



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0713153-4 B1



* B R P I 0 7 1 3 1 5 3 B 1 *

(22) Data do Depósito: 12/06/2007

(45) Data de Concessão: 14/05/2019

(54) Título: TETRAPEPTÍDEO CAPAZ DE INDUZIR A PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E COMPOSIÇÃO O COMPREENDENDO

(51) Int.Cl.: C07K 14/78; C07K 5/10.

(30) Prioridade Unionista: 13/06/2006 US 60/813.284.

(73) Titular(es): HELIX BIOMEDIX INC..

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

(86) Pedido PCT: PCT US2007013748 de 12/06/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/146269 de 21/12/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/12/2008

(57) Resumo: FRAGMENTOS DE PEPTÍDEO PARA INDUZIR A SÍNTESE DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR. São revelados tetrapeptídeos biologicamente ativos curtos que são compreendidos das seqüências GxxG e PxxP, onde G (glicina) e P (prolina) são mantidas e x é um aminoácido variável. Os peptídeos podem ser usados individualmente ou em combinação para estimular a produção de proteínas da matriz extracelular na pele. É revelado um método rápido e barato de produção de formulações heterogêneas de tetrapeptídeos.

**TETRAPEPTÍDEO CAPAZ DE INDUZIR A PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS DA
MATRIZ EXTRACELULAR E COMPOSIÇÃO O COMPREENDENDO**

Esse pedido reivindica o benefício de prioridade ao Pedido Provisório Americano No. de Série 60/813.284, depositado em 13 de junho de 2006, o qual é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção se refere aos tetrapeptídeos com a porção aminoácido GxxG ou PxxP, onde G (glicina) e P (prolina) são mantidos e x é um aminoácido variável. A invenção também se refere aos tetrapeptídeos de mudança de quadro ativos (**frame shift**), os quais são seqüências de tetrapeptídeos com uma estrutura alterada de um tetrapeptídeo GxG ou PxxP numa proteína ECM. Particularmente, a invenção se refere ao GxxG, PxxP ou aos peptídeos de mudança de quadro ativos que estimulam a produção de proteínas da matriz extracelular e intensificam o fechamento de ferimentos da monocamada de células epiteliais da pele humana ferida por raspagem. As composições peptídicas podem ser usadas em formulações para reparar a pele danificada ou na manutenção da pele saudável.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O envelhecimento da pele é comumente visto como a formação de rugas e a cicatrização de ferimentos prejudicada. Um ferimento é definido como uma ruptura na integridade epitelial da pele. A cicatrização normal de feridas envolve uma série de eventos complexa e dinâmica, porém magnificamente orquestrada levando ao reparo de tecidos danificados. O maior componente da pele normal é a matriz extracelular (ECM), uma matriz tipo gel produzida

pelas células que ela rodeia. A ECM é composta de duas classes principais, incluindo proteínas estruturais fibrosas e proteoglicanas. Alterações na composição e estado reticulado da ECM são conhecidas como estando associadas com o envelhecimento e numa faixa de distúrbios de pele adquiridos e hereditários. Tem sido bem documentado que ECM não somente fornece suporte estrutural como também influencia o comportamento celular, tal como a diferenciação e proliferação. Também cada vez mais grupos de pesquisa sugerem que os componentes da matriz podem ser uma fonte de sinais celulares para facilitar a proliferação de células epiteliais e a migração e, deste modo, aumentar a cicatrização de feridas.

A maior classe de moléculas ECM fibrosas é a família do colágeno, a qual inclui pelo menos 16 tipos diferentes de colágeno. Colágeno na matriz dérmica é composto primariamente dos colágenos tipo I (80 - 85%) e tipo III (8 - 11%), ambos sendo fibrilares, ou colágenos em forma de bastão. A força elástica da pele é originada predominantemente por essas moléculas de colágeno fibrilares, as quais se automontam em microfibrilas numa disposição cabeça-cauda e lateral lado a lado escalonada. Moléculas de colágeno se tornam reticuladas às moléculas de colágeno adjacentes, gerando força e estabilidade adicional nas fibras de colágeno. O dano à rede de colágeno (por exemplo, por enzimas ou destruição física) ou o seu total colapso faz com que a cicatrização ocorra por reparo.

Vários peptídeos bioativos que estimulam a produção de proteínas ECM foram reportados tanto na literatura científica quanto em patentes emitidas. Historicamente,

peptídeos têm sido isolados a partir de fontes naturais e têm sido recentemente o assunto de estudos de relação estrutura-função. Peptídeos naturais também serviram como pontos de partida para o design de análogos de peptídeos sintéticos.

Seqüências específicas nas proteínas ECM podem estimular elementos úteis na pele, tais como colágeno tipo I, colágeno tipo III e fibronectina (Katayama et. al., J. Biol. Chem. 288: 9941 - 9944 (1983)). Katayama et al. identificaram o pentapeptídeo KTTKS (SEQ ID NO: 17), no propeptídeo carboxiterminal (resíduos 197 - 241) do colágeno tipo I. O propeptídeo é clivado durante a produção da proteína de colágeno madura. O propeptídeo clivado pode participar na regulação da produção de colágeno através de um mecanismo de retroalimentação de biossíntese, com o segmento KTTKS desempenhando um papel ativo. Maquart et al. (J Soc Biol. 193: 423-28 (1999)) reportaram que os peptídeos GHK e CNYYSNS também estimulam a síntese de ECM. Essas seqüências podem ser liberadas durante a renovação de ECM, deste modo sinalizando a necessidade por reparo de ECM. As seqüências de peptídeos curtos liberadas por qualquer mecanismo são geralmente chamadas de "matricinas" (Maquart et al., J. Soc. Biol. 193: 423-28 (1999)).

Apesar da existência de uma variedade de peptídeos naturais e sintéticos, existe uma necessidade por peptídeos biologicamente ativos melhorados e métodos para seus usos.

RESUMO DA INVENÇÃO

São revelados tetrapeptídeos que são caracterizados pela porção da seqüência de aminoácidos GxxG ou PxxP, onde os resíduos de G (glicina) e P (prolina) são mantidos e x é

um aminoácido variável. Os tetrapeptídeos são derivados das seqüências que ocorrem várias vezes por toda a seqüência primária da proteína ECM, colágeno tipo IV. As seqüências reveladas induzem a produção de todas as formas de colágeno maior do que as seqüências de peptídeos anteriormente conhecidas, incluindo KTKKS, vendida sob a marca comercial MATRIXYL™ por SEDERMA SAS (França). Além disso, uma composição compreendendo uma combinação de várias seqüências multiplicadoras-repetentes induz uma resposta produtora de colágeno ainda maior. Podem ser esperados benefícios adicionais a partir das combinações de peptídeos presentes numa variedade de proteínas ECM.

A produção de uma combinação específica de tetrapeptídeos para a reconstrução da ECM pode ser, sob um ponto de vista de custo, comercialmente proibitiva. É revelada uma forma relativamente simples e barata de produzir uma combinação diversa de tetrapeptídeos biologicamente ativos. Pela produção de uma biblioteca combinatorial de tetrapeptídeos com a porção GxxG ou PxxP, uma variedade de tetrapeptídeos biologicamente ativos pode ser gerada na mesma série de produção (por exemplo, GEPG, GPEG, GPPG e GEEG). A combinação dos tetrapeptídeos pode induzir uma maior formação de proteínas ECM do que os peptídeos individuais. As composições compreendendo os tetrapeptídeos revelados, sozinhas ou em combinação, são úteis nos mercados de cuidados com a pele incluindo, porém sem se limitar, àquelas que tratam de rugas, tônus, firmeza e perda de firmeza da pele. A estimulação do colágeno pelos tetrapeptídeos revelados pode melhorar significativamente a saúde e aparência da pele danificada e envelhecida.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1 é a SEQ ID NO: 45, a qual é a seqüência de aminoácidos do colágeno IV ilustrando as ocorrências dos tetrapeptídeos GxxG. Todas as seqüências em negrito estão sublinhadas e as seqüências que se sobrepõem estão duplamente sublinhadas.

