REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0720874-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0720874-0

(22) Data do Depósito: 27/12/2007

(43) Data da Publicação do Pedido: 17/07/2008

(51) Classificação Internacional: C07K 14/435; A61K 38/00.

(30) Prioridade Unionista: US 60/878,849 de 05/01/2007.

(54) Título: COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO PEPTÍDEOS BIOATIVOS CURTOS PARA MODULAÇÃO CELULAR E IMUNOLÓGICA

(73) Titular: HELIX BIOMEDIX INC., Sociedade Norte Americana. Endereço: 22122 20Th Ave.Se, Suite 204 Bothel WA 98021, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: SCOTT M. HARRIS; LIJUAN ZHANG; TIMOTHY J. FALLA.

Código de Controle: 4CD03163D5A0FE55 54F06105EFEB0150

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 21/11/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 21/11/2018

Assinado digitalmente por:
Alexandre Gomes Ciancio
Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO PEPTÍDEOS BIOATIVOS CURTOS PARA MODULAÇÃO CELULAR E IMUNOLÓGICA

Esta aplicação reivindica o benefício da prioridade ao Pedido Provisório US N°. 60/878.849, depositado em 5 de janeiro de 2007, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se aos peptídeos tendo atividade biológica e terapêutica. Particularmente, a invenção relaciona-se aos peptídeos curtos tendo quatro a quatorze resíduos de aminoácido contíguos de ID. de SEQ. N°: 1 que exibe atividades proliferativas, migratórias e anti-inflamatórias para células, tais como queratinócitos. A invenção é ainda relacionada aos métodos de utilização destes peptídeos para tratar vários insultos afetando a pele e outras superfícies corporais relacionadas, tais como cavidade oral.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A epiderme da pele consiste em quatro a cinco camadas estratificadas, todas compreendem na maior parte queratinócitos; outros tipos de célula, tais como fibroblastos também povoam a epiderme. Os queratinócitos originam da camada basal, a mais funda da epiderme, e migra gradualmente na porção mais exterior da pele, onde se tornam eventualmente cornificadas e descamadas. Durante esta migração, os queratinócitos diferenciam-se para expressar as enzimas e proteínas estruturais necessárias para cornificação (Presland e Dale, 2000). Dado seu papel proeminente em formar a epiderme, os queratinócitos representam um alvo principal para tratar a pele danificada.

Os queratinócitos são também um constituinte principal dos tecidos mucosos que são contínuos com a epiderme (Presland e Dale, 2000). Tal tecido falta a camada impermeável, cornificada da epiderme, e forma as superfícies de revestimento interno associadas com a boca, nariz, garganta, orelha, ânus e genitália. Similar à pele, as superfícies mucosas são importantes para prevenir a entrada de agentes infecciosos no corpo; assim, ferimento a um destes tipos de tecido pode comprometer a saúde de um indivíduo.

O dano de tecido mucoso e pele ocorrem quando a camada epidérmica é rompida, tal como uma dilaceração, uma queimadura ou uma bolha. O ferimento pode também envolver esmagamento ou contusão, que envolve o dano de tecido sem a fissura simultânea da epiderme. As infecções de pele, assim como determinadas doenças crônicas, tais como câncer e doenças autoimunes podem também danificar as superfícies epidérmicas. As úlceras, tais como aquelas afetando diabéticos ou as associadas com dores de pressão, são outra forma de dano de pele; estas feridas são frequentemente completamente intratáveis, estando inflamadas, com tendência à infecção, e exigindo um processo de cura longo. É geralmente afirmado que a persistência de uma úlcera, ou qualquer outra ferida crônica, é devido a uma falha de processos celulares envolvidos na cura, tal como sinalização celular (Enoch e Price, 2004; Sweitzer e col., 2006). Uma falha é a inabilidade para epitelizar a lesão - os queratinócitos na borda da ferida, embora capazes de proliferar, não mobilizam para cobrir a ferida (Enoch e Price, 2004). Com relação às úlceras diabéticas, outra

falha é a falta de determinadas moléculas de sinalização; esta deficiência que pode impossibilitar os processos de remodelagem que são necessários para orquestrar o fechamento da ferida (Sweitzer e col., 2006).

Outras formas de dano epidérmico são sutis e resultam de um longo período de tempo, comprometendo eventualmente a função da pele na face do ferimento agudo; a cura da ferida é estendida em tempo e pode ser imperfeita (por exemplo, formação de cicatriz). Os problemas cosméticos, tais como rugas, ressecamento, afinamento, queda e maior suscetibilidade ao ferimento são sinais externos usuais de tais doenças. Não surpreendentemente, estes sinais de desgaste-e-rasgo são associados geralmente com o envelhecimento, mas podem também ocorrer prematuramente devido à exposição prolongada aos agentes prejudiciais, tais como raios ultravioletas (foto envelhecimento). Os processos foto reativos induzidos pela luz solar podem contribuir para espessura e elasticidade da pele reduzidas, bem como endurecimento da pele aumentado (Pelicci, 2004; Fisher e col., 2002).

A cura de ferimentos de pele e mucosa agudos orquestrados, em parte através da ativação de queratinócitos basais, que seguem uma via de proliferação, migração e diferenciação para efetuar o fechamento da ferida. Este processo é acompanhado por uma disposição de atividades de remodelamento no local de ferimento (Enoch e Price, 2004). Os queratinócitos localizados no perímetro da ferida proliferam e migram para formar uma única camada sobre a ferida em um processo referido como epitelização. A proliferação e diferenciação adicionais dos queratinócitos

estabelecem uma camada epidérmica compreendendo as camadas estratificadas normais. Os processos inflamatórios podem facilitar a cura da ferida; os monócitos infiltrantes lutam contra a infecção e também liberam fatores que estimulam a epitelização da ferida. Entretanto, os processos inflamatórios podem também agravar a cura; por exemplo, a deposição de fibrina por macrófagos contribui para cicatrização. Contanto que as condições anti-sépticas sejam mantidas, mostrou-se que o fechamento de ferida epidérmica ocorre mais rapidamente e com menos cicatrização quando a participação imune é reduzida (Martin e Leibovich, 2005). É com estas introspecções em mente que modos para a submodulação de inflamação em lesões epidérmicas são atualmente contemplados.

Diversos fatores foram mostrados para estimular a epitelização por queratinócitos durante a cura da ferida na pele e tecidos mucosos associados, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), e fatores de crescimento derivados de plaqueta (PDGFs) (Enoch e Price, 2004). Interessantemente, diversas proteínas antimicrobianas que estão presentes na pele e superfícies mucosas são conhecidas também por ter um papel na estimulação da proliferação e migração celular exigidas para cura de feridas epidérmicas (Shaykhiev e col., 2005; Braff e Gallo, 2006; Zhang e Falla, 2006).

Com o conhecimento que determinados fatores de crescimento estão naturalmente acoplados durante a cura da ferida, o trabalho foi direcionado para desenvolver métodos baseados em fator de crescimento para tratar feridas,

especial as que são geralmente crônicas. Por exemplo, tratamento de úlceras diabéticas com PDGF-BB (Mustoe e col., 1994; Steed, 1995) ganhou a aprovação do FDA. Entretanto, a maioria das tentativas de empregar tal estratégia não atingiu resultados clinicamente significativos, devido em parte às dificuldades associadas com o uso de proteínas terapêuticas. Um problema relaciona-se à liberação ineficiente de fatores de crescimento aos locais de ferida; a aplicação tópica destas proteínas permite somente a exposição do tecido exterior, na maior parte morto à proteína terapêutica. Outros inconvenientes relacionam-se à instabilidade elevada e retenção pobre de proteínas de fator de crescimento após a liberação ao local de ferida.

As dificuldades com o uso de fatores de crescimento e outras proteínas para tratar feridas epidérmicas são relacionadas ao grande tamanho das proteínas envolvidas. O uso difundido de terapias de fator de crescimento também sofre da complexidade e custos elevados associados com a preparação de grandes proteínas. Consequentemente, como se refere ao uso de fatores de proteína em regimes curas de ferida, as preparações menos caras e mais eficazes são presentemente procuradas. Os peptídeos curtos que carregam a atividade das proteínas maiores das quais são derivados (isto é, proteína progenitora) preenchem esta necessidade. Os exemplos precedentes de tais peptídeos curtos foram relatados (Pat. US N°. 6.861.406 e 6.693.077; Lee e col., 2004). Além dos benefícios imediatos de menor custo, produção e manipulação mais simples, os peptídeos bioativos pequenos são também melhor absorvidos e retidos pelo tecido ferido. As características de absorção avançadas de

peptídeos bioativos curtos também os tornam uma opção viável para usos além do cuidado de lesões agudas e crônicas, tal como para o tratamento dos problemas de pele associados com a idade avançada e exposição ao sol.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é trazida em direção aos peptídeos bioativos curtos que são úteis para promover a cura de ferida em mamíferos. As feridas preferivelmente procuradas pelos peptídeos isolados são aquelas que afetam a pele e superfícies mucosas associadas. Embora não sendo limitado a qualquer mecanismo particular, os peptídeos inventivos são capazes de efetuar a cura de ferida estimulando a proliferação e migração celular, assim como pela inibição de inflamação, que pode danificar processos de curas ótimos. Os peptídeos inventivos são úteis em maneiras *in vitro* e *in vivo*, e podem induzir as atividades acima mencionadas nos queratinócitos.

