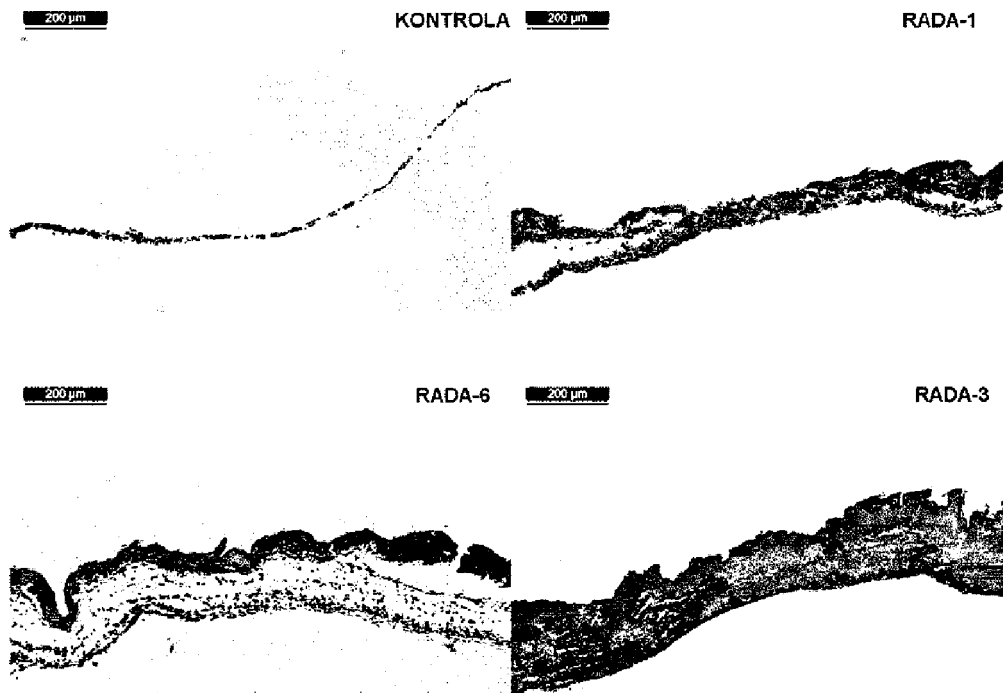


Fig. 29

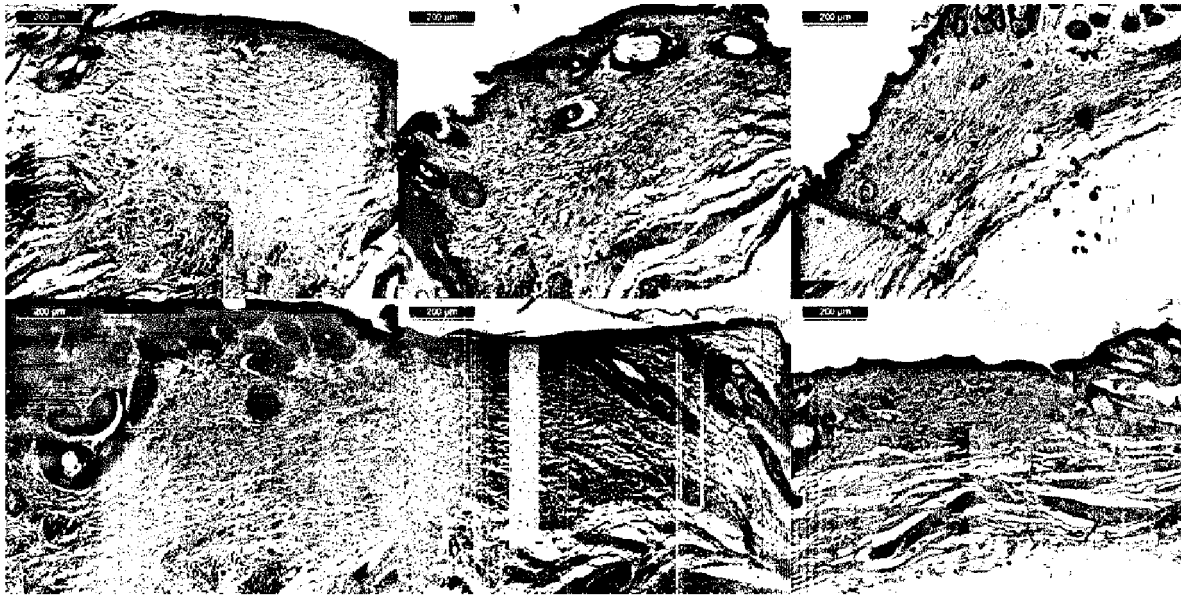


Fig. 30



Fig. 31