FIG. 2 é a SEQ ID NO: 46, a qual é a seqüência de aminoácidos do colágeno III ilustrando as ocorrências das mudanças de quadro ativas PGPR e GAGP. Todas as seqüências de mudança de quadro ativas estão em negrito e sublinhadas e as seqüências GxxG que ocorrem numa distância de uma mudança de quadro estão duplamente sublinhadas.

FIG. 3 também é a SEQ ID NO: 45, a seqüência de aminoácidos de colágeno IV, ilustrando as ocorrências do tetrapeptídeo PGPP.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção é de um modo geral direcionada para tetrapeptídeos que estimulam a produção de proteínas ECM e modulam a cicatrização de feridas, e aos usos de tais tetrapeptídeos.

Peptídeos

Uma modalidade da invenção é direcionada para um tetrapeptídeo isolado compreendendo a porção GxxG ou PxxP. Nessa modalidade, G (glicina) ou P (prolina) é mantida e x é um aminoácido variável. O peptídeo pode ser geralmente qualquer peptídeo que esteja dentro da descrição acima, e mais preferivelmente ser SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 16.

Outra modalidade da invenção é direcionada para um tetrapeptídeo isolado compreendendo a porção GxPG, onde x é P em qualquer posição variável ou ambas. Nessa modalidade, G (glicina) e P (prolina) são mantidas e x é um aminoácido variável. O peptídeo pode ser geralmente qualquer peptídeo que esteja dentro da descrição acima, e mais preferivelmente é a SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 7.

Outra modalidade da invenção é direcionada para um tetrapeptídeo isolado compreendendo a porção GExG. Nessa modalidade, G (glicina) e E (ácido glutâmico) são mantidos e x é um aminoácido variável. O peptídeo pode ser geralmente qualquer peptídeo que esteja dentro da descrição acima, e mais preferivelmente ser SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 8.

Outra modalidade da invenção é direcionada para um tetrapeptídeo isolado compreendendo a porção PGxP. Nessa modalidade, P (prolina) e G (glicina) são mantidas e x é um aminoácido variável. O peptídeo pode ser geralmente qualquer peptídeo que esteja dentro da descrição acima, e mais preferivelmente SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 ou SEQ ID NO: 16.

Outra modalidade da invenção é direcionada para um tetrapeptídeo isolado compreendendo a porção PExP. Nessa modalidade, P (prolina) e E (ácido glutâmico) são mantidos e x é um aminoácido variável. O peptídeo pode ser geralmente qualquer peptídeo que esteja dentro da descrição acima, e mais preferivelmente ser SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO: 9.

Outra modalidade da invenção é direcionada para um

tetrapeptídeo de mudança de quadro ativo. Nessa modalidade, o tetrapeptídeo ocorre numa mudança de quadro de um tetrapeptídeo GxxG ou PxxP numa proteína ECM. O peptídeo pode ser de um modo geral qualquer peptídeo que esteja dentro da descrição acima, e mais preferivelmente ser SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 6.

Cada um dos peptídeos acima descritos podem compreender D- ou L-aminoácidos. Os peptídeos podem compreender todos os D-aminoácidos ou L-aminoácidos. Os peptídeos podem ter um ácido C-terminal (-CO₂H) ou, preferivelmente, uma amida C-terminal (-CONH₂, -CONHR ou -CONR₂). Os peptídeos podem ser ainda aumentados ou modificados, seja quimicamente ou enzimaticamente. Por exemplo, os peptídeos podem ser amidados (-NH₂) no C-terminal, o que pode tornar o tetrapeptídeo menos suscetível à degradação pela protease e aumentar as suas solubilidades em comparação com as formas de ácido livre. Os peptídeos também podem ser "lipidados", o que pode proporcionar uma maior penetração na pele.

Os peptídeos acima descritos podem conter os seguintes aminoácidos: R (arginina), L (leucina), P (prolina), F (fenilalanina), Q (glutamina), E (ácido glutâmico), I (isoleucina), K (lisina), S (serina), V (valina), A (alanina), N (asparagina), D (ácido aspártico), T (treonina), Y (tirosina) e G (glicina). Os peptídeos acima descritos não incluem os seguintes: M (metionina), C (cisteína), H (histidina) ou W (triptofano). Concordantemente, numa modalidade, x não é selecionado de (metionina), C (cisteína), H (histidina) ou W (triptofano).

30 Métodos de uso

Uma modalidade adicional da invenção é direcionada para os métodos de uso dos peptídeos acima descritos. Os métodos de uso podem envolver o uso de um único peptídeo, ou podem envolver o uso de dois ou mais peptídeos em
5 combinação.

Uma modalidade da invenção é um método de promoção de reparo da pele danificada e de manutenção da saúde da pele usando tetrapeptídeos que estimulam a produção de proteínas ECM. O método é geralmente direcionado para o contato das
10 células da derme (pele) com uma composição contendo o peptídeo. As composições podem ser um aerossol, emulsão, líquido, loção, creme, pasta, unguento, espuma ou outra formulação farmacologicamente aceitável. Geralmente, uma formulação farmacologicamente aceitável poderia incluir
15 qualquer veículo aceitável adequado para uso na pele humana, por exemplo, um veículo cosmeticamente aceitável e um veículo dermatologicamente aceitável. As composições podem conter outros agentes biologicamente ativos, tais como retinóides ou outros peptídeos. As composições podem
20 conter veículos ou adjuvantes farmacologicamente aceitáveis. O passo de contato pode ser efetuado *in vivo*, *in situ*, *in vitro* ou por qualquer método conhecido pelas pessoas versadas na técnica. Mais preferivelmente, o passo de contato é para ser efetuado topicamente numa concentração
25 suficiente para induzir uma resposta estimulatória. A concentração do peptídeo na composição pode ser de cerca de 0,01 µg/mL até cerca de 100 µg/mL, de cerca de 0,1 µg/mL até cerca de 50 µg/mL e de cerca de 0,1 µg/mL até cerca de 1 µg/mL. O passo de contato pode ser efetuado num mamífero,
30 num gato, num cachorro, numa vaca, num cavalo, num porco ou

num ser humano. Uma composição preferida para promover a produção da proteína ECM compreende a SEQ ID NO: 8; mais preferivelmente, a composição compreende SEQ ID NO: 8 numa mistura heterogênea com pelo menos um outro tetrapeptídeo.

5 Numa modalidade mais preferida, os tetrapeptídeos individuais na composição poderiam causar a produção de colágeno sustentada por um período de pelo menos 48 horas.

Uma modalidade adicional da invenção é direcionada para um método de promoção da cicatrização de feridas da pele danificada pelo envelhecimento normal, doenças, 10 injúria, trauma ou por cirurgia ou outros procedimentos médicos. O método pode compreender a administração à ferida de um animal de uma composição, em que a composição compreende qualquer um dos peptídeos acima descritos, 15 individualmente ou em combinação. As composições podem ser um líquido, loção, creme, pasta, unguento, espuma ou qualquer outra formulação farmacologicamente aceitável. As composições podem conter veículos ou adjuvantes farmacologicamente aceitáveis. As composições podem conter 20 outros agentes biologicamente ativos, tais como agentes antimicrobianos ou fatores de crescimento. As composições podem também ser usadas em combinação com outros agentes terapêuticos, tais como enxertos de tecido, produtos de cultura de tecido, oxigênio ou curativos. A concentração do 25 peptídeo na composição pode ser de cerca de 0,01 µg/mL até cerca de 100 µg/mL, de cerca de 0,1 µg/mL até cerca de 50 µg/mL e de cerca de 0,1 µg/mL até cerca de 1 µg/mL. A composição pode ser administrada ao ferimento topicamente. O animal pode, de um modo geral, ser geralmente qualquer 30 tipo de animal, e preferivelmente é um mamífero, e mais

preferivelmente é um ser humano, vaca, cavalo, gato, cachorro, porco, cabra ou ovelha. Uma composição preferida para aplicações de cicatrização de feridas nas quais a produção de proteína ECM é promovida compreende a SEQ ID
5 NO: 8; mais preferivelmente a composição compreende SEQ ID NO: 8 numa mistura heterogênea com pelo menos um outro tetrapeptídeo. Numa modalidade mais preferida, os tetrapeptídeos individuais na composição poderiam causar a produção de colágeno sustentada por um período de pelo
10 menos 48 horas.