Uma modalidade da presente invenção é trazida em direção aos peptídeos isolados que contêm quatro a quatorze resíduos de aminoácido contíguos de ID. de SEQ. N°: 1. Tais peptídeos representam fragmentos curtos de peptídeo HB 107. Os peptídeos isolados podem conter formas enantioméricas L ou D de aminoácidos, ou combinação dos mesmos. De acordo ainda com outra modalidade da invenção, os peptídeos isolados podem ser conjugados a uma proteína carreadora, ou modificados através de amidação ou lipidação. Estas adições melhoram a bioatividade dos peptídeos quando aplicadas à pele e feridas da mesma.

De acordo com determinadas modalidades preferidas da presente invenção, os peptídeos isolados podem conter um

resíduo de aminoácido de metionina, valina, lisina, ou glutamato no terminal amino. Os peptídeos isolados podem também ter um resíduo de aminoácido de lisina, valina, glicina, ou asparagina no terminal carbóxi. Em outras modalidades preferidas, os peptídeos isolados podem compreender a ID. de SEQ. N°: 3, ID. DE SEQ. N°: 6, ou ID. de SEQ. N°: 12. As modalidades específicas dos peptídeos isolados são ID. de SEQ. N°: 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 15, todas as quais mostram uma ou mais atividades estimulatórias para proliferação celular, migração, e anti-inflamação. Destes peptídeos específicos, ID. de SEQ. N°: 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11 e 12 todos possuem atividade proliferativa celular; e destes peptídeos, ID. de SEQ. N°: 2, 3, 5, 6 e 9 exibem a atividade proliferativa mais forte. Os peptídeos de ID. de SEQ. N°: 3 e 6 possuem atividades proliferativas e migratórias celulares. A ID. DE SEQ. N°: 12 possui ambas atividades de proliferação celular e anti-inflamação, visto que ID. de SEQ. N: 8 e 15 possuem a atividade anti-inflamação celular.

Outra modalidade da presente invenção é trazida em direção às composições que contêm um carreador farmaceuticamente aceitável e um ou mais dos peptídeos acima mencionados. O peptídeo em tais composições preferivelmente variam em concentração de aproximadamente 0,1 µg/mL a aproximadamente 20 µg/mL, ou de aproximadamente 0,1 µg/mL a aproximadamente 50 µg/mL. As formas preferidas da composição são aerosóis, emulsões, líquidos, loções, cremes, pastas, pomadas, pós e espumas.

A presente invenção é direcionada também para métodos usando as composições acima mencionadas para curar feridas

em mamíferos. Tipicamente, o método de tratamento envolve administrar uma quantidade eficaz de composições contendo peptídeos às feridas, especialmente as da pele (epiderme) e tecidos mucosos associados, para uma quantidade eficaz de tempo. Tais feridas incluem abrasões, bolhas, queimaduras, lacerações, úlceras, contusãos, pruridos, cicatrizes, e os efeitos de envelhecimento e exposição ambiental.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1: Os peptídeos inventivos são mostrados enquanto alinham com o peptídeo progenitor HB-107 (ID. DE SEQ. N: 1).

FIG. 2: Expressão de IL6 por células epiteliais de pele em resposta à exposição a luz ultravioleta-B (UVB). As células foram expostas à irradiação de UVB por determinados períodos de tempo (0-35 segundos) e a expressão de IL6 foi medida por ELISA vinte e quatro horas de pós-irradiação de UVB. Cada tratamento foi realizado em triplicata. Refira-se ao exemplo 4.

FIG. 3: Efeito de peptídeos curtos na expressão de IL6 induzida por UVB em células epiteliais da pele. As células foram expostas à irradiação de UVB por 35 segundos, após as células foram incubadas em meio completo (sem soro) com 40 µg/mL de peptídeo [HB-107 (ID. de SEQ. N°: 1), HB-802 (ID de SEQ. N°: 12), HB-1410 (ID. DE SEQ. N°: 15), HB-801 (ID. DE SEQ. N°: 31)] por vinte horas. A expressão de IL6 foi então medida por ELISA. Refere-se ao exemplo 4.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As Pat. US N°. 5.962.410 e 5.861.478 fornecem divulgações úteis para compreender a presente invenção e são incorporadas aqui por referência em sua totalidade. A invenção é direcionada para peptídeos curtos, bioativos que

por exemplo, são derivados do peptídeo HB-107 (ID. de SEQ. N: 1), e métodos de seu uso. O peptídeo HB-107 constitui um fragmento de cecropina B, que é uma proteína antimicrobiana presente em uma espécie de traça. Embora HB-107 não exibe os efeitos bacterioestáticos da proteína da qual é derivado, exibe qualidades de cura de ferida epidérmica (Lee e col., 2004).

Os peptídeos da presente invenção exibem atividades que são importantes para sobreregular processos de cura em tecidos epidérmicos, tais como pele e mucosa associada (por exemplo, cavidade oral). Para não ser limitado a qualquer mecanismo particular, estas atividades são direcionadas para queratinócitos, as células epiteliais responsáveis pelo fechamento de ferida (isto é, epitelização) e desenvolvimento de superfícies epidérmicas. As atividades específicas que os peptídeos inventivos exibem para queratinócitos que são de relevância direta à cura de ferida são estimulação de proliferação celular e migração, bem como a capacidade para sinalização inflamatória subregulada pelos queratinócitos. Embora HB-107 seja capaz de induzir todas estas atividades nos queratinócitos, muito surpreendentemente, os peptídeos da presente invenção o fazem em níveis iguais ou maiores do que HB-107. Estes resultados são surpreendentes e significativos, já que os peptídeos inventivos são somente 26%-74% o comprimento de HB-107.

Por causa deste diferencial de tamanho, os peptídeos da presente invenção são mais fáceis e assim menos caros de preparar comparado à produção de HB-107 e proteínas inteiras, tais como PDGF-BB. Também em contraste aos

peptídeos maiores, os peptídeos divulgados são solubilizados, manipulados (por exemplo, modificação química) e armazenados em uma maneira mais direta. Sua facilidade de manipulação permite um número maior de opções de liberação de fármaco, tais como veículo a ser usado e como deve ser aplicado. O tamanho e solubilidade maior dos peptídeos inventivos permitem sua potência de cura aumentada através da absorção aumentada e retenção no local de ferida; os queratinócitos locais e outras células são expostos a concentrações mais elevadas dos peptídeos por períodos de tempo mais longos.

As atividades biológicas incitadas pelos peptídeos da presente invenção são proliferação e migração celular, bem como a inibição de inflamação. Os dois processos anteriores têm um grande papel em mediar a função de cura de ferida dos peptídeos. Os peptídeos são capazes primeiramente, de estimular a migração de queratinócitos em torno da borda da ferida, e segundo, estimular a proliferação destas células para criar uma camada epidérmica nova sobre o local de ferimento. A terceira atividade, inibir a inflamação, é conseguida através do efeito negativo dos peptídeos divulgados na secreção de citocina interleucina-6 (IL6) por células na ferida. A IL6 foi mostrada ser liberada por queratinócitos epidérmicos em resposta aos fatores associados com dano de tecido (Sugawara e col., 2001); estes sinais de citocina para infiltração de célula imune na ferida, um processo que pode realmente agravar a cura e causar cicatriz (Martin e Leibovich, 2005; Liechty, 2000). Embora a inflamação é importante para prevenir a infecção de ferida, a provisão de boas práticas anti-sépticas

durante o cuidado padrão de ferida nega quaisquer inconvenientes que podem estar associados com o bloqueio de inflamação. Embora as atividades acima são provavelmente aquelas através das quais a invenção efetua a cura de ferida, é notado que a aplicação não é limitada por nenhum um conjunto particular de mecanismos biológicos.

Com relação à indução de proliferação e migração celular, os peptídeos ID. de SEQ. N°: 3 (HB-1061) e ID. de SEQ. N°: 6 (HB-1072) são preferidos. Estes peptídeos produzem aumentos significativos na proliferação celular comparado à indução por HB 107, mas ainda são mais curtos que HB 107 (refere-se aos Exemplos 1 e 2).

São também capazes tão quanto HB 107 em induzir a migração celular. Os peptídeos ID. de SEQ. N°: 8 e ID. de SEQ. N: 12 são preferidos com relação à indução de atividade anti-inflamatória celular (refere-se ao Exemplo 3).

