

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 810**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2017 PCT/US2017/056399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2018 WO18071709**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2017 E 17859564 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025 EP 3526233**

54 Título: **Péptidos derivados de fibronectina con bioactividad mejorada y susceptibilidad reducida a la degradación de elastasa de neutrófilos**

30 Prioridad:

14.10.2016 US 201662408222 P

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

25.03.2025

73 Titular/es:

**NEOMATRIX THERAPEUTICS INC. (100.00%)
25 Health Sciences Drive
Stony Brook, NY 11790-3350, US**

72 Inventor/es:

**CLARK, RICHARD AUGUST y
LIN, FUBAO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 008 810 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados de fibronectina con bioactividad mejorada y susceptibilidad reducida a la degradación de elastasa de neutrófilos

Apoyo gubernamental

5 Esta invención se realizó con el apoyo gubernamental otorgado por US Army AFIRM 1 y JWMRP S14 bajo los números de subvención W81XWH-08-2-0034 y W81XWH-15-C-0043, respectivamente. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Campo técnico

10 Esta invención se basa en el descubrimiento de polipéptidos derivados de la fibronectina que son resistentes a la elastasa de neutrófilos y pueden enlazarse a factores de crecimiento y/o potenciar la actividad del factor de crecimiento. Se ha descubierto que los polipéptidos previamente conocidos derivados de la fibronectina con la capacidad de potenciar la actividad del factor de crecimiento son susceptibles a la degradación por la elastasa de neutrófilos humanos, lo que reduce su eficacia en usos *in vivo*. Esta invención se relaciona con nuevos polipéptidos potenciadores de factores de crecimiento con mayor resistencia a la degradación por la elastasa de neutrófilos. Esta invención también se relaciona con los usos de dichos compuestos en tratamientos cosméticos y en el tratamiento de heridas y cáncer.

Antecedentes

20 En la población civil de Estados Unidos, cada año aproximadamente 500,000 pacientes con quemaduras acuden a los servicios de urgencias. De 40,000 ingresos hospitalarios anuales, 25,000 víctimas de quemaduras son admitidas en centros especializados en quemados. La extensión progresiva de las quemaduras puede tener un efecto devastador. En el transcurso de unos días a una semana, las quemaduras profundas de espesor parcial pueden convertirse en quemaduras de espesor total, lo que a corto plazo conduce a una mayor pérdida de tejido, un tiempo de curación más prolongado y un exceso de morbilidad y mortalidad. A largo plazo, el aumento de cicatrices, contracturas de las heridas y mala calidad de vida se convierten en problemas importantes. Si bien no están claros el mecanismo o mecanismos exactos que llevan a la conversión de la zona de isquemia a necrosis total, es probable que intervengan varios procesos, incluido el estrés oxidativo y de citoquinas resultante de la inflamación y reperfusión isquémica. Las terapias para mejorar el flujo sanguíneo, como los agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS) y anticoagulantes (heparina), no han demostrado un beneficio sustancial en la prevención de la progresión de las lesiones por quemaduras. Por lo tanto, la terapia para limitar la progresión de las quemaduras es una necesidad no satisfecha.

35 Existe evidencia de que la fibronectina (FN) está involucrada en muchos procesos biológicos, incluida la reparación de tejidos, embriogénesis, coagulación sanguínea, migración celular, reparación de heridas y adhesión celular. Hay dos formas principales de fibronectina. El primero es un dímero de glicoproteína insoluble que actúa como enlazador en la matriz extracelular (ECM), y el segundo es un dímero soluble enlazado por disulfuro que se encuentra en el plasma. La forma ECM de la fibronectina se expresa en fibroblastos, condrocitos, células endoteliales, macrófagos y ciertas células epiteliales. La forma plasmática de la fibronectina es expresada por los hepatocitos. La fibronectina puede servir como una molécula de adhesión celular general al anclar las células al colágeno o a sustratos de proteoglicanos. La fibronectina también puede desempeñar un papel en la organización de las interacciones celulares al enlazarse a los componentes de la ECM y a los receptores de fibronectina enlazados a la membrana en las superficies celulares. Las formas de fibronectina se encuentran en vertebrados, incluidos mamíferos, aves, anfibios, peces y reptiles.