Uma modalidade adicional da invenção é direcionada para um método de redução da cicatriz da pele danificada pelo envelhecimento normal, doença, injúria, trauma ou por cirurgia ou outros procedimentos médicos. O método pode
15 compreender a administração à ferida de um animal de uma composição, em que a composição compreende qualquer um dos peptídeos acima descritos, individualmente ou em combinação. As composições podem ser um líquido, loção, creme, pasta, unguento, espuma ou outra formulação
20 farmacologicamente aceitável. As composições podem conter veículos ou adjuvantes farmacologicamente aceitáveis. As composições podem conter outros agentes biologicamente ativos, tais como agentes antimicrobianos ou fatores de crescimento. As composições podem também ser usadas em
25 combinação com outros agentes terapêuticos, tais como enxertos de tecido, produtos de cultura de tecido, oxigênio ou curativos. A concentração do peptídeo na composição pode ser de cerca de 0,01 µg/mL até cerca de 100 µg/mL, de cerca de 0,1 µg/mL até cerca de 50 µg/mL e de cerca de 0,1 µg/mL
30 até cerca de 1 µg/mL. A composição pode ser administrada ao

ferimento topicamente. O animal pode ser geralmente qualquer tipo de animal, e preferivelmente é um mamífero, e mais preferivelmente é um ser humano, vaca, cavalo, gato, cachorro, porco, cabra ou ovelha. Uma composição preferida para aplicações de cicatrização de feridas nas quais a produção de proteína ECM é promovida compreende a SEQ ID NO: 8; mais preferivelmente a composição compreende SEQ ID NO: 8 numa mistura heterogênea com pelo menos um outro tetrapeptídeo. Numa modalidade mais preferida, os tetrapeptídeos individuais na composição poderiam causar a produção de colágeno sustentada por um período de pelo menos 48 horas.

Outra modalidade da invenção é direcionada para um método de produção dos tetrapeptídeos revelados em combinação. Os peptídeos podem ser produzidos usando qualquer método conhecido pelas pessoas versadas na técnica, tais como aqueles revelados em Merrifield, R. B., *Solid Phase Peptide Synthesis I.*, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963); Carpino, L. A. et al., [(9-Fluorenylmethyl)oxy] Carbonyl (Fmoc) Amino Acid Chlorides: *Synthesis, Characterization, And Application To The Rapid Synthesis Of Short Peptides*, J. Org. Chem. 37:51:3732-3734; Merrifield, R. B. et al., *Instrument For Automated Synthesis Of Peptides*, Anal. Chem. 38: 1905-1914 (1966); ou Kent, S. B. H. et al., *High Yield Chemical Synthesis Of Biologically Active Peptides On An Automated Peptide Synthesizer Of Novel Design*, em: PEPTIDES 1984 (Ragnarsson U., ed.) Almqvist e Wiksell Int., Estocolmo (Suécia), pp. 185-188, todos os quais são aqui incorporados por referência nas suas totalidades. Preferivelmente, os

peptídeos serão produzidos por uma máquina capaz de efetuar a adição seqüencial dos aminoácidos numa cadeia peptídica em crescimento. Entretanto, os peptídeos também podem ser produzidos usando a metodologia da fase de solução padrão.

5 Tem sido observado que a adição de uma mistura de aminoácidos livres, ao invés de misturas de peptídeos homogêneas durante a síntese da cadeia peptídica, resulta na incorporação variada de aminoácidos livres, de modo que uma combinação de peptídeos resulta das reações de síntese.

10 A frequência de incorporação relativa de um aminoácido particular incluído numa mistura de dois ou mais aminoácidos adicionados durante a síntese pode ser ajustada. O ajuste é tornado possível pela modificação da proporção de um aminoácido livre disponibilizado durante o

15 processo de síntese em relação aos outros aminoácidos na mistura (isso é chamado de uma mistura isocinética).

Os Exemplos a seguir são incluídos para demonstrar modalidades preferidas da invenção. Deve ser percebido pelas pessoas versadas na técnica que as técnicas reveladas

20 nos exemplos que se seguem representam técnicas descobertas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção, e deste modo podem ser consideradas como constituintes de modos preferidos para a sua prática. Entretanto, as pessoas versadas na técnica deveriam, à luz da presente descoberta,

25 perceber que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas, as quais são reveladas e ainda obter um resultado semelhante ou similar sem sair do espírito e escopo da invenção.

EXEMPLOS

30 Exemplo 1: Identificação de repetições de seqüências

tetrapeptídicas no colágeno

Uma proporção relativamente alta de seqüências de repetição do tetrapeptídeo de colágeno IV tem a porção GxxG (onde x é qualquer aminoácido). Uma variedade dessas é mostrada *in situ* como parte da seqüência de colágeno IV completa ilustrada na Figura 1 como SEQ ID NO: 45. Colágeno IV foi examinado primeiramente devido ao seu papel de interação com outros componentes ECM especializados (ver Gregory Schultz et al., 2005). Existem onze seqüências com a porção GxxG no colágeno IV que aparecem mais de dez vezes (GxxG, onde xx é representado por: vp, ek, fp, lp, pp, sp, ep, ip, pk, qp e tp). Dessas seqüências de tetrapeptídeos, oito das onze seqüências contêm prolina na posição 3, duas das onze seqüências contêm P na posição 2, uma das onze seqüências contêm prolina nas posições 2 e 3, e uma das onze seqüências não contêm prolina. As seqüências reveladas são referidas como REPLIKINES™. "REPLIKINE" é definido como uma seqüência curta nas proteínas ECM que ocorre várias vezes (isto é, é replicada). Essa seqüência pode estar presente numa proteína ECM (por exemplo, colágeno IV). Preferivelmente, a seqüência está presente em múltiplas proteínas ECM (por exemplo, todos os colágenos, elastina, laminina, etc.). A presença da seqüência em várias proteínas ECM aumenta a probabilidade de que o fragmento possa ser capaz de promover a síntese ou reparo de ECM.

As onze seqüências GxxG aparecendo no colágeno IV listadas acima são destacadas na seqüência do colágeno IV humano ilustrada na Figura 1. Nessa figura, todas as seqüências em negrito estão sublinhadas e as seqüências que se sobrepõem estão duplamente sublinhadas. Todas, à exceção

de uma dessas seqüências, também aparecem nos colágenos I, II, III e IV. Esse fato contribui para a capacidade dos peptídeos revelados de estimular a produção de todos os tipos de colágeno, particularmente quando os peptídeos são usados em combinação. Tabela 1 mostra a freqüência de várias repetições de tetrapeptídeo nas proteínas ECM. As seqüências em negrito na Tabela 1 são aquelas que aparecem no colágeno IV dez ou mais vezes.

Tabela 1: Freqüência dos tetrapeptídeos nas proteínas

10 **ECM**

SEQ ID NO:	Seqüência	Colágeno I	Colágeno II	Colágeno III	Colágeno IV	Colágeno V	Elastina	Precursor da elastina
19	GAAG	10	5	7		2	4	5
20	GAKG	3	4	3	5	5		
21	GAPG	13	21	25	6	9		
22	GDKG	2	2	4	9	3		
23	GDRG	2	5	2	4	1		
8	GEKG	3	5	4	22	15		
5	GEPG	11	15	10	11	4		
24	GERG	10	11	14	6	7		
2	GFPG	4	8	6	22	5	1	1
25	GIPG	2	2	6	14	6	5	5
26	GKDG	1	4	5	2	2		
27	GKPG	2	3	3	4	1		
28	GLKG	2	1	1	5	4		
29	GLPG	15	10	9	42	15	1	1
30	GNPG	3	5	3	2	1		

31	GPAG	16	20	20	3	6		
32	GPKG	3	11	4	12	9		
7	GPPG	33	40	40	46	43		
33	GPQG	7	11	9	7	5		
34	GPRG	11	13	10	4	7		
35	GPSG	10	11	5	1	5		
36	GPTG	4	3	2	2	6		
37	GPVG	9	3	3	2	5		
38	GQPG	3	4	6	12	7		
39	GRDG	4	2	3	3			
40	GRPG	3	3	4	2	5		
3	GSPG	4	6	21	16	3		
41	GTPG	3	4	2	11	2		
42	GVKG	1	3	2	3	1		
43	GVPG		1	3	10	1	14	15
44	GYPG	1	1	1	4	2		

Conforme é evidente a partir de uma revisão da seqüência de colágeno IV, SEQ ID NO: 45, também há muitas ocorrências das seqüências com a porção PxxP. Por exemplo, a seqüência PGPP ocorre não menos do que quinze vezes
5 conforme ilustrado na Figura 3. Conseqüentemente, essa seqüência revelada também é referida como REPLIKINE™. Preferivelmente, essa seqüência está presente em várias proteínas ECM (por exemplo, em todos os colágenos, elastina, laminina, etc.) uma vez que a presença dessa
10 seqüência em várias proteínas ECM aumenta a probabilidade de que o fragmento possa ser capaz de promover a síntese ou reparo de ECM. As quinze seqüências PGPP aparecendo no colágeno IV listadas acima estão destacadas e sublinhadas na seqüência do colágeno IV humano ilustrada na Figura 3.