Os peptídeos inventivos também exibem efeitos salutares para os problemas associados com o envelhecimento de pele, ou pele que foi altamente exposta aos agentes prejudiciais, tais como radiação solar. Os peptídeos curtos inalterados por si, ou através de modificação química e/ou liberação especializada, podem ser feitos para absorver através da epiderme para efetuar processos contra aqueles que causam afinamento, enrugamentos, fragilidade e tornar áspero/endurecimento da pele. Um modo principal pelo qual a invenção estimula a preservação da pele é através do efeito positivo dos peptídeos para o crescimento de queratinócito. Enquanto estas células são o componente principal de superfícies epidérmicas e são diminuídas na pele

envelhecida e danificada (Enoch e Price, 2004), a reposição dos mesmos pela estimulação de peptídeo é esperado reverter os problemas acima mencionados. A expressão de IL6 é implicada em processos subjacentes ao espessamento anormal da epiderme em pacientes com determinados problemas auto-imunes (Sato e col., 2001; Oyama e col., 1998); os peptídeos inventivos podem bloquear tal resultado de inflamação relatado inibindo a expressão de IL6.

Peptídeos

Unicamente como um ponto de guia, os peptídeos inventivos podem ser derivados do fragmento de HB-107 (Tabela 1) da proteína cecropina B de traça. As características metabólicas associadas com estes peptídeos são sua capacidade de induzir as atividades de proliferação, migração celular, e/ou anti-inflamatórias. Todos os peptídeos inventivos compartilham da característica comum de ter quatro a quatorze resíduos de aminoácido contíguos de HB-107 (ID. de SEQ. N°: 1). Portanto, os peptídeos da invenção podem consistir de quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou quatorze resíduos de aminoácido contíguos de HB-107 (ID. de SEQ. N°: 1).

Com exceção de ter as composições de aminoácido acima, os peptídeos descritos acima podem adicionalmente conter os seguintes aminoácidos (nome completo/abreviação de três letras/abreviação de única letra): alanina/ala/A, arginina/arg/R, asparagina/asn/N, aspartato/asp/D, cisteína/cys/C, glutamina/gln/Q, glutamato/glu/E, glicina/gly/G, histidina/his/H, isoleucina/ile/I, leucina/leu/L, lisina/lys/K, metionina/met/M, fenilalanina/phe/F, prolina/pro/P, serina/ser/S,

treonina/thr/T, triptofano/trp/W, tirosina/tyr/Y e valina/val/V. Estes resíduos de aminoácido são caracterizados como segue: alifático (alanina, glicina, isoleucina, leucina, prolina, valina), aromático (fenilalanina, triptofano, tirosina), ácido (aspartato, glutamato), básico (arginina, histidina, lisina), hidroxílico (polar) (serina, treonina), contendo enxofre (polar) (cisteína, metionina), e amídico (asparagina, glutamina). Os resíduos de aminoácido não padronizados podem também ser incorporados no peptídeo divulgado incluindo, mas não limitados por, selenocisteína, pirolisina e vários formas cíclicas de aminoácidos.

Os seguintes peptídeos são exemplos não limitantes da presente invenção e são mostrados para finalidades ilustrativas (Tabela 1).

Tabela 1: Peptídeos da presente invenção.

ID. de SEQ. N.	Peptídeo	Sequência
1	HB-107	MPKEKVFLKIEKMGRNIRN
2	HB-1059	EKMGRNIRN
3	HB-1061	MGRNIRN
4	HB-1062	GRNIRN
5	HB-1071	VFLKIEKMG
6	HB-1072	KIEKMG
7	HB-1074	VFLKIEK
8	HB-1076	KEKVFLKIE
9	HB-1057	KIEKMGRNIRN
10	HB-912	MPKEKVFLKIEKMG
11	HB-801	PKEKV
12	HB-802	MPKEK
13	HB-1056	LKIEKMGRNIRN
14	HB-1060	KMGRNIRN
15	HB-1410	PKEK

Os peptídeos ID. de SEQ. N°: 2, ID. de SEQ. N°: 3, ID. de SEQ. N°: 5, ID. de SEQ. N°: 6, ID. de SEQ. N°: 7, ID. de SEQ. N°: 8, ID. de SEQ. N°: 9, ID. de SEQ. N°: 10, ID. de SEQ. N°: 11, ID. de SEQ. N°: 12 e ID. de SEQ. N°: 15 são exemplos de peptídeos associados com uma ou mais das

atividades (proliferativa, migratória, anti-inflamatória) descritas acima. Os peptídeos ID. de SEQ. N°: 2, ID. de SEQ. N°: 3, ID. de SEQ. N°: 5, ID. de SEQ. N°: 6, ID. de SEQ. N°: 7, ID. de SEQ. N°: 9, ID. de SEQ. N°: 10, ID. de SEQ. N°: 11 e ID. de SEQ. N°: 12 são exemplos de peptídeos que podem induzir a proliferação celular. Os peptídeos ID. de SEQ. N°: 3 e ID. de SEQ. N°: 6 são exemplos de peptídeos que podem induzir a proliferação e migração celular. O peptídeo ID. de SEQ. N°: 12 é um exemplo de um peptídeo que exibe atividades proliferativa e anti-inflamatória. Os peptídeos ID. de SEQ. N: 8 e ID. de SEQ. N: 15 são exemplos dos peptídeos tendo atividade anti-inflamatória.

Cada um dos peptídeos descritos acima pode compreender enantiômeros de aminoácidos D ou L, contendo resíduos de uma forma enantiomérica ou uma combinação de ambas as formas. Os peptídeos podem ainda ser aumentados ou modificados, quimicamente ou enzimaticamente, tal como descrito nos seguintes exemplos não limitantes. O terminal carbóxi dos peptídeos pode ser ácido (-COOH) ou ser amidado (por exemplo $-CONH_2$, -CONHR, ou $-CONR_2$). A amidação do terminal carbóxi pode tornar os peptídeos inventivos menos suscetíveis à degradação de protease e aumentar sua solubilidade comparado às formas de ácido livre, portanto fornecendo potência terapêutica aumentada. Os peptídeos podem também ser lipidados os quais podem fornecer a penetração da pele melhorada. As modificações de peptídeo podem ser feitas tal que um hidrogênio do grupo amino de terminal N é substituído, um grupo hidroxila (OH) do grupo carboxílico de terminal C é substituído, o grupo amino de terminal N inteiro é substituído, ou o grupo carboxílico de

terminal C inteiro é substituído. Uma ou mais das ligações moleculares que ligam os aminoácidos de cada peptídeo podem ser uma ligação não peptídica. Tais ligações não peptídicas incluem, mas não são limitadas a, ligações imido, hidrazina de éster, semicarbazóide e azo.

Uma variedade de modificações podem ser feitas aos peptídeos contanto que as atividades proliferativa, migratória e anti-inflamatória características dos mesmos sejam retidas. Algumas modificações podem ser usadas para aumentar a potência do peptídeo, enquanto outras modificações podem facilitar a manipulação do peptídeo. Os grupos funcionais de peptídeo que podem tipicamente ser modificados incluem hidroxila, amino, guanidinio, carboxila, amida, fenol, anéis de imidazol ou sulfidril. As reações típicas, não-limitantes destes grupos incluem o seguinte: acetificação de grupos de hidroxila por haletos de alquila; esterificação, amidação ou hidrogenação (isto é, redução a álcool) de grupos carboxila; desamidação, acilação, alquilação, arilação de grupos amino (por exemplo, grupo amino primário do peptídeo ou grupo amino de resíduos de lisina); halogenação ou nitração de grupos fenol tirosina.

Os peptídeos podem ser conjugados às moléculas carreadoras solúveis ou insolúveis para modificar suas propriedades de solubilidade como necessário e para aumentar as concentrações locais de peptídeos em tecidos alvos. Os exemplos de moléculas carreadoras solúveis incluem polímeros de polietilenoglicol (PEG) e polivinilpirrolidona; exemplos de polímeros insolúveis incluem silicatos, poliestireno, e celulose. Os peptídeos podem também ser microencapsulados para melhorar sua

estabilidade durante e após a aplicação terapêutica; tipicamente, o poliéster e microsferas de PEG são usados para encapsular e estabilizar os peptídeos.

Os vários métodos de preparar microsferas para encapsulação de peptídeo podem ser empregados dependendo da natureza hidrofílica ou hidrofóbica da composição de peptídeo a ser encapsulada. Os exemplos de protocolos para tais métodos são encontrados em Wang HT e col. (1991, *J. Control. Release* 17:23-25) e Pat. US N°. 4.324.683, ambos são incorporados aqui em sua totalidade. *In vitro* os estudos de liberação de peptídeo podem ser realizados para determinar a disponibilidade relativa do peptídeo após ter sido incorporado em uma microsfera. As microsfera (200 mg) são suspensas em solução salina tamponada de fosfato (PBS) de pH 7,2 (2,5 ml) e agitada em 37 graus C e 100 rpm em um vibrador incubadora ambiental (G-24, New Brunswick Scientific Co., Edison, New Jersey). Em tempos de amostragem específicos (cada dia para os primeiros 4 dias e dia sim dia não depois disso) a solução tampão é completamente removida e substituída com PBS fresco. O teor de peptídeo do PBS é medido usando o método Bradford ou outro ensaio quantitativo apropriado tipicamente usado para análise de proteína.