45 La FN, una glicoproteína de 500 kDa, circula en la sangre y es producida y depositada por las células tisulares en la matriz extracelular provisional (ECM) durante la formación del tejido. Como componente crítico de la ECM provisional, la FN desempeña un papel vital en la embriogénesis, morfogénesis y cicatrización de heridas, pero es deficiente en las heridas y la sangre de los pacientes con quemaduras. Se sabe que la FN se degrada en los fluidos de las heridas por quemaduras por la endopeptidasa elastasa de los neutrófilos. Ver Grinnell, et al, Identification of Neutrophil Elastase as the Proteinase in Burn Wound Fluid Responsible for Degradation of Fibronectin, J Invest. Dermatology, 1994, 103(2):155-61.

50 El péptido "P12" divulgado anteriormente es un péptido de 14 residuos que se encuentra crítico dentro del tipo sándwich de inmunoglobulina de la lámina β -plegada de la primera repetición tipo III de la fibronectina (FN) (FNIII₁). A diferencia de FN, P12 en solución promueve el crecimiento, proliferación y migración de células mesenquimales de forma intrínseca y sinérgica con una variedad de factores de crecimiento, especialmente el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB). Además, P12 protege a los fibroblastos dérmicos humanos adultos (AHDF) de la muerte celular inducida por el estrés oxidativo y de citoquinas y/o la retirada de nutrientes en presencia de PDGF-BB. P12 también limita la progresión de las lesiones por quemaduras en modelos de quemaduras de ratas y cerdos y mitiga las cicatrices en un modelo porcino con progresión de lesiones por quemaduras verticales. Véase, por ejemplo, el documento PCT/US2006/038778; Patente de Estados Unidos 8,759,300; Lin, et al, Fibronectin peptides that bind PDGF-BB enhance survival of cells and

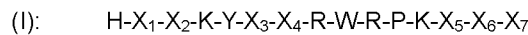
tissue under stress, *J Invest Dermatol.* 2014 Apr; 134(4): 1119-1127; y Asif, et al., Blood Vessel Occlusion in Peri-burn Tissue is Secondary to Erythrocyte Aggregation and Mitigated by a Fibronectin-derived Peptide that Limits Burn Injury Progression, *Wound Rep Reg* (2016) 24 501-513. En particular, el fragmento de fibronectina PSHISKYILRWRPK, o "P12", se divulga tanto en Lin, et al. como en Asif, et al. como útil para el tratamiento de heridas, particularmente el tratamiento de quemaduras.

Se proporciona más información sobre la técnica anterior en Lin et al., *Journal of Investigative Dermatology*, 2011, volumen 131, número 1, páginas 84-98; documento US 2010/292161; documento WO 2007/044396; documento WO 2005/117936; documento WO 02/090377; y Sottile et al., *Molecular Biology of the Cell*, 2002, volumen 13, páginas 3546-3559.

10 Resumen

Presentamos péptidos resistentes al elastato de neutrófilos derivados de fragmentos de fibronectina para uso en el tratamiento de heridas. En particular, hemos descubierto que los fragmentos peptídicos biológicamente activos de fibronectina, como P12, que se han divulgado anteriormente, se degradan fácilmente, *in vitro*, por la elastasa de los neutrófilos y no promueven la curación cuando se aplican tópicamente sobre las heridas. Incluso las formas cicladas de los fragmentos peptídicos biológicamente activos de fibronectina previamente divulgados, como el P12 cíclico, siguen siendo sensibles a esta endopeptidasa. Presentamos péptidos que son fragmentos y/o derivados de fragmentos de fibronectina que mantienen su actividad biológica de enlace a factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) y de potenciación de la supervivencia de los fibroblastos, y además han sido modificados para aumentar su resistencia a la degradación por la elastasa de los neutrófilos, *in vitro* e *in vivo*.

En algunas realizaciones de la invención, el péptido resistente a la elastasa de neutrófilos es un polipéptido lineal o cíclico de acuerdo con la fórmula I:



en donde

25 X_1 es I o G o L,

X_2 es S o G,

X_3 es I o G o L,

X_4 es L o G,

X_5 es N o G,

30 X_6 está ausente o S, y

X_7 está ausente o V; y

en donde no hay dos aminoácidos consecutivos en los primeros 13 aminoácidos del polipéptido que difiera de la secuencia HISKYILRWRPKN. Otras realizaciones de la invención incluyen HISKYILRWRPKNSV (P46), HIGKYGLRWRPKNSV (cNP7), HIGKYGLRWRPKGSV (cNP8), HGSKYGLRWRPKNSV, HIGKYIGRWRPKNSV, HGSKYIGRWRPKNSV, HGSKYIGRWRPKGSV y formas cíclicas de los mismos.