Exemplo 2: Identificação das mudanças de quadro ativas

Além da proporção relativamente alta das seqüências de repetições de tetrapeptídeo de colágeno IV com a porção GxxG, outras seqüências de tetrapeptídeos ocorrendo numa mudança de quadro de aminoácido de distância de uma seqüência de tetrapeptídeo GxxG ou PxxP foram identificadas. Essas seqüências podem se repetir ou ocorrer somente uma vez numa proteína ECM, e podem estar localizadas numa posição de aminoácido de distância de uma seqüência de tetrapeptídeo GxxG ou PxxP, conforme aqui descrito. Essas seqüências de tetrapeptídeos são referidas como mudanças de quadro ativas. Tais mudanças de quadro ativas podem, concordantemente, conter qualquer um dentre G ou P em qualquer uma dentre a segunda ou terceira posição dependendo da direção da mudança de quadro. Foi ainda reconhecido que as mudanças de quadro ativas podem ser combinadas com outras seqüências de tetrapeptídeo reveladas nesse pedido, formando uma combicina. Um exemplo de tal combicina é H06 e H15.

Um exemplo de uma mudança de quadro ativa é GAGP ou H12 (SEQ ID NO: 6). H12 (GAGP) aparece um resíduo (ou estrutura) modificado do tetrapeptídeo GxxG GGAG no colágeno III (SEQ ID NO: 46) conforme ilustrado na Figura 2. Nessa figura, todas as seqüências de mudança de quadro ativas estão em negrito e sublinhadas e as seqüências GxxG ocorrendo a uma mudança de quadro de distância estão duplamente sublinhadas. Além disso, conforme mostrado na Tabela 5, esse tetrapeptídeo (GAGP) alcança bons resultados para a produção de colágeno em 48 horas. Outro exemplo é a seqüência PGPR, a qual é H10 (SEQ ID NO: 4), a qual ocorre

onze vezes nos colágenos I - IV. Uma vez que ela aparece várias vezes numa proteína ECM individual, esse tetrapeptídeo poderia ainda ser considerado uma REPLIKINE. Figura 2 (SEQ ID NO: 46) ilustra vários exemplos desse tetrapeptídeo com cada um ocorrendo uma mudança de quadro do tetrapeptídeo GxxG GPRG. Essa mudança de quadro ativa particular aparece em várias proteínas ECM e, deste modo, aumenta a probabilidade de que o fragmento possa ser capaz de promover a síntese ou reparo de ECM.

10 Exemplo 3: Identificação de seqüências repetidas que estimulam a produção de colágeno

Várias seqüências identificadas nos Exemplos 1 e 2 foram sintetizadas usando química peptídica padrão e avaliadas quanto à estimulação de colágeno a partir de fibroblastos dérmicos. Os peptídeos sintetizados foram amidados no C-terminal, o que tornou os tetrapeptídeos menos suscetíveis à degradação pela protease e aumentou as suas solubilidades em comparação com as formas de ácido livre. Fibroblastos dérmicos humanos foram incubados em placas de 96 poços a 37 °C e CO₂ 5% por 24 e 48 horas em 150 µL de meio de cultura de células completo (Cascade Biologics, Portland, OR; No. Cat. M-106-500), suplementado com Suplemento de Crescimento com Pouco Soro (Cascade Biologics, Portland, OR; No. Cat. S-003-10) contendo peptídeos de amostra numa concentração de peptídeo final de 50 µg/mL. Cada poço foi semeado com 10.000 células. Após a incubação, amostras de 100 µL de meio foram recuperadas de cada poço e avaliadas quanto à produção de colágeno.

Os ensaios foram efetuados pelos laboratórios Tebu-bio (França) usando o Kit de Ensaio de Colágeno SIRCOL™

(Biocolor Assays, Reino Unido) seguindo o protocolo do fabricante. O Ensaio de Colágeno SIRCOL™ é um método de ligação a corante quantitativo projetado para a análise de colágenos solúveis liberados em meio de cultura por células
5 de mamíferos durante a cultura *in vitro*. O colágeno das amostras testadas se liga ao corante SIRCOL™ aniônico. Os complexos colágeno-corante precipitam para fora da solução e são peletizados por centrifugação. O pélete de colágeno-corante recuperado foi dissolvido numa solução alcalina
10 antes das medições de absorvância. Medições em duplicata foram tomadas nos tempos de 24 e 48 horas a partir de duas amostras separadas. Foi feita uma média com as quatro medições para cada amostra. As absorvâncias dos brancos com reagente, padrões de colágeno e amostras foram medidas a
15 560 nm. A absorvância do branco do reagente foi subtraída a partir da absorvância de cada amostra em 24 e 48 horas.

Dois grupos de dados separados foram usados para gerar duas curvas de calibração de padrões de colágeno. A primeira curva de calibração foi gerada para propósitos do
20 cálculo da quantidade de colágeno nas amostras H6 (combinação das SEQ ID NOS: 1 - 4), H7-H14 (SEQ ID NOS: 1 - 8, respectivamente) e H15 (combinação das SEQ ID NOS: 5 - 8). A segunda curva de calibração foi gerada para calcular a quantidade de colágeno nas amostras H16 (SEQ ID NO: 9),
25 H21-23 (SEQ ID NOS: 10 - 12, respectivamente), H25-26 (SEQ ID NOS: 13-14, respectivamente) ou H29-30 (SEQ ID NOS: 15 - 16, respectivamente), H32 (SEQ ID NQ: 17), H33 (combinação das SEQ ID NOS: 9-12), H34 (combinação das SEQ ID NOS: 11 - 14), H35 (combinação das SEQ ID NOS: 13-16), H36
30 (combinação das SEQ ID NOS: 1, 6, 5, 8), H37 (SEQ ID NO:

17) e H38 (SEQ ID NO: 8) a partir das medições de absorvância e foi criada pela demarcação da $Abs_{560\text{ nm}}$ dos padrões de colágeno conhecidos *versus* as concentrações respectivas dos padrões de colágeno (em microgramas) cada vez que uma série de ensaios foi efetuada. Em relação a cada grupo de dados, a mesma curva de calibração foi usada para as amostras tomadas nos tempos de 24 e 48 horas (Tabelas 2A e 2B). Concordantemente, diferentes curvas de padrões foram preparadas imediatamente antes de efetuar cada série de ensaios.

Tabela 2A: Curva de calibração para avaliar a produção de colágeno pelos peptídeos HA-H15

Padrões de colágeno (μg)	$A_{560\text{ nm}}$ Teste de 24h	$A_{560\text{ nm}}$ Teste de 48h
0	0,00	0,00
5	0,08	0,10
10	0,11	0,15
25	0,32	0,35
50	0,66	0,65

Tabela 2B: Curva de calibração para ensaiar a produção de colágeno pelos peptídeos H16, H21-23, H25-26 e H29-38.