Todos os peptídeos divulgados podem ser sintetizados usando a química de fase sólida Fmoc (9-fluorenilmetóxicarbonil) padrão em um Advanced ChemTech Apex 396 Multiple Peptide Synthesizer. O Apex 396 é equipado com um bloco de reação de 40 poços para a produção de até 40 peptídeos simultaneamente em uma faixa de 0,15 mmol. Os peptídeos podem ser preparados como sequências de

ácido livre ou amidado usando aminoácidos padrão. A resina foi primeiramente lavada e pré-inchada com N,N-dimetil formamida (DMF). O tempo de inchamento foi uma hora para resinas de amida Rink. O grupo de proteção Fmoc foi removido com piperidine 25% em DMF por 25 minutos, depois do qual a piperidina foi completamente lavada da resina. Para controlar os processos de racemização, os monômeros de aminoácido Fmoc foram pré-ativados em uma solução equimolar de 1-hidróxi-benzotriazol (HOBt) ou 1-hidróxi-7-aza-benzotriazol (HOAt) em DMF em uma concentração de 0,5 M. Os acoplamentos de amida foram realizados usando O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HATU) PyBop® ou 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetramet-ilurônio hexafluorofosfato (HBTU) como um agente de ativação e 2,5 a 5,0 vezes de excesso molar de aminoácido sob condições básicas usando uma base impedida (diisopropiletilamina). Os tempos de acoplamento foram 1 a 1,5 horas seguido por uma lavagem e re-acoplamento para realizar um par dobro ou triplo antes da desproteção e continuação da cadeia crescente de peptídeo. A eficiência de acoplamento foi monitorada usando o teste Kaiser padrão. Uma vez que a síntese de peptídeo foi terminada na resina, o grupo Fmoc final foi removido como acima e as sequências foram deixadas como base livre.

A clivagem da ligação ácido lábil do peptídeo à resina foi realizada usando ácido trifluoroacético 95% (TFA) e água com renovadores apropriados adicionados. Após a clivagem ser permitida prosseguir por aproximadamente 30 minutos a uma hora, os peptídeos liberados foram imediatamente removidos do bloco de clivagem e transferidos

aos tubos para a remoção de TFA sob pressão reduzida. Os peptídeos estavam então prontos para purificação e análise através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando uma coluna de fase reversa C18 e espectrometria de massa. A confirmação de sequência primária e purificação preparativa foram realizadas usando um sistema CL/EM/EM (ABI API2000).

Geral ao protocolo acima, os peptídeos podem ser produzidos usando qualquer método conhecido aos hábeis na técnica, tal como aqueles divulgados em Merrifield, R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis I.*, J. AM. CHEM. SOC. 85:2149-2154 (1963); Carpino, L.A. e col., *[(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. e col., *Instrument For Automated Synthesis Of Peptides*, ANAL. CHEM. 38:1905-1914 (1966); ou Kent, S.B.H. e col., *High Yield Chemical Synthesis Of Biologically Active Peptides On An Automated Peptide Synthesizer Of Novel Design*, IN: PEPTÍDEOS 1984 (Ragnarsson U., ed.) Almqvist e Wiksell Int., Estocolmo (Suécia), pp. 185-188, todos os quais são incorporadas aqui por referência em sua totalidade. Preferivelmente, os peptídeos serão produzidos por uma máquina capaz de adição sequencial de aminoácidos a uma cadeia de peptídeo crescente. Entretanto, os peptídeos podem também ser fabricados usando a metodologia de fase de solução padrão, que pode ser favorável aos esforços de produção em larga faixa.

Métodos de uso

As modalidades adicionais da presente invenção são

direcionadas para métodos de uso dos peptídeos descritos acima, tais como em formulações ou como agentes terapêuticos. Estes métodos podem envolver o uso de um único peptídeo, ou peptídeos múltiplos em combinação.

Os peptídeos da presente invenção podem ser usados para tratar feridas de pele (epiderme, derme e hipoderme) e tecidos mucosos associados. Como usado aqui, o termo "tecidos mucosos associados" relaciona-se a qualquer tecido organizado em uma maneira similar à pele e contendo células epiteliais. Os queratinócitos são um exemplo não limitante de tais células epiteliais. Os exemplos de tais tecidos são superfícies oral, nasofaríngea, auricular e urogenital, bem como a conjuntiva palpebral do olho. Outros exemplos de tecidos mucosos associados incluem o revestimento inteiro (isto é, lúmen) do canal alimentar, incluindo esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso (cólon), e reto. Estes últimos exemplos podem sustentar feridas/lesões, bem como aquelas que podem afetar a pele, e como tal podem ser procurados com a presente invenção. Os exemplos de feridas/lesões/traumas que podem afetar estes tecidos e são favoráveis ao tratamento com os peptídeos inventivos são abrasões, bolhas, queimaduras, dilacerações, perfurações, úlceras, contusãos, pruridos e cicatrizes. O trauma pós-cirúrgico de tecido pode também ser tratado com os peptídeos.

Os peptídeos inventivos podem também ser usados para prevenir ou reverter os efeitos de envelhecimento em todos os tecidos acima mencionados. Em uma maneira relacionada, os peptídeos poderiam ser aplicados ao tecido que foi danificado pela exposição aos vários agentes externos, tais

como luz solar. Os exemplos de debilitação relativos ao envelhecimento e exposição são enrugamento, ressecamento, afinamento, queda de pele e maior suscetibilidade ao ferimento. A invenção pode também ser usada como um cosmético nestas considerações para render uma aparência e textura mais jovem, e para fornecer melhor função.

Outros problemas de tecido que são tratados eficazmente usando os peptídeos da presente invenção são relacionados à alergia ou autoimunidade. Tais doenças incluem dermatite, psoríase, escleroderma, penfígo e doença inflamatória do intestino.

As composições usadas para liberar os peptídeos no método terapêutico acima podem ser um aerossol, emulsão, líquido, loção, creme, pasta, pomada, pó, ou espuma, ou outro formulação farmaceuticamente aceitável. Além disso, os peptídeos podem ser liberados usando formulações menos envolvidas, tais como água deionizada/destilada, PBS ou soluções salinas médicas padrão. Geralmente, uma formulação farmaceuticamente aceitável incluiria qualquer carreador apropriado para uso na pele humana. Tais carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem etanol, dimetil sulfóxido, glicerol, sílica, alumina, amido, e carreadores e diluentes equivalentes. A formulação pode opcionalmente ter apelo cosmético, e/ou conter outros agentes, tais como retinóides ou outros peptídeos que podem atuar como adjuvantes para a ação terapêutica dos peptídeos inventivos. Os antibióticos podem também ser adicionados à formulação a fim de defender contra infecção, permitindo desse modo processos de cura máxima ocorrerem. A concentração do peptídeo na composição pode ser aproximadamente 0,1 µg/mL a

aproximadamente 50 µg/mL ou aproximadamente 0,1 µg/mL a aproximadamente 20 µg/mL; entretanto, a concentração final empregada pode variar fora destas faixas, dependendo da natureza da condição de ferida/tecido, da bioatividade do peptídeo inventivo e uso de qualquer adjuvante ou técnica obter a absorção de composição melhorada.

As composições da presente invenção podem conter um ou mais agentes adicionais que exercem a atividade de cuidado da pele.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, onde a composição está em contacto com o tecido queratinoso humano, quaisquer componentes adicionais além dos peptídeos inventivos devem ser apropriados para aplicação ao tecido queratinoso; isto é, quando incorporados na composição, tais outros componentes demonstram toxicidade imprópria, incompatibilidade, instabilidade, resposta alérgica, e similares dentro do escopo de julgamento médico sadio. O CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, segunda edição (1992) descreve uma grande variedade de ingredientes farmacêuticos e cosméticos não limitantes comumente usados na indústria de cuidado de pele, que são apropriados para uso nas composições da presente invenção. Os exemplos destas classes de ingrediente incluem: abrasivos, absorventes, componentes estéticos, tais como fragrâncias, pigmentos, colorações/corantes, óleos essenciais, sensações de pele, adstringentes, etc. (por exemplo, óleo de cravo-da-índia, mentol, cânfora, óleo de eucalipto, eugenol, lactato de mentil, destilado de hamamélis), agentes antiacne, agentes antiaglomerantes, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos (por exemplo, iodopropil butilcarbamato),

antioxidantes, ligantes, aditivos biológicos, agentes tampões, agentes de volume, agentes quelantes, aditivos químicos, biocidas cosméticos, desnaturantes, adstringentes de fármaco, analgésicos externos, formadores de filme ou materiais, agentes opacificantes, ajustadores de pH, propelentes, agentes de redução, sequestrantes, agentes de descoramento e clareador de pele (por exemplo, hidroquinona, ácido cójico, ácido ascórbico, fosfato ascorbil de magnésio, ascorbil glucosamina), agentes de condicionamento de pele (por exemplo, umectantes), agentes calmantes e/ou de cura de pele (por exemplo, pantenol e seus derivados, aloe vera, ácido pantotênico e seus derivados, alantoína, bisabolol, e glicirizinato de dipotássio), agentes de tratamento de pele, espessantes, e vitaminas e derivados dos mesmos.