También presentamos métodos de uso de estos péptidos para tratamientos cosméticos y el tratamiento de heridas y enfermedades cardiovasculares. Las heridas a tratar incluyen una incisión o extirpación quirúrgica, una lesión traumática, una quemadura térmica, una quemadura química, una lesión o ulceración de la piel, mucosa, tejido conectivo, fascia, ligamento, tendón, cartílago, nervio o músculo del paciente y una herida en el hueso del paciente. Las heridas tratadas pueden estar infectadas o no. Los incidentes cardiovasculares para tratar incluyen vasos sanguíneos ocluidos con agregados de glóbulos rojos y/o fibrinógeno y/o fibrina, como pueden ocurrir en heridas por quemaduras; infarto de miocardio; insuficiencia de múltiples órganos; diabetes; anemia de células falciformes; policitemia vera; e hiperfibrinogenemia. En una realización particular, los péptidos resistentes a la elastasa de neutrófilos de la invención se utilizan para tratar quemaduras térmicas y/o químicas.

La invención también presenta composiciones (por ejemplo, composiciones fisiológicamente aceptables) que incluyen un péptido resistente a la elastasa de neutrófilos de la invención. La composición fisiológicamente aceptable puede ser una composición farmacéutica que promueva una respuesta terapéutica. Como se señaló anteriormente, las composiciones cosméticas también se presentan y pueden incluir los péptidos descritos aquí. Las presentes composiciones también pueden ser no farmacéuticas en el sentido de que pueden incluir péptidos concentrados y/u otros ingredientes que deben diluirse o modificarse de otro modo (por ejemplo, mezclarse con otros ingredientes activos o inactivos) antes de su uso (por ejemplo, en un cultivo celular o como una formulación cosmética o terapéutica).