Padrões de colágeno (μg)	Data de ensaio 1 $A_{560\text{ nm}}$	Data de ensaio 2 $A_{560\text{ nm}}$
0	0,00	0,00
5	0,12	0,09
10	0,14	0,15
25	0,48	0,42
50	0,88	0,80

Foi efetuada uma regressão linear a partir da demarcação dos valores de $Abs_{560\text{ nm}}$ *versus* as concentrações

dos respectivos padrões de colágeno usando MICROSOFT EXCEL™. A regressão resultou nas linhas descritas pela fórmula $y = 0,013x$ para ambos os tempos de incubação verificados na Tabela 2A. Uma vez que os resultados foram
5 idênticos, somente o período de tempo de 24 horas foi usado para a segunda série de curvas de calibração. A fórmula da linha obtida na data de ensaio 1 e na data de ensaio 2 da segunda série de amostras foi $y = 0,0178x$ e $y = 0,0162x$, respectivamente. O peptídeo LL-37 (SEQ ID NO: 18) foi usado
10 como controle positivo, uma vez que ele foi amplamente reportado como tendo um impacto na cura de ferimentos em homens (Heilborn et al., The Cathelicidin Anti-Microbial Peptide LL-37 Is Involved In The Re-Epithelialization Of Human Skin Wounds And Is Lacking In Chronic Ulcer
15 Epithelium, *J. Invest. Dermato.* 120: 379-89 (2003)). O limite de detecção do ensaio definido pelo fabricante é de 2,5 µg.

A quantidade total de colágeno produzida nas amostras contendo peptídeos foi calculada a partir da média dos
20 valores de absorvância tomados em 24 horas (Tabela 3A) e 48 horas (Tabela 3B) usando a equação linear derivada da curva padrão. A quantidade total de colágeno produzido nas amostras contendo os peptídeos H16 (SEQ ID NO: 9), H21-23 (SEQ ID NOs: 10 - 12, respectivamente), H25-26 (SEQ ID NOs:
25 13-14, respectivamente) ou H29-30 (SEQ ID NOs: 15 - 16, respectivamente), H32 (SEQ ID NO: 17), H33 (combinação das SEQ ID NOs: 9-12), H34 (combinação das SEQ ID NOs: 11 - 14), H35 (combinação das SEQ ID NOs: 13-16), H36 (combinação das SEQ ID NOs: 1, 6, 5, 8), H37 (SEQ ID NO:
30 17) e H38 (SEQ ID NO: 8) foi calculada a partir dos valores

de absorvância tomados em 24 horas (Tabela 4A) e 48 horas (Tabela 4B) usando a equação linear derivada da curva padrão. Esses valores foram comparados com o peptídeo LL37 (SEQ ID NO: 18), um peptídeo conhecido por estimular o colágeno. Em cada tabela, as amostras marcadas por um asterisco (*) podem não ser significativas, uma vez que o limite de detecção do ensaio é de 2,5 µg.

Tabela 3A: Medições de absorvância e quantificação do colágeno nas amostras de teste H6-H15 em 24 horas.

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

10

Tabela 3B: Medições de absorvância e quantificação do colágeno nas amostras de teste H6-H15 em 48 horas.

SEQ ID NO:	Peptide os	A _{560 nm}		Média	Média menos branco	Colágeno (µg)
18	LL37	0,262	0,113	0,19	0,07	5,2

-	H6	0,086	0,189	0,14	0,02	1,3*
1	H7	0,192	0,189	0,19	0,07	5,4
2	H8	0,137	0,126	0,13	0,01	0,9*
3	H9	0,117	0,061	0,09	0,00	0,0*
4	H10	0,136	0,085	0,11	0,00	0,0*
5	H11	0,113	0,181	0,15	0,03	2,1*
6	H12	0,106	0,231	0,17	0,05	3,7
7	H13	0,100	0,145	0,12	0,00	0,2*
8	H14	0,132	0,176	0,15	0,03	2,6
-	H15	0,177	0,174	0,18	0,06	4,3
-	Branco	0,120	0,115	0,12	0,00	0,0

Tabela 4A: Medições de absorvância e quantificação do colágeno em amostras de teste H16, H21-23, H25-26 ou H29-38 em 24 horas.

SEQ NO:	ID	Peptide os	A _{560 nm}	Média	Média menos branco	Colágeno (µg)
9	H16		0,133 0,137	0,14	0,06	3,1
10	H21		0,129 0,119	0,12	0,04	2,5
11	H22		0,192 0,085	0,14	0,06	3,3
12	H23		0,090 0,073	0,08	0,00	0,1*
13	H25		0,129 0,076	0,10	0,02	1,3*
14	H26		0,114 0,149	0,13	0,05	2,9
15	H29		0,111 0,063	0,09	0,01	0,4*
16	H30		0,099 0,092	0,10	0,02	0,9*
17	H32	(crista is e toxicid	0,087 0,055	0,07	-0,01	-0,5*

	ade celular)					
-	H33	0,086	0,125	0,11	0,03	1,4*
-	H34	0,117	0,120	0,12	0,04	2,2*
-	H35	0,103	0,090	0,10	0,02	0,9*
-	H36	0,105	0,128	0,12	0,04	2,1*
17	H37	0,099	0,100	0,10	0,02	1,1*
8	H38	0,103	0,159	0,13	0,05	2,9
-	Branco	0,072	0,086	0,08	0,00	0,0

Tabela 4B: Medições de absorvância e quantificação do colágeno em amostras de teste H16, H21-23, H25-26 ou H29-38 em 48 horas.

SEQ NO:	ID	Peptide os	A _{560 nm}	Média	Média menos branco	Colágen o (µg)	
9		H16	0,065	0,064	0,06	0,00	0,3*
10		H21	0,089	0,126	0,11	0,05	2,9
11		H22	0,102	0,087	0,09	0,03	2,1*
12		H23	0,093	0,082	0,09	0,03	1,7*
13		H25	0,059	0,084	0,07	0,01	0,7*
14		H26	0,081	0,153	0,12	0,06	3,5
15		H29	0,086	0,094	0,09	0,03	1,9*
16		H30	0,083	0,101	0,09	0,03	2,0*
17		H32 (cris talis e toxicid ade celular	0,088	0,072	0,08	0,02	1,2*

)					
-	H33	0,096	0,092	0,09	0,03	2,1*
-	H34	0,076	0,155	0,12	0,06	3,4
-	H35	0,120	0,074	0,10	0,04	2,3*
-	H36	0,154	0,082	0,12	0,06	3,6
17	H37	0,078	0,114	0,10	0,04	2,2*
8	H38	0,123	0,089	0,11	0,05	2,8
-	Branco	0,106	0,0106	0,06	0,00	0,0

Devido aos tamanhos das amostras serem de 100 μL , a concentração do colágeno produzido em cada amostra em microgramas por mililitro é determinada pela multiplicação da quantidade de colágeno detectada por dez. Os resultados de todas as amostras testadas estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5: Síntese de colágeno induzida por peptídeos.

SEQ NO	ID	Nome	Seqüência primária	[Peptídeo] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Colágeno produzido ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
					24 h	48 h
1		H07	PEGP	50	0	54
2		H08	GFPG	50	15	9
3		H09	GSPG	50	35	0
4		H10	PGPR	50	34	0
-		H06	H7, H8, H9, H10 (SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4)	50	25	13
5		H11	GEPPG	50	45	21
6		H12	GAGP	50	2	37

7	H13	GPPG	50	18	2
8	H14	GEKG	50	30	26
8	H38	GEKG	0,3	29	28
-	H15	H11, H12, H13, H14 (SEQ ID Nos: 5, 6, 7, 8)	50	25	43
9	H16	PEKP	50	31	3
10	H21	PKGP	50	25	29
11	H22	PGQP	50	33	21
12	H23	PGTP	50	1	17
13	H25	PMGP	50	13	7
14	H26	PGPP	50	29	35
15	H29	PQGP	50	4	19
16	H30	PGNP	50	9	20
17	H32	KTTKS (peptide o SEDERMA™)	50	Na	12
17	H37	KTTKS (peptide o SEDERMA™)	0,3	11	22
-	H33	H16, H21, H22, H23	50	14	21

		(SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 12)			
-	H34	H22, H23, H25, H26 (SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14)	50	22	34
-	H35	H25, H26, H29, H30 (SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16)	50	9	23
-	H36	H7, H12, H11, H14 (SEQ ID NOs: 1, 6, 5, 8)	50	21	36
18	LL37	LLGDFFRK SKEKIGKE FKRIVQRI DFLRNLVP RTES	50	30	52

Todos os tetrapeptídeos testados estimularam a produção de colágeno solúvel. Das seqüências testadas,

tetrapeptídeos GxxG com um ácido glutâmico na posição 2
melhor estimulam o colágeno em ambos os pontos de tempo de
24 e 48 horas. Essas seqüências são H11 (GEPG; SEQ ID NO:
5), H14 (GEKG; SEQ ID NO: 8) e H38 (GEKG; SEQ ID NO: 8). Os
5 peptídeos foram inicialmente varridos usando uma
concentração peptídica de 50 µg/mL. Para avaliar a
concentração eficaz para estimular a produção de colágeno,
H14 (SEQ ID NO: 8) também foi testada em 0,3 µg/mL como
H38. Conforme demonstrado na Tabela 5, a estimulação de
10 colágeno induzida por H38 não foi diminuída na concentração
mais baixa, indicando que a concentração estimulatória
máxima da SEQ ID NO: 8 está em ou abaixo de 0,3 µg/mL.