A administração dos peptídeos inventivos e composições associadas pode ser feita aos humanos e animais, incluindo todos os mamíferos. A aplicação pode também ser feita em combinação com materiais típicos e/ou experimentais, tais como enxertos de tecido, produtos de cultura de tecido, oxigênio e revestimentos. Em geral, a composição pode ser administrada topicamente, oralmente, transdermicamente, sistematicamente, ou por qualquer outro método conhecido aos de habilidade na técnica por serem úteis para liberar os peptídeos inventivos ao local de ferimento. As composições podem também ser aplicadas de maneira *in vitro* ou *ex vivo*, às células ou enxertos de pacientes crescendo em cultura, por exemplo.

Devido a seu tamanho pequeno, os peptídeos são esperados serem capazes de ganhar por eles mesmos algum nível de permeabilidade através da pele; entretanto,

determinadas técnicas podem ser usadas para amplificar este movimento. Por exemplo, os grupos lipofílicos (não polar) podem ser adicionados aos peptídeos, ou os peptídeos podem ser liberados à pele em um excipiente lipofílico, a fim de melhorar a acessibilidade do peptídeo ao estrato córneo para permitir a translocação às camadas epidérmicas inferiores. Desse modo tais modificações lipofílicas podem ser consideradas como um pró-fármaco. Os melhoradores de permeação, tais como solventes e tensoativos conhecidos podem ser usados no excipiente para permitir melhor absorção de peptídeo. As técnicas especiais que são antecipadas para serem úteis em melhorar o acesso do peptídeo ao tecido alvo/ferimento incluem iontoforese, eletroforese e ultrassom. Um dispositivo iontoforético consiste em dois elétrodos imersos em uma solução de eletrólito e colocados na pele. Quando uma corrente elétrica é aplicada através dos elétrodos, um campo elétrico é criado através do estrato córneo que conduz a liberação dos peptídeos. A eletroporação envolve a aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem para aumentar a permeação através das bicamadas lipídicas. Isto difere da iontoforese na duração e intensidade da aplicação de corrente elétrica (iontoforese usa um campo elétrico de baixa voltagem relativamente constante). O pulso elétrico de alta tensão de eletroporação é acreditado induzir uma formação reversível de poros hidrofílicos nas membranas das lamelas lipídicas que podem fornecer um alto grau de melhora de permeação. O ultrassom aplica ondas sonoras tendo uma frequência maior do que 16 kHz à pele, que causa compressão e expansão do tecido através do qual as ondas

sonoras viajam. As variações de pressão resultantes causam vários processos (por exemplo, cavitação, mistura, aumento na temperatura) que podem melhorar a permeação dos peptídeos.

Todas as formulações e usos de peptídeo acima são conhecidos na técnica. Os modos adicionais de preparação e uso dos peptídeos inventivos são descritos, por exemplo, na Patente US N°. 6.492.326 e 6.974.799, ambas são incorporadas aqui por referência em sua totalidade.

Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar determinadas modalidades preferidas da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Identificação de peptídeos que estimulam a proliferação celular.

Como o fragmento de peptídeo HB-107 (ID. de SEQ. N: 1) tem sido previamente mostrado para estimular a cura de ferida *in vivo* (Lee e col., 2004), foi suposto que dentro da sequência de HB-107 pode existir ainda fragmentos de peptídeo menores que podem similarmente ou melhor estimular processos de cura de ferida e relacionados. Para examinar esta questão, um conjunto de sobreposição de fragmentos de peptídeo de HB-107 foi gerado usando a química de peptídeo de fase sólida padrão. Estes peptídeos foram então analisados para atividade de proliferação celular em concentrações de 0,22, 2,15, 21,5 e 46,4 µg/mL. Vários peptídeos causaram um aumento significativo na proliferação de queratinócitos epidérmicos em baixas concentrações (Tabela 2), incluindo peptídeos HB-1061 (ID. de SEQ. N: 3) e HB-1072 (ID. de SEQ. N: 6) que, respectivamente, contêm somente sete e seis aminoácidos cada um. Diversos outros

peptídeos exibiram atividade estimulatória em níveis iguais ou acima de HB-107 (Tabela 2). Em conclusão, a proliferação celular induzida por vários peptídeos inventivos excedeu o nível induzido pelo peptídeo progenitor HB-107. De forma importante, diversos destes fragmentos são significativamente mais curtos que HB-107.

Tabela 2: Indução de proliferação de queratinócito epidérmica de murino PAM 212 pelos peptídeos inventivos. Os valores representam a proliferação celular como uma porcentagem de proliferação celular de controle (células tratadas com PBS somente). Os valores em negrito indicam níveis de proliferação excedendo 150% de proliferação celular de controle.

ID. de SEQ. N.	Peptídeo	0.22 µg/mL	2.15 µg/mL	21.5 µg/mL	46.4 µg/mL
1	HB-107	57	75	121	126
12	HB-802	121	130	135	133
11	HB-801	101	100	113	131
10	HB-912	100	84	125	137
7	HB-1074	97	93	120	149
5	HB-1071	106	127	**188**	**155**
13	HB-1056	48	39	64	97
9	HB-1057	121	118	**171**	**167**
6	HB-1072	98	107	**185**	**237**
2	HB-1059	95	128	**162**	**186**
14	HB-1060	57	52	90	83
3	HB-1061	122	**156**	**163**	**241**

Os ensaios de proliferação celular prosseguiram do seguinte protocolo experimental:

Ensaio de proliferação celular usando uma linhagem celular de queratinócito de camundongo.

OBJETIVO: Para determinar o potencial antiproliferativo ou citotóxico de um artigo teste quando aplicado aos queratinócitos epidérmicos em cultura.

SISTEMA DE TESTE: A linha celular de queratinócito murino PAM212 ou Queratinócitos Epidérmicos Humanos Normais primário (NHEK, de Clonetics) são modelos preferidos,

embora outras células possam ser usadas.

REAGENTES:

1. Meios de crescimento celular: Dulbecco's Modified Eagles Medium contendo o soro de bezerro recém-nascido 10% (DMEM-10), penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL), e gentamicina (50 µg/mL) ou Meio de Crescimento de Queratinócito (KGM, de Clonetics) para células humanas.

2. Meios de veículo: Dulbecco's Modified Eagles Medium contendo o soro de bezerro recém-nascido 1,0% (DMEM-I), penicilina (100 unidades/mL), e estreptomicina (0,1 mg/mL) ou Meio Basal de Queratinócito (KBM, de Clonetics) para células humanas.

3. Solução concentrada vermelho neutro: o pó vermelho neutro é adicionado a Solução Salina Tamponada de Fosfato de Dulbecco (DPBS) em uma concentração de 3 mg/mL. A solução resultante é então filtrada estéril.

4. Meios vermelho neutro: a solução concentrada vermelho neutro é adicionada à DMEM ou KBM em uma concentração final de 50 µg/mL.

5. Meios MTT: pó de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo) é adicionado à DMEM ou KBM em 1 mg/mL e filtrado ou centrifugado para remover quaisquer precipitados. A solução de MTT é usada dentro de 24 horas.

6. Solução de fixação consistindo de formaldeído 1% e cloreto de cálcio 1% em uma solução aquosa.

7. Solução de lavagem consistindo de PBS.

8. Solução lisante: ácido acético glacial 1,0% e etanol 50% em uma solução aquosa para vermelho neutro, ou

isopropanol acidificado para células MTT tratadas.

PLAQUEAMENTO DE CÉLULA:

Os queratinócitos são examinados microscopicamente diariamente. Enquanto a cultura se torna 50-75% confluente, o meio na placa é aspirado e 0,25% tripsina/EDTA é adicionado (0,05% de tripsina para células humanas). Quando as células se tornam arredondadas, a tripsina é neutralizada pela adição de um volume igual de DMEM ou KBM suplementado com aproximadamente 10% de soro bovino ou usando a solução de neutralização de tripsina (TNS, de Clonetics). As células são então centrifugadas e a granulado é ressuspensa em 1 ml de DMEM-1 ou KBM. Um hemacitômetro é usado para contar a suspensão celular e o número total de células/mL é ajustado a 1,5-2,5 x 10^4 células/mL com DMEM-1 ou KBM. As células são então plaqueadas em placas de 96 poços em uma concentração de 3,0-5,0 x 10^3 células/poço adicionando 200 µL de suspensão celular a cada poço. Tipicamente, os 60 poços centrais são usados e os poços externos são enchidos com DMEM ou PBS para minimizar os efeitos de evaporação.