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1 es un diagrama de la susceptibilidad de cP12 a la digestión por la elastasa de neutrófilos humanos. Fig. 1A: cP12 se incubó con elastasa de neutrófilos humanos purificada en una proporción molar enzima:sustrato de 1:200, el péptido intacto mínimo (MW = 1789) se mantuvo a las 24 horas. Fig. 1B: Sitios sensibles a la elastasa de cP12 escindidos por la elastasa de neutrófilos humanos y analizados por MS.
- La Fig. 2 muestra la bioactividad para P12, P45 y P46. Se sembraron células de fibroblastos dérmicos humanos adultos CF31 a razón de 1000 células/pozo en una placa de 96 pozos recubierta de colágeno en DMEM durante la noche, luego se agregó 1 nM de PDGF-BB con péptidos en las dosis indicadas y las células se incubaron a 37 °C durante 6 días. Luego se midió el metabolismo celular mediante el ensayo XTT leyendo la OD a 450 nm. Cada punto representa la media de 6 réplicas con una SD típica = 5-10 % alrededor de la media (no se muestra para mayor claridad del injerto).
- La Fig. 3 muestra la digestión de P46 por la elastasa de neutrófilos a las 4 horas y 24 horas. P46 se incubó con elastasa de neutrófilos humana purificada en una proporción molar enzima:sustrato de 1:100 a 37 °C durante 4 horas (A) o 24 horas (B). La estabilidad de los péptidos se determinó mediante análisis MALDI-TOF. El peso molecular de P46 es 1898.
- La Fig. 4 muestra la bioactividad de P12, P46, cNP7 y cNP8. Los fibroblastos dérmicos humanos adultos, CF31, a 1000 células/pozo se incubaron a 37 °C en una placa de 96 pozos recubierta de colágeno con DMEM, 1 nM PDGF-BB con péptidos en las dosis indicadas durante 6 días y luego se midió el metabolismo celular mediante el ensayo XTT, leyendo la OD a 450 nm. Los datos representan la media de 6 réplicas.
- La Fig. 5 muestra que cNP8, derivado de P46, es resistente a la digestión por la elastasa de neutrófilos. cNP8 se incubó con elastasa de neutrófilos humana purificada en una proporción molar enzima:sustrato de 1:100 a 37 °C durante 4 horas (A) o 24 horas (B). La estabilidad de los péptidos se determinó mediante análisis MALDI-TOF. El peso molecular de cNP8 es 1736. El péptido intacto (PM=1736) se mantuvo durante 24 horas.
- La Fig. 6 muestra una comparación de la eficacia del péptido cP12 y cNP8 para promover la reepitelización de heridas por quemaduras con tratamiento tópico en un modelo porcino.
- La Fig. 7 muestra el aumento de la reepitelización el día 10 en el sitio de la herida con tratamiento intravenoso con cNP8 en un modelo de quemadura porcina.
- La Fig. 8 muestra el aumento de la reepitelización el día 14 en el sitio de la herida con tratamiento intravenoso con cNP8 en un modelo de quemadura porcina.
- Descripción detallada
- Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción que sigue. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.
- Determinación de péptidos derivados de fibronectina con bioactividad mejorada y resistencia a la digestión con elastasa de neutrófilos:
- El péptido P12, previamente divulgado, es degradado por la elastasa de los neutrófilos, que está presente en los fluidos de las heridas:
- Para determinar si el P12 cíclico ("cP12") es sensible a las endopeptidasas, se digirió el cP12 con elastasa de neutrófilos humanos. La reacción se detuvo con ácido fórmico y la mezcla de reacción se analizó mediante espectroscopia de masas. El análisis de los resultados mostró que cP12 tiene cinco sitios de escisión de elastasa (Figura 1B). Además, se eliminó casi todo el sustrato cP12 intacto (1789 mw) (Figura 1A).
- Determinación de fragmentos creados por digestión de fibronectina con elastasa de neutrófilos humanos y su bioactividad.
- Para encontrar un derivado de cP12 resistente a la elastasa con bioactividad equivalente a la de cP12, digerimos fibronectina IIII-C (FNIII-C), en la que se encuentra el péptido P12, con elastasa de neutrófilos humana purificada en una proporción molar enzima:sustrato de 1:100 a 37 °C durante 4 horas o 24 horas. Las muestras digeridas se analizaron con MS. Los resultados en ambos puntos de tiempo mostraron que la digestión con elastasa de FN IIII-C produjo dos péptidos, P45 (SKYILRWRPKNSV) y P46 (HISKYILRWRPKNSV) de la misma región de fibronectina que P12. El ensayo de bioactividad demostró que P46 mostró una bioactividad mayor que P12, según lo determinado por el ensayo de metabolismo de fibroblastos. (Figura 2). Por otro lado, P45 mostró poca bioactividad. (Figura 2).
- Determinación de la sensibilidad de P46 a la digestión con elastasa de neutrófilos humanos:

Para determinar la sensibilidad de P46 a la digestión con elastasa, se sintetizó P46 y se digirió con elastasa. Los resultados del análisis de MS mostraron que P46 mantuvo cierta sensibilidad a la digestión con elastasa (Figura 3). P46 se incubó con elastasa de neutrófilos humanos purificada en una proporción molar enzima:sustrato de 1:100 a 37 °C durante 4 horas (Figura 3A) o 24 horas (Figura 3B). Los péptidos más pequeños generados por elastasa se determinaron mediante análisis MALDI-TOF. El peso molecular de P46 es 1898.

cNP7 y cNP8 como péptidos biológicamente activos y resistentes a la elastasa de neutrófilos:

Con base en la secuencia de aminoácidos de P46 y las propiedades de escisión enzimática de la elastasa, diseñamos y sintetizamos cinco péptidos manipulados genéticamente, -HIGKYGLRWRPKNSV- (NP7) y -HIGKYGLRWRPKGGSV- (NP8), HISKYILGWRPKNSV (NP9), HISKYILRGRPKNSV (NP10), HISKYILRWGPKNSV (NP11), y para la resistencia a la digestión con elastasa. De estos, NP8 demostró la mejor actividad biológica en un experimento de cribado de supervivencia de fibroblastos dérmicos humanos adultos en un medio sin suero, pero con PDGF-BB 1 nM después de 6 días de incubación. NP9, NP10 y NP11 mostraron una actividad biológica mínima en esta criba.