Para testar a sua eficácia, a SEQ ID NO: 8 (H14 e H38)
foi comparada com o peptídeo LL37 (SEQ ID NO: 18), o qual é
15 conhecido por estimular a produção de colágeno. Baseando-se
na quantidade de colágeno liberada por fibroblastos em
resposta ao LL37, 25 µg/mL foi considerada uma quantidade
significativa de colágeno liberada devido ao contato com um
tetrapeptídeo. SEQ ID NO: 8 induziu aproximadamente a mesma
20 quantidade de colágeno que LL37 (SEQ ID NO: 18) em 24
horas. De um modo importante, o colágeno produzido como
resultado do contato com a SEQ ID NO: 8 foi
substancialmente mantido por pelo menos 48 horas. SEQ ID
NO: 8 também foi comparada com um peptídeo de cuidado de
25 pele principal conhecido por estimular a produção de
colágeno, KTTKS (SEQ ID NO: 17) (Katayama et. al., J. Biol.
Chem. 288: 9941-9944 (1983)). KTTKS é um ingrediente no
produto MATRIXYL™ (SEDERMA SAS, França). SEQ ID NO: 8
estimulou mais a produção de colágeno do que o peptídeo
30 KTTKS (SEQ ID NO: 17) (Tabela 5) em 24 e 48 horas.

Exemplo 4: Identificação das combinações de peptídeos que intensificam sinergisticamente a estimulação de colágeno - COMBICINAS

Populações heterogêneas dos tetrapeptídeos ativos
5 podem estimular a produção de colágeno num nível mais elevado do que as amostras homogêneas de tetrapeptídeos. Os componentes da composição heterogênea são chamados de COMBICINAS™. COMBICINAS é um grupo de REPLIKINES combinadas para produzir um efeito maior ou mais amplo em um ou mais
10 tipos de células alvo. Os peptídeos H11 (SEQ ID NO: 5), H12 (SEQ ID NO: 6), H13 (SEQ ID NO: 7) e H14 (SEQ ID NO: 8) foram combinados até uma concentração final de 50 µg/mL e avaliados usando o mesmo protocolo dos peptídeos individuais. Conforme esperado, o resultado obtido no ponto
15 de tempo de 24 horas se igualou à média das pontuações de indução individuais. A combinação de peptídeos em 48 horas, entretanto, induziu o colágeno até um nível de 43 µg/mL. Surpreendentemente, esta quantidade foi muito excessiva em relação à média antecipada (21 µg/mL) dos quatro peptídeos
20 individuais (ver Tabela 5). Deste modo, combinações específicas dos peptídeos podem estimular a produção de colágeno até um grau maior do que os peptídeos individuais na mesma concentração. Além disso, os tetrapeptídeos de uma variedade de fontes ECM tais como colágeno, laminina e
25 elastina podem produzir uma indução intensificada de uma variedade de proteínas ECM (ver Tabelas 1 e 5).

Exemplo 5: Produção de COMBICINA barata para intensificar a estimulação da produção de colágeno

O alto custo da síntese de peptídeos limita a
30 possibilidade de produção de composições heterogêneas dos

peptídeos bioativos. A presente invenção abranda muito esta
limitação. Devido ao fato das seqüências atualmente
reveladas terem atributos comuns (por exemplo, uma glicina
ou prolina em ambos os terminais), uma faixa de
5 tetrapeptídeos variados nas posições 2 e 3 podem ser
sintetizados numa única série de produção. Os peptídeos
sintéticos podem ser feitos por qualquer método conhecido
na técnica. (Benoiton, N., *Chemistry of Peptide Synthesis*,
CRC (2005)). Durante a produção dos peptídeos, misturas de
10 aminoácidos são adicionadas ao invés das amostras
homogêneas. A química para determinar as proporções
corretas das concentrações de aminoácidos adicionados nas
posições misturadas para obter a proporção desejada dos
peptídeos resultantes foi anteriormente descrita (Greenbaum
15 et al., *Molecular and Cellular Proteomics* 1: 60-68, 2002;
Krstenansky et al., *Letters in Drug Design and Discovery* 1:
6-13, 2004; ambas as referências são aqui incorporadas na
sua totalidade). Usando esta metodologia, uma biblioteca de
peptídeos heterogêneos pode ser feita por aproximadamente o
20 mesmo custo da síntese de um peptídeo.

A aplicação deste processo de produção permite a
produção barata de combicinas bioativas. Isso é
possibilitado pela composição única dos tetrapeptídeos
revelados. As misturas de tetrapeptídeos são mais bem
25 adequadas para incorporação em formulações de uso tópico do
que os peptídeos mais longos. Devido ao seu comprimento, os
tetrapeptídeos têm vantagens práticas e químicas em
peptídeos mais longos, incluindo os seguintes: incorporação
mais fácil e dissolução em formulações, maior
30 permeabilidade na pele e nos poros e maiores rendimentos de

produção com métodos mais fáceis de produzir combinações de peptídeos. Embora não seja requerido, as formulações ideais dos tetrapeptídeos, individualmente ou em combinação, são formulações que mantêm uma significativa produção de colágeno em 24 horas por até 48 horas. Mais preferivelmente, as formulações poderiam induzir a síntese de ECM por todo o período de 48 horas, de modo que mais colágeno seja produzido por 48 horas do que em 24 horas. Embora dentro do escopo da atual invenção, os tetrapeptídeos que promovem a produção de proteínas ECM em 24 horas, porém apresentam produção diminuída em 48 horas, são menos favorecidos. Sob esse aspecto, Tabela 6 mostra os resultados dos peptídeos atualmente revelados. Os peptídeos preferidos estão em negrito.

15 **Tabela 6: Peptídeos revelados**

SEQ NO	ID	Peptídeos	Colágeno liberado (µg/mL) 24 h	Colágeno liberado (µg/mL) 48 h	Liberação significativa de colágeno em 24 h e 48 h	Aumento na liberação de colágeno em 48 h v. 24 h	Redução na liberação de colágeno em 48 h v. 24 h
18	LL37		30	52	√	√	
-	H6		25	13			
1	H7		0	54		√	
2	H8		15	9			
3	H9		35	0			√
4	H10		34	0			√

5	H11	45	21			√
6	H12	2	37		√	
7	H13	18	2			
8	H14	30	26	√		
8	H38	29	28	√		
-	H15	25	43	√	√	
9	H16	31	3			√
10	H21	25	29	√		
11	H22	33	21			√
12	H23	1	17		√	
13	H25	13	7			√
14	H26	29	35	√		
15	H29	4	19		√	
16	H30	9	20		√	
17	H32 (crista is e toxicid ade celular)	NA	12			
17	H37	11	22		√	
-	H33	14	21		√	
-	H34	22	34		√	
-	H35	9	23		√	
-	H36	21	36		√	

Exemplo 6: Estimuladores de colágeno também servem como moléculas multiefetoras intensificando o fechamento das feridas das células epiteliais da pele

Colágenos são componentes chave de todas as fases da cicatrização de feridas. A estimulação da produção de colágeno reflete que o dano ocorreu à rede de colágeno (por exemplo, por enzimas ou destruição física). Realmente, o colapso total da rede de colágeno de fato faz com que a cicatrização ocorra. Conseqüentemente, um estimulador de colágeno também pode servir como uma molécula multiefetora orquestrando certa remodelagem da matriz e intensificando a cicatrização de feridas.