PREPARAÇÃO DE AMOSTRA:

Uma solução concentrada do artigo teste é preparada usando DMEM-1 ou KBM, e todas outras diluições restantes são preparadas previamente a esta solução. Tipicamente, cada diluição é filtrada através de filtros de 0,2 µm antes de aplicação à cultura celular. Uma solução ou suspensão de 1,0% (peso/vol ou vol/vol) é preparada, e 10 vezes ou 3 vezes diluições de série são feitas no meio de cultura.

DOSE:

As células são examinadas 18-24 horas depois

plaqueamento para assegurar a fixação e divisão celular, e então 100 µL do meio é aspirado, deixando para trás 100 µL em cada poço. Então 100 µL de uma concentração 2x de cada diluição de artigo teste é adicionada aos poços de replicação. Para o controle negativo, 100 µL do meio de veículo (DMEM-1 ou KBM) é adicionado aos poços de controle. A microplaca é então incubada em 37 graus C e CO_2 5,0% por 48-72 horas após dose, e as células são permitidas proliferar sem perturbação. Depois desta exposição de 48-72 horas, todos os meios são aspirados e a proliferação é avaliada por um dos métodos abaixo.

Opção A: captação de vermelho neutro. Após exposição e aspiração do meio, 200 µL de meio vermelho neutro é adicionado imediatamente a cada poço. A microplaca é retornada à incubadora por três horas adicionais. Depois deste período de captação de tintura, a microplaca é removida da incubadora e delicadamente invertida, e o meio vermelho neutro é decantado em uma bandeja coletora. As células são então fixadas com solução de fixação por aproximadamente um minuto. A solução de fixação é decantada, e a microplaca é lavada delicadamente três vezes com solução de lavagem. A solução de lavagem é decantada, e 200 µL de solução lisante é adicionada. Após pelo menos 15 minutos, os teores de cada poço são re-pipetados para assegurar a distribuição de cor uniforme em cada poço, e uma alíquota é lida no espectrofotômetro como detalhada abaixo.

Opção B: Ensaio de conversão de MTT. Após a exposição e aspiração de meio, 200 µL de meios de ensaio MTT é adicionado imediatamente a cada poço. (MIT deve ser usado

somente se o artigo teste não reduz MIT diretamente, como determinado por um experimento procurador de faixa ou teste de compatibilidade de MIT). A microplaca é retornada à incubadora por três horas adicionais. Depois deste período de captação de tintura, a microplaca é removida da incubadora e invertida delicadamente, e o meio de MTT é decantado em uma bandeja coletora. As células são então delicadamente lavadas três vezes com solução de lavagem. A solução de lavagem é decantada, e 200 µL de solução lisante é adicionado. Após lisar por pelo menos 60 minutos, cada poço é re-pipetado para assegurar a distribuição de cor uniforme em cada poço, e a absorvância é lida no espectrofotômetro como detalhado abaixo.

Opção C: Análises a base de citometria de fluxo. Após exposição, o meio é ajustado a 10 µM de bromodeoxiuridina (BrdU) e incubado em 37 graus C por 45 minutos. Durante esta incubação, BrdU, um análogo de timidina, é incorporado no DNA de células proliferantes. As células são então colhidas por tripsinização. Depois da centrifugação, a granulado celular ressuspenso em 0,5 ml de PBS e as células são fixadas pela adição de etanol 70%. As células são então lavadas e tingidas com iodeto de propídio de tintura fluorescente (vermelho) DNA-específico. As células proliferantes são tingidas com um anticorpo fluorescente (verde) BrdU-específico. A análise de ciclo celular, bem como a quantidade de células proliferantes tingindo positivas para BrdU é determinada usando citometria de fluxo. (Nota: para estudos de citometria de fluxo, as células são cultivadas em placas de 24 poços ou 6 cm).

ANÁLISE DE DADOS

Estudos de captação de tintura: Para valores limites a base de tintura a densidade ótica dos poços é lida usando um Titertek Multiskan MCC/340 em um comprimento de onda de 540 subtraindo da absorvência em um comprimento de onda de referência de 620 nm para vermelho neutro, ou 670 nm a 680 nm de comprimento de onda de referência para MIT. Um impresso dos valores de absorvência é gerado pelo leitor de placa. A absorvância média e desvios padrões são calculados para cada grupo de tratamento, e os resultados são expressos como porcentagem de absorvâncias de controle. Cálculo EC50: Os dados são traçados como porcentagem de absorvâncias controle contra concentrações para cada amostra teste. O EC50 é extrapolado da linha de regressão desenhada através dos dados em um gráfico do Excel 5.0. Além disso, o EC50 é calculado usando a equação para a linha de regressão fornecida pelo gráfico do Excel 5.0 ou usando um macro do Excel 5.0.

Estudos de Citometria de Fluxo: Para análise citométrica de fluxo o BrdU-marcado positivo será determinado e um teor de proliferação (isto é, % de células proliferando ativamente no momento de colheita) será calculado. Opcionalmente, outros parâmetros, tais como porcento de viabilidade celular e a porcentagem de células apoptóticas nas amostras podem também ser determinadas.

Exemplo 2: Identificação de peptídeos que estimulam a migração celular.

A proliferação celular sozinha não é suficiente para ajudar na cura de ferida. Ao sustentar um ferimento, as células na borda da ferida proliferam; a migração de tais células recentemente formadas para fechar o ferimento (ou

lesão crônica de tecido mais velho, disfuncional) é de igual importância. Para direcionar este problema, HB-107 e fragmentos de peptídeo do mesmo foram examinados usando um ensaio de migração celular de queratinócito baseado em um teste de risco de cultura de tecido simples. Este ensaio demonstrou que peptídeos, tais como HB-1072 (ID. de SEQ. N: 6) e HB-1061 (ID. de SEQ. N: 3) são capazes de aumentar a migração de células em uma maneira similar a do peptídeo HB 107 progenitor (Tabela 3). É de interesse notar que os peptídeos HB-1072 e HB-1061 sobrepõem como parte de HB-107, e que o análogo HB-1062 (ID. de SEQ. N: 4) não exibe nenhuma atividade migratória em células. O protocolo para este ensaio é padrão e foi descrito por Shanley e col. (2004, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45:1088-1094), o artigo que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Tabela 3: Indução de migração de queratinócito epidérmica humana pelos peptídeos inventivos, como medido por um teste de risco. Os valores representam a porcentagem de risco comparado à largura inicial de risco à monocamada celular, após 6 ou 10 horas de exposição ao peptídeo.

ID. de SEQ. N.	Peptídeo	6 h	10 h
NA	PBS control	11	33
1	HB-107	52	78
6	HB-1072	55	77
3	HB-1061	44	67
4	HB-1062	0	24

Exemplo 3: Identificação de peptídeos que estimulam a atividade anti-inflamatória em células em repouso.

Além do aumento da taxa de cura, o peptídeo HB-107 foi também mostrado por diminuir o nível de inflamação associado com uma ferida. Para identificar os fragmentos de

peptídeo pequenos que podem exibir tal atividade, os fragmentos de HB 107 foram selecionados para a atividade de reduzir uma citocina inflamatória chave, IL6. Descobriu-se que os fragmentos de peptídeo HB-802 (ID. de SEQ. N: 12) e HB-1076 (ID. de SEQ. N: 8) diminuição do nível de expressão IL6 ao mesmo grau que o peptídeo progenitor HB-107 (Tabela 4). O protocolo para este ensaio é padrão e descrito por Murakami e col. (2004, *J. Immunol*. 172:3070-3037), o artigo o qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Tabela 4: Repressão de expressão de IL6 em células epiteliais expostas aos peptídeos inventivos. A quantidade de IL6, expressa em pg/mL (colunas 3-5), foi determinada em 24 e 48 horas após a adição de meio contendo 20 µg/mL de peptídeo. A mudança percentual na expressão de IL6 é dada na coluna 8.

24 h							
ID. de SEQ. N.	Teste	Poço 1	Poço 2	Média	DP	Mudança	% Mudança
	PBS controle	334.26	292.09	313.175	21.085	NA	NA
	PBS controle	311.02	335.98	323.5	12.48	NA	NA
	PBS controle	319.63	349.75	334.69	15.06	NA	NA
12	HB-802	278.32	288.65	283.485	5.165	-40.435	-12.50%
1	HB-107	307.58	264.55	286.065	21.515	-37.435	-11.60%
8	HB-1076	278.32	255.08	266.7	11.62	-56.8	-17.60%

48 h							
ID. de SEQ. N.	Teste	Poço 1	Poço2	Média	DP	Mudança	% Mudança
	PBS control	1049.2	1007.3	1028.25	20.95	NA	NA
	PBS control	927.27	1022.8	975.035	47.765	NA	NA
	PBS control	1002.1	904.89	953.495	48.605	NA	NA
12	HB-802	774.07	762.02	768.045	6.025	-206.99	-21.20%
1	HB-107	690.58	786.12	738.35	47.77	-236.685	-24.30%
8	HB-1076	726.73	728.45	727.59	0.86	-247.445	-25.40%

Exemplo 4: Identificação de peptídeos que inibem a atividade inflamatória induzida por ultravioleta-B (UVB) em células.