Se compararon P12, P46, cNP7 y cNP8 por su capacidad para promover la supervivencia de fibroblastos dérmicos humanos adultos en presencia de PDGF-BB. Se incubaron fibroblastos dérmicos humanos adultos a 1000 células/pozo en una placa de 96 pozos recubierta de colágeno con DMEM, PDGF-BB 1 nM con péptidos en las dosis indicadas durante 6 días y luego se midió el metabolismo celular mediante el ensayo XTT. Los datos representan la media de 6 réplicas (Figura 4). Este ensayo de bioactividad demostró que los cuatro péptidos promovieron la supervivencia de los fibroblastos dérmicos humanos adultos y que cNP8 mostró una bioactividad equivalente o mejor, dependiendo de la concentración, en comparación con P46 y cNP7.

Los resultados de la incubación de péptidos con elastasa mostraron que el cNP8 era resistente a la digestión con elastasa. El cNP8, derivado de P46, se incubó con elastasa de neutrófilos humanos purificada en una proporción molar enzima:sustrato de 1:100 a 37 °C durante 4 horas (Figura 5A) o 24 horas (Figura 5B). La estabilidad del péptido se determinó mediante análisis MALDI-TOF. El peso molecular de cNP8 es 1736. Una gran mayoría del péptido intacto se mantuvo a las 24 horas. Por tanto, el cNP8 es un péptido con bioactividad y resistente a la digestión con elastasa.

p46 y cNP8 manipulados genéticamente a partir de P46 tienen la capacidad de enlazar factores de crecimiento:

Estudios previos demostraron que el péptido bioactivo P12 derivado de la fibronectina interactúa con el factor de crecimiento BB derivado de plaquetas y potencia su actividad para apoyar la supervivencia de los fibroblastos. Demostramos, arriba, que tanto el péptido P46 derivado de la fibronectina como el péptido manipulado genéticamente resistente a la elastasa cNP8 demostraron una bioactividad mucho mayor que la del P12. Para estudiar las actividades de enlace de estos péptidos, se determinaron las interacciones en tiempo real de P12, P46 y cNP8 con factores de crecimiento mediante resonancia de plasmón de superficie (Biacore T200). Los resultados demostraron que tanto P46 como cNP8 mostraron una actividad de enlace similar a la de P12. Se enlazan al PDGF-BB y al factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1), pero no se enlaza al factor de crecimiento epidérmico (EGF) ni al factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1).

Resonancia de plasmón de superficie:

En el sistema Biacore2000, las constantes de enlace a partir de datos cinéticos se determinan pasando concentraciones variables de péptidos FN (analitos) sobre superficies de chip que están acopladas con PDGF-BB (ligando), respectivamente. Todos los experimentos cinéticos se llevan a cabo a 20 °C a una tasa de flujo de 20 µl/min. Para los experimentos de transporte de masa, cada analito se inyecta a una concentración fija y se procesa a tasas de flujo que varían de 5 a 75 µl/min. Todos los analitos se inyectan sobre las superficies del ligando PDGF-BB así como sobre una superficie de control durante 120 s, seguido de 300 s de disociación en un regulador de ejecución. La regeneración del chip del sensor para inyecciones posteriores se logra mediante un pulso de SDS al 0.1 %. Los experimentos de transporte de masa han detectado pocas diferencias en la respuesta a diferentes tasas de flujo, validando así los datos de los experimentos cinéticos. Los sensorgramas se preparan y ajustan globalmente utilizando análisis de mínimos cuadrados no lineales e integración numérica de las ecuaciones de tasa diferencial con el software Biacore Bioevaluation. Cada sensorgrama generado utilizando una superficie de control se resta de los sensorgramas experimentales correspondientes y las curvas resultantes se transforman en unidades de concentración utilizando la masa molecular de las especies inyectadas, la equivalencia de 1000 unidades de resonancia (RU) por 1 ng/mm² y un espesor de matriz de 100 nm. Cada conjunto de datos, que consta de una serie de sensorgramas de inyecciones de diferentes concentraciones de analito sobre la misma superficie, se analiza utilizando modelos cinéticos del software Bioevaluation.