Experimentos de cicatrização de feridas foram efetuados em monocamadas das células epiteliais da pele humana (CRL-2592) plaqueadas em placas de 12 poços. As células foram privadas de soro por 24 horas antes da experimentação. As monocamadas confluentes de CRL-2592 foram feridas usando uma ponta de pipeta P200 (200 µL). As feridas foram lavadas e documentadas por fotografia antes do tratamento com peptídeo. Os peptídeos foram adicionados até uma concentração final de 20 a 40 µg/mL. As células foram mantidas num incubador a 37 °C, CO₂ 5% e 92% de umidade, exceto quando as imagens foram sendo capturadas por um curto período em temperatura ambiente. O fechamento da ferida foi acompanhado nos pontos de tempo de 6 horas e 10 horas. Feridas tratadas com PBS foram usadas como controles negativos para propósitos de comparação.

Tabela 7: Efeito dos peptídeos no fechamento de feridas epiteliais da pele humana *in vitro*

	0 h	6 h		10 h	
Composto	Tamanho W*	Tamanho W	% de fechamen to	Tamanho W	% de fechamen to

PBS-1	36	29	19,40%	21	41,70%
PBS-2	52	42	19,20%	30	42,30%
SEQ ID NO: 14	25	12	52%	2,75	89%
SEQ ID NO: 5	48	39	19%	30	37,50%
Tamanho W*: Tamanho da ferida (arbitrário)					

O fechamento da ferida da monocamada *in vitro* é um resultado da migração celular, a qual é importante em muitos processos biológicos tais como embriogênese, angiogênese, reações inflamatórias e reparo de feridas.

5 Esses processos são considerados como sendo regulados pelas interações com outras células, citocinas e proteínas ECM. Conforme demonstrado na Tabela 7, SEQ ID NO: 14 induz significativamente o fechamento de feridas em comparação com os efeitos do PBS sozinho. Tal atividade é peptídeo-

10 específica, assim como específica do tipo celular, uma vez que SEQ ID NO: 14 não induz o fechamento de ferida numa monocamada de fibroblasto de pele humana (dados não apresentados). SEQ ID NO: 5 também é uma indutora de colágeno, porém não intensifica o fechamento de feridas ou

15 a migração de células epiteliais até qualquer grande extensão em comparação com os efeitos do PBS sozinho. O fato de que a SEQ ID NO: 14 induziu a migração celular ou o fechamento de feridas de um modo específico para as células epiteliais da pele (isto é, não recruta os fibroblastos)

20 pode adicionar uma vantagem para o uso deste peptídeo para cuidados de pele, uma vez que se acredita que o recrutamento de grandes quantidades de fibroblastos ativos

num sítio ferido resulte numa deposição excessiva e contração do tecido resultando em cicatrização.

Todas as composições ou métodos revelados e reivindicados aqui podem ser feitos e executados sem
5 experimentação demasiada à luz da presente descoberta. Enquanto as composições e métodos da invenção foram descritos em termos das modalidades preferidas, será aparente para as pessoas versadas na técnica que variações podem ser aplicadas às composições e/ou métodos e nos
10 passos ou na seqüência de passos dos métodos aqui descritos sem sair do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será aparente que certos agentes, os quais são tanto quimicamente quanto fisiologicamente relacionados podem ser substituídos para os agentes aqui descritos,
15 enquanto os mesmos resultados ou similares poderiam ser alcançados. Todos os tais substitutos e modificações similares aparentes para as pessoas versadas na técnica são considerados como estando dentro do espírito, escopo e conceito da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Tetrapeptídeo capaz de induzir a produção das proteínas da matriz extracelular, **caracterizado** pelo fato de que consiste nas SEQ ID NO: 3, 5, 7 ou 8, em que
5 o tetrapeptídeo é amidado no terminal carbóxi ou lipidado no terminal amino.
2. Tetrapeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que consiste na SEQ ID NO: 3.
3. Tetrapeptídeo, de acordo com a reivindicação 1,
10 **caracterizado** pelo fato de que consiste na SEQ ID NO: 5.
4. Tetrapeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que consiste na SEQ ID NO: 7.
5. Tetrapeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que consiste na SEQ ID NO: 8.
- 15 6. Tetrapeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o tetrapeptídeo é amidado no terminal carbóxi.
7. Tetrapeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o tetrapeptídeo é
20 lipidado no terminal amino.
8. Tetrapeptídeo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a proteína da matriz extracelular é colágeno.
9. Composição **caracterizada** pelo fato de que o
25 compreende o tetrapeptídeo como definido na reivindicação 1 e um veículo farmacologicamente aceitável.
10. Composição, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a composição está na
30 forma de um aerossol, emulsão, líquido, loção, creme,

pasta, unguento ou espuma.

MGPRLSVWLL LLPAALLLHE EHSRAAAKGG CAGSGCGKCD CHGVKQKGE
 RGLPGLQGV GFPGMQGPEG POGPPGQKGD TGEPGLPGTK GTRGPPGASG
 YPGNPGLPGI PGQDGPPEGPP GIPGCNGTKG ERGPLGPPGL PGFAGNPPGP
GLPGMKGDPG EILGHVPGML LKGERGFPPI PGTPGPPGLP GLQGPVGGPP
FTGPPGPPGP PGPPGEKQOM GLSFQGPKGD KGDQVSGPP GVPGQAQVQE
 KGDFATKGEK GQKGEPPFQG MPGVGEKGEPP GKPGPRGKPG KDGDKGEKGS
PGFPGEPPYP GLIGRQGPQG EKGEAGPPGP PGIVIGTGPL GEKGERGYPG
 TPGPRGEPGP KGFPGLPGQP GPPGLVVPQG AGAPGFFGER GEKGDGRGFP
 TSLPGPSGRD GLPGPPGSPG PPGQPGYTNG IVECQPPPPG DQGPPGIPGQ
PGFIGEIGEK GQKGESCLIC DIDGYRGGPG PGPPGEIGF PGOPGAKGDR
GLPGRDGVAG VPGPOGTPGL IGQPGAKGEP GEFYFDLRLK GDKGDPGFP
QPGMPGRAGS PGRDGHPPGLP GPKGSPGSPG LKGERGPPGG VGFPGRGDT
GPPGPPGYGP AGPIGDKQA GFPGGPPGSPG LPGPKGEPGK IVPLGPPGA
 EGLPGSPGFP GPQDGRGFP TPGRPPGLPGE KGAVGQPGIG FPGPPGPKGV
DGLPGDMGPP GTPGRPGFNG LPGNPVQVQ KGEPGVGLPG LKGLPGLPGI
PGTPGEKCSI GVPGVPEHG AIGPPGLQGI RGEPGPPGLP GSVGSPPGVP
IGPPGARGPP GGQGPPGLSG PPGIKGEKGF PGFPGLDMPG PKGDKGAOGL
PGITGQSGLP GLPGQQGAPG IPGFPGSKGE MGVMGTPGQP GSPGPPGAPG
LPGEKGDHGF PGSSGPRGDP GLKGDKGDVG LPKPGSMDK VDMGSMKGQK
 GDQGEKQIG PIGEKGSRGD PGTGVPVKD GQAGQPGQPG PKGDPGISGT
PGAPGLPGPK GSVGGMGLPG TPGEKGVPI PGPQSPGLP GDKGAKGEK
QAGPPGIGIP GLRGEKGDQ IAGFPGSPGE KGEKGSIGIP GMPGSPGLKG
SPGSGVYPPG PGLPGEKGDK GLPGLDGIPI VKGEAGLPGT PGPTGPAGQK
GEPPSDGIPG SAGEKGEPL PGRGFPFP AKGDGSKGE VGFPGLAGSP
GIPGSKGEQG FMGPPGPPGQ PGLPGSPGHA TEGPKGDRGP QGQPLPGLP
GPMGPPGLPG IDGVKGDKN PGWPGAPVP GPKGDPGFQG MPGIGGSPGI
 TGSKGDMGPP GVPGFQGP LPGLQGIKGD QGDQGVPGAK GLPGPPGPPG
 PYDIKGEFG LPGPEGPPGL KGLQGLPGPK GQQGVTGLVG IPGPPGIPGF
 DGAPGQKGM GPAGPTGPRG FPGPPGPDGL PGSMGPPGTP SVDHGFLVTR
 HSQTIDDPQC PSGTKILYHG YSLLYVQNE RAHQDLGTA GSCLRKFSTM
 PFLFCNINNV CNFASRNDYS YWLSTPEPMP MSMAPITGEN IRPFISRCV
 CEAPAMVMAV HSQTIQIPPC PSGWSSLWIG YSFMHTSAG AEGSGQALAS
 PGSCLEEFRS APFIECHGRG TCNYYANAYS FWLATIERSE MFKKPTPSTL
 KAGELRTHVS RCQVCMRRT