Dado que determinados peptídeos pequenos foram capazes

de promover atividade anti-inflamatória em células em repouso (veja Exemplo 3), foi de interesse saber se os peptídeos pequenos poderiam promover tal atividade em células que foram expostas à radiação UVB. A radiação UVB danifica a pele e promove o envelhecimento da mesma. Já que a inflamação no tecido danificado é um contribuinte ao envelhecimento nesse tecido, a redução de inflamação epidérmica resultando de dano induzido por luz ultravioleta diminuirá os efeitos de envelhecimento da mesma.

Um ensaio foi realizado para determinar se os fragmentos de peptídeo de HB-107 podem induzir atividade anti-inflamatória em células expostas à luz ultravioleta. As células epiteliais da pele humana (ATCC CRL-2592) foram semeadas em placas de 6 poços e crescidas mais de 95% de confluência em DMEM com 4 mM de L-glutamina ajustada para conter 1,5 g/l de bicarbonato de sódio e 4,5 g/l de glicose (meio completo) suplementada com soro bovino fetal 10%. As células foram privadas de soro por 5 horas antes do tratamento por UVB. UVB foi gerado usando uma lâmpada UVLMS (4W modelo, conjunto 3UV, Upland, CA) com o comprimento de onda de irradiação ajustado em 302 nm. A de lâmpada UV foi colocada 12 cm acima da placa de cultura de tecido (placa de 6-poços) e dois poços foram tratados ao mesmo tempo para permitir irradiação homogênea de UVB. As células foram expostas à irradiação UVB (450 $\mu W/cm^2$, medida usando um radiômetro) em PBS para evitar a geração induzida por luz ultravioleta de fotoquímica tóxica. A expressão de IL6 foi medida como um indicador de atividade inflamatória celular em resposta ao UVB. Como mostrado na FIG. 2, a expressão de IL6 em células epiteliais de pele foi induzida em a maneira

dose dependente de UVB, assim demonstrando que a luz ultravioleta estimula processos inflamatórios celulares em células epiteliais da pele.

Os peptídeos individuais foram selecionados para determinar os efeitos dos mesmos na expressão de IL6 induzida por UVB em células epiteliais da pele. As células foram expostas a UVB (450 $\mu W/cm^2$) por 35 segundos em PBS, depois o qual PBS foi substituído com o meio completo sem soro na presença ou ausência de 40 µg/ml de peptídeo e incubado em 37 graus de C /5% por vinte horas. O meio sobrenadante foi então coletado e centrifugado em 10.000 rpm para remover os restos, antes de ELISA para IL6 humano (Cellsciences, MA). Descobriu-se que sequências específicas dentro do peptídeo HB-107 são capazes de significativamente reduzir a expressão de IL6 em células submetidas a um estímulo inflamatório potente (Tabela 5, resultados mostrados graficamente na FIG: 3).

Tabela 5: Efeito de peptídeos curtos na expressão de IL6 induzida por UVB em células epiteliais de pele. As células foram expostas a UVB seguido pela incubação com o peptídeo. As células controle não receberam nem UVB ou tratamento de peptídeo. A expressão de IL6 foi medida por ELISA usando um espectrômetro de luz (OD 450).

ID. de SEQ. N.	UV/tratamento de peptídeo	IL6 (OD 450)	DP
	Controle	0.0730	0.001414
	UV somente	0.7305	0.062933
1	HB-107	0.7315	0.043134
12	HB-802	0.6500	0.035423
15	HB-1410	0.5105	0.013435
11	HB-801	0.8275	0.204354

Os resultados deste estudo mostram que peptídeos, tais como HB-1410 (PKEK, ID. de SEQ. N: 15) são capazes de

significativamente reduzir o nível de IL6 produzido por células epiteliais da pele em resposta à radiação UV. Esta atividade é de aplicação particular ao cuidado de pele após a exposição ao sol, e também tem ampla aplicação para reduzir a inflamação associada em uma variedade de condições de pele resultando das feridas e envelhecimento. É interessante notar que mesmo as mudanças menores na sequência de peptídeo podem significativamente alterar a atividade inibitória do peptídeo para a expressão de IL6 em células epiteliais da pele [por exemplo, comparar atividades de HB-801 (PKEKV) e HB-802 (MPKEK) com a atividade inibitória de HB-1410]. DE forma interessante, HB-802 demonstrou a capacidade de reduzir IL6 em células em repouso (refere-se ao Exemplo 3, Tabela 4).

Todas as composições ou métodos divulgados e reivindicados aqui podem ser feitos e realizados sem experimentação imprópria à luz da divulgação presente. Enquanto as composições e métodos desta invenção foram descritos em termos de modalidades preferidas, será aparente aos de habilidade na técnica que as variações podem ser aplicadas às composições e/ou métodos e nas etapas ou na sequência de etapas dos métodos descritos aqui sem sair do conceito e escopo da invenção. Mais especificamente, será aparente que determinados agentes que são quimicamente e fisiologicamente relativos podem ser substituídos pelos agentes descritos aqui enquanto o mesmo ou resultados similares seriam conseguidos. Todos tais substitutos e modificações similares aparentes aos hábeis na técnica são julgados estar dentro do escopo da invenção.

REFERÊNCIAS

Braff MH, Gallo RL (2006). Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 306:91-110.

Enoch S, Price P (2004). Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds*. Online: www.worldwidewounds.com.

Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* 138:1462-1470.

Kyte J, Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.

Lee PH, Rudisill JA, Lin KH, Zhang L, Harris SM, Falla TJ, Gallo RL (2004). HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropin B, accelerates murine wound repair. *Wound Repair Regen.* 12:351-358.

Liechty KW, Adzick NS, Crombleholme TM (2000). Diminished interleukin 6 (IL-6) production during scarless human fetal wound repair. *Cytokine*. 12:671-676.

Martin P, Leibovich SJ (2005). Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 15:599-607.

Mustoe TA, Cutler NR, Allman RM, Goode PS, Deuel TF, Prause JA, Bear M, Serdar CM, Pierce GF (1994). A phase II study to evaluate recombinant platelet-derived growth factor-BB in the treatment of stage 3 and 4 pressure ulcers. *Arch. Surg.* 129:213-219.

Oyama N, Sekimata M, Nihei Y, Iwatsuki K, Homma Y, Kaneko F (1998). Different growth properties in response to

epidermal growth factor and interleukin-6 of primary keratinocytes derived from normal and psoriatic lesional skin. *J. Dermatol. Sci*. 16:120- 128.

Pelicci PG (2004). Do tumor-suppressive mechanisms contribute to organism aging by inducing stem cell senescence? *J. Clin. Invest*. 113:4-7.

Presland RB, Dale BA (2000). Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*. 11 :383-408.

Sato S, Hasegawa M, Takehara K (2001). Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J. Dermatol. Sci*. 27:140-146.

Shaykhiev R, Beisswenger C, Kandler K, Senske J, Puchner A, Damm T, Behr J, BaIs R (2005). Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 289:L842-L848.

Steed DL (1995). Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer Study Group. *J. Vase. Surg*. 21 :71-78.

Sugawara T, Gallucci RM, Simeonova PP, Luster MI (2001). Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine*. 15:328-336.

Sweitzer SM, Fann SA, Borg TK, Baynes JW, Yost MJ (2006). What is the future of diabetic wound care? *Diabetes Educ*. 32:197-210.

Zhang L, Falla TJ (2006). Antimicrobial peptides: therapeutic potential. *Expert Opin. Pharmacother*. 7:653-663.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição **caracterizado** pelo fato de que compreende um peptídeo e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que a sequência do peptídeo é ID. de SEQ. N°: 2, ID. de SEQ. N°: 3, ID. de SEQ. N°: 5, ID. de SEQ. N°: 6, ID. de SEQ. N°: 7, ID. de SEQ. N°: 8, ID. de SEQ. N°: 9, ID. de SEQ. N°: 10, ID. de SEQ. N°: 11, ID. de SEQ. N°: 12 ou ID. de SEQ. N°: 15.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo compreende um dos ou ambos enantiômeros de aminoácidos L e D.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo é conjugado a uma molécula carreadora, amidada ou lipidada.

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é a ID. de SEQ. N°: 3.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é a ID. de SEQ. N°: 6.

6. Composição, de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é a ID. de SEQ. N°: 12.

7. Composição , de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é ID. de SEQ. N°: 2.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é ID. de SEQ. N°: 5.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de peptídeo é ID. de SEQ. N°: 7.