FIG. 1

MMSFVQKGSW LLLALLHPTI ILAQQEAVEG GCSHLGQSYA DRDVWKPEPC
QICVCDSGSV LCDDIICDDQ ELDCPNPEIP FGECCAVCPQ PPTAPTRPPN
GQGPQGPCKGD PGPPGIPGRN GDFGIPGQPG SPGSPGPPGI CESCPTGPQN
YSPQYDSYDV KSGVAVGGLA GYPGPAGPPG PPGLPPTSGH PGSPGSPGYQ
GPPGEPGQAG PSGLPGLPGA IGPSGPAGKD GESGRPGRPG ERGLPGPPGI
KGPAGIPGFP GMKGHRGFDG RNKEKGETGA PGLKGENGLP GENGAPGPMG
PRGAPGERGR PGLPGAAGAR GNDGARGSDG QPGPPGPPGT AGFPSPGAK
GEVGPAGSPG SNGAPGQRGE PGPQGHAGAQ GPPGPPGING SPGGKGMGPF
AGIPGAPGLM GARGPPGPAG ANGAPGLRGG AGEPPKNGAK GEPGPRGERG
EAGIPGVPGA KGEDGKDGSF GEPGANGLPG AAGERGAPGF RFPAGPNGIP
GEKGPAGERG APGPAGPRGA AGEPPRDGVP GGPGMRGMPG SPGGPGSDGK
PGPPGSQGES GRPGPPGPPG PRGQPGVMGF PGPKGNDGAP GKNGERGGPG
GPGPQGPPIK NGETGPPGPP GPTGPPGDKG DTGPPGPQGL QGLPSTGGPP
GENGKPGEPG PKGDAGAPGA PGGKGDAGAP GERGPPGLAG APGLRGAGP
PGPEGGKGA GPPGPPGAAG TPLQGMPE RGGLGSPGPK GDKGEPGGPG
ADGVPGKDG RGPPTGPIGP GPAGQPGDKG EGGAPGLPGI AGPRGSPGER
GETGPPGPAG FPGAPQNGE PGGKGERGAP GEKGEPPGPP VAGPPGGSGP
AGPPGPQGVK GERGSPGGPG AAGFPARGL PGPPGSNGNP GPPGSPGSPG
KDGPPGPAGN TGAPGSPGVS GPKGDAGQPG EKGSPPAQGP PGAPGLGIA
GITGARGLAG PPGMPGPRGS PGPQGVKGES GKPGANGLSG ERGPPGPQGL
PGLAGTAGEP GRDGNPGSDG LPGRDGSPPG KGDRGENGSP GAPGAPGHPG
PPGPVGPAGK SGDRGESGPA GPAGAPGPAG SRGAPGPQGP RGDKGETGER
GAAGIKGHRG FPGNPGAPGS PGPAGQGGAI GSPGPAGPRG FVGPSPGPK
DGTSGHPGPI GPPGPRGNRG ERGSESPGH PGQPPGPPG GAPGPCCGV
GAAAIAGIGG EKAGGFAPYY GDEPMDFKIN TDEIMTSLKS VNGQIESLIS
PDGSRKNPAR NCRDLKFCHP ELKSGEYWVD PNQGCKLDAI KVFCNMETGE
TCISANPLNV PRKHWWTDSS AEKKHVWFE SMDGGFQFSY GNPELPEDVL
DVQLAFLRLI SSRASQNTY HCKNSIAYMD QASGNVKKAL KLMGSNEGEF
KAEGNSKFTY TVLEDGCTKH TGEWSKTVFE YRTRKAVRLP IVDIAPYDIG
GPDQEFVVDV GPVCFI

FIG. 2

MGRLSVWLL LLPAALLLHE EHSRAAAKGG CAGSGCGKCD CHGVKQKGE
 RGLPGLQGI GFPGMQPEG PQGPPGQKGD TGEPLPGTK GTRGPPGASG
 YPGNPGLPGI PGQDGPPGPP GIPGCNGTKG ERGPLGPPGL PGFAGNPGPP
 GLPGMKGDPG EILGHVPGML LKGERGFPGI PGTPGPPGLP GLQGPVGPPG
 FTGPPPGPPGP PGPPGKEKQOM GLSFQGPKGD KGDQGVSGPP GVPGQAQVQE
 KGDFATKGEK GQKGEPGFQG MPGVGEKGEF GKPGPRGKPG KDGDKGEKGS
 PGFPGEPGYP GLIGRQGPQG EKGEAGPGP PGIVIGTGPL GEKGERGYPG
 TPGPRGEPGP KGFPGLPGQP GPPGLPVPGQ AGAPGFPPGER GEKDRGFPPG
 TSLPGPSGRD GLPGPPGSFG PPGQPGYTNG IVECQPGPPG DQGPPIPGQ
 PGFIGEIGEK GQKGESCLIC DIDGYRPPG PQGPPGEIGF PGQPGAKGDR
 GLPGRDGVAG VPGPQGTPL IGQPGAKGEP GEFYFDLRLK GDKGDPGFPPG
 QPGMPGRAGS PGRDGHPLP GPKGSPGSVG LKGERGPPGG VGFPGSRGDT
 GPGPPGYGP AGPIGDKQA GFPGGPGSPG LPPGKGEPPGK IVPLPGPPGA
 EGLPGSPGFP GPQGRGFPPG TPGRPGLPGE KGAVGQPGIG FPGGPKGV
 DGLPGDMGPP GTPGRPGFNG LPPNPGVQGG KGEPPVGLPG LKGLPGLPGI
 PGTPGEKGS I GVPGVPEHG AIGPPGLQGI RGEPGPPGLP GSVGSPGVPG
 IGPPGARGSP GGQPPGLSG PPGIKGEKGF PGFPGLDMPG PKDKGAQGL
 PGTGQGLP GLPQQGAPG IPGFPGSKGE MGVMGTPGQP GSPGPVGAPG
 LPGEKGDHGF PGSSGPRGDP GLKGDKGDVG LPGKPGSMDK VDMGSMKGQK
 GDQGEKQIG FIGEKSRGD PGTGVPVKD GQAGQPGQPG PKGDPGISGT
 PGAPGLPGPK GSVGGMGLPG TPGEKGVPGI PGPQGSPLP GDKGAKGEKG
 QAGPPGIGIP GLRGEKGDQG IAGFPSPGE KGEKGSIGIP GMPGSPGLKG
 SPGSVGYPGS PGLPGEKGDK GLPGLDGIPG VKGEAGLPGT PGPTGPAGQK
 GEPGSDGIPG SAGEKGEPLG PGRGFPPGFP AKGDKGSKGE VGFPGLAGSP
 GIPGSKGEQG FMGPPGPQGG PGLPGSPGHA TEGPKGDRGP QGQPLPGLP
 GPMGPPGLPG IDGVKGDKN PGWPGAPVP GPKGDPGFQG MPGIGGSPGI
 TGSKGDMGPP GVPGFQGPKG LPGLQGKGD QGDQGVPGAK GLPGPPPPP
 PYDIIKGEPP LPGPEGPPGL KGLQGLPGPK GQQGVTGLVG IPGGPIPGF
 DGAPGQKEM GPAGPTGPRG FPGGPDGL PGSMGPPGTP SVDHGFLVTR
 HSQTIDDPQC PSGTKILYHG YSLLYVQNE RAHQDLGTA GSCLRKFTM
 PFLFCNINNV CNFASRNDYS YWLSTPEPMP MSMAPITGEN IRPFISRCV
 CEAPAMVMAV HSQTIQIPPC PSGWSSLWIG YSFVMHTSAG AEGSGQALAS
 PGSCLEEFERS APFIECHGRG TCNYANAYS FWLATIERSE MFKKPTPSTL
 KAGELRTHVS RCQVCMRRT

FIG. 3