10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é ID. de SEQ. N°: 8.

11. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é ID. de SEQ. N°: 9.

12. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é ID. de SEQ. N°: 10.

13. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é ID. de SEQ. N°: 11.

14. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a sequência do peptídeo é ID. de SEQ. N°: 15.

15. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizada** pelo fato de que o peptídeo está presente em uma concentração variando de 0,22 µg/mL a 46,4 µg/mL.

16. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizada** pelo fato de que o peptídeo está presente em uma concentração variando de 0,22 µg/mL a 20 µg/mL.

17. Composição, de acordo qualquer uma das reivindicações 1 a 16, **caracterizada** pelo fato de que a composição está na forma de um aerossol, emulsão, líquido, loção, creme, pasta, pomada, pó ou espuma.

18. Composição, de acordo qualquer uma das

reivindicações 1 a 17, **caracterizada** pelo fato de que a composição é útil para curar uma ferida em um mamífero quando aplicada em uma quantidade terapeuticamente eficaz por uma quantidade eficaz de tempo.

19. Composição, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizada** pelo fato de que a ferida afeta a pele ou tecido mucoso associado do referido mamífero.

20. Composição, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, **caracterizada** pelo fato de que a ferida é devida a uma abrasão, bolha, queimadura, laceração, úlcera, contusão, prurido, cicatriz, ou aos efeitos de envelhecimento ou de exposição ambiental.

21. Composição, de acordo qualquer uma das reivindicações 18 a 20, **caracterizada** pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz da composição compreende o peptídeo em uma concentração variando de 0,22 µg/mL a te 46,4 µg/mL.

Fig. 1

SEQ ID NO	HB No.																			
1	107	M	P	K	E	K	V	F	L	K	I	E	K	M	G	R	N	I	R	N
2	1059											E	K	M	G	R	N	I	R	N
3	1061													M	G	R	N	I	R	N
4	1062														G	R	N	I	R	N
5	1071						V	F	L	K	I	E	K	M	G					
6	1072									K	I	E	K	M	G					
7	1074						V	F	L	K	I	E	K							
8	1076			K	E	K	V	F	L	K	I	E								
9	1057									K	I	E	K	M	G	R	N	I	R	N
10	912	M	P	K	E	K	V	F	L	K	I	E	K	M	G					
11	801	M	P	K	E	K	V													
12	802	M	P	K	E	K														
13	1056								L	K	I	E	K	M	G	R	N	I	R	N
14	1060												K	M	G	R	N	I	R	N
15	1410		P	K	E	K														

Fig. 2

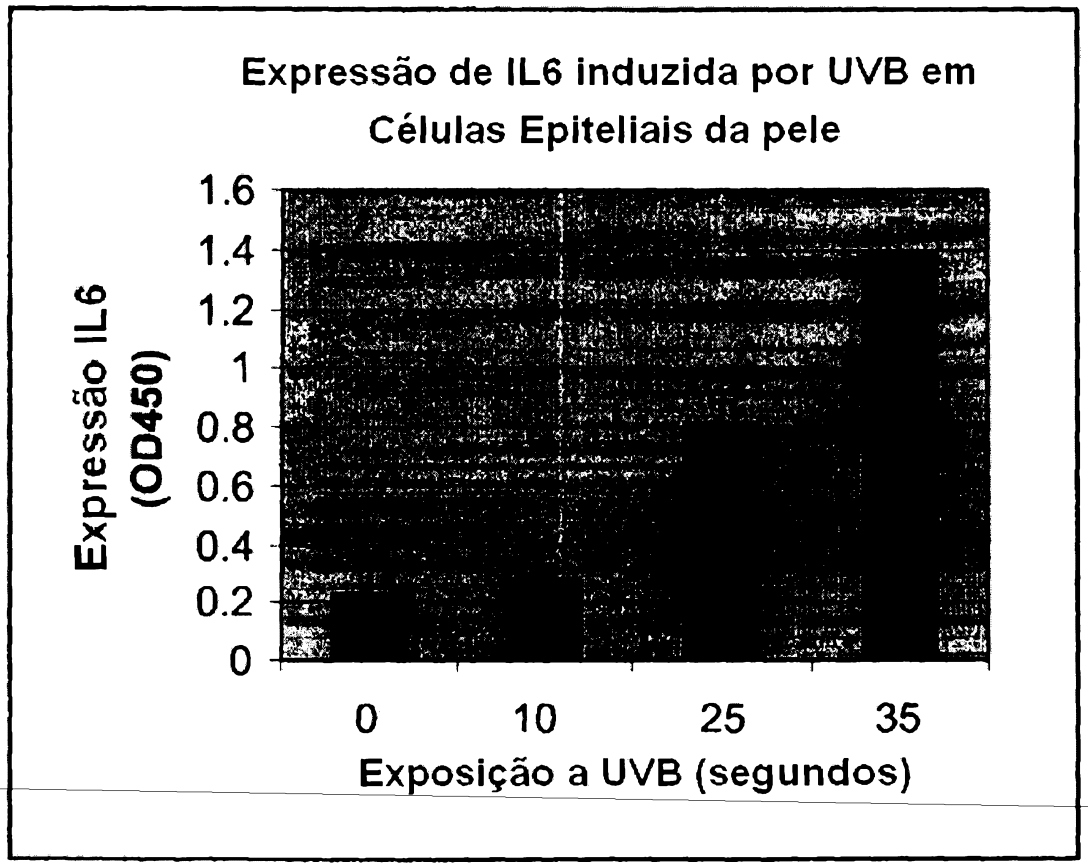
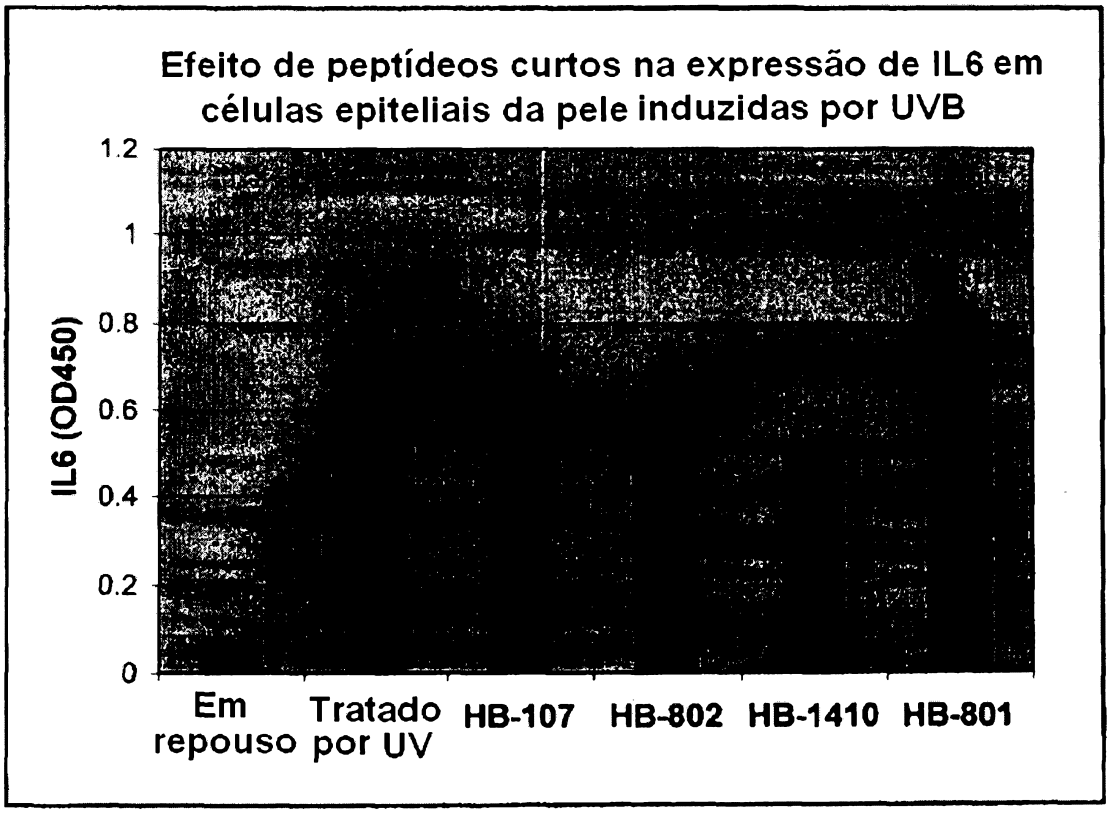

Expressão de IL6 induzida por UVB em
Células Epiteliais da pele
Expressão IL6
(OD450)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
10
25
35
Exposição a UVB (segundos)

Fig. 3


Efeito de peptídeos curtos na expressão de IL6 em células epiteliais da pele induzidas por UVB
IL6 (OD450)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Em repouso
Tratado por UV
HB-107
HB-802
HB-1410
HB-801