Nuevos péptidos para uso en la cicatrización de heridas:

Péptidos lineales o cíclicos de acuerdo con la Fórmula I:

- ejemplo, cuando un fragmento de FN que tiene una secuencia de origen natural se enlaza a un GF con una afinidad particular y, tras su administración a un paciente, mejora o altera eficazmente la actividad del GF en un sitio donde se necesita el GF, una variante biológicamente activa de ese fragmento de FN será una que, aunque no sea idéntica al fragmento de FN, se enlazará al mismo GF o los mismos GF con una afinidad suficientemente útil y de manera similar mejora o altera el GF o los GF en un sitio necesario. Para facilitar la lectura, no repetimos el término "o una variante biológicamente activa del mismo" después de cada referencia a un fragmento de FN u otra proteína o péptido. Se debe entender que donde los fragmentos FN que tienen una secuencia de origen natural son útiles, también lo son las variantes biológicamente activas de esos fragmentos.
- 5
- 10 Con respecto a la función, un fragmento puede enlazarse a un factor de crecimiento polipeptídico con una afinidad de al menos o aproximadamente $1 \times 10^{-7}M$ (por ejemplo, al menos $1 \times 10^{-8}M$; $1 \times 10^{-9}M$; o más). Alternativamente o además, un fragmento puede favorecer la supervivencia y/o proliferación de células FN-nulas.
- 15 Alternativamente o además, el fragmento puede incluir además un sustituyente en el terminal amino o terminal carboxi. El sustituyente puede ser un grupo acilo o un grupo amina sustituido o no sustituido (por ejemplo, el sustituyente en el terminal N puede ser un grupo acilo y el terminal C puede estar amidado con un grupo amina sustituido o no sustituido (por ejemplo, un grupo amino que tiene uno, dos o tres sustituyentes, que pueden ser iguales o diferentes)). El grupo amina puede ser un alquilo inferior (por ejemplo, un alquilo que tiene entre 1-4 carbonos). El grupo acilo puede ser un grupo acilo inferior (por ejemplo, un grupo acilo que tiene hasta cuatro átomos de carbono), especialmente un grupo acetilo.
- 20
- Los fragmentos de fibronectina, incluidos los fragmentos modificados descritos anteriormente, pueden ser resistentes a la proteasa y pueden incluir uno o más tipos de grupos protectores, tales como un grupo acilo, un grupo amida, un grupo bencilo o benzoilo, o un polietilenglicol. Más específicamente, un fragmento de fibronectina, incluidos los fragmentos modificados descritos anteriormente, puede ser acetilado en el terminal N y/o amidado en el terminal C.
- 25
- Los fragmentos de fibronectina también pueden modificarse para mejorar la absorción, incluyendo, por ejemplo, una adición de residuos de azúcar para potenciar el transporte a través de la barrera hematoencefálica.
- Cualquiera de los fragmentos puede incluir al menos un residuo de aminoácido en forma D.
- 30 Cualquiera de los fragmentos puede incluir al menos un residuo de aminoácido que no es de origen natural o modificado (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, ácido gamma-carboxiglutámico, o-fosfoserina, o-fosfotirosina o delta-hidroxilisina). Los residuos de aminoácidos que no son de origen natural son residuos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural codificados genéticamente. Otros ejemplos incluyen naftilalanina, que se puede sustituir por triptófano para facilitar la síntesis, L-hidroxipropilo, L-3,4-dihidroxifenilalanilo, alfa-aminoácidos como L-alfa-hidroxilisilo y D-alfa-metilalanilo, L-alfa-metilalanilo, beta-aminoácidos e isoquinolilo.
- 35 Los fragmentos que tienen residuos de aminoácidos que no son de origen natural pueden denominarse fragmentos sintéticos y constituyen un tipo de variante como se describe aquí. Otras variantes incluyen fragmentos de fibronectina en los que una cadena lateral natural de un residuo de aminoácido se reemplaza por una cadena lateral que no es de origen natural (en forma L o D). En otro aspecto, la invención presenta polipéptidos que incluyen una secuencia que está invertida con respecto a los terminales N y C de una secuencia que se encuentra de manera natural en un polipéptido de fibronectina o una variante biológicamente activa del mismo.
- 40
- Cualquiera de los fragmentos de las presentes composiciones puede ser uno de una pluralidad de fragmentos presentes. Estos fragmentos pueden enlazarse entre sí mediante los métodos descritos aquí. Como se señaló, los fragmentos de fibronectina, incluidas las formas variantes descritas aquí, pueden incluir además un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que tiene una secuencia que no aparece en una fibronectina). El polipéptido heterólogo puede ser un polipéptido que aumenta la vida media circulante, penetración celular o penetración transdérmica del fragmento al que está unido.
- 45
- Los fragmentos pueden estar contenidos en composiciones fisiológicamente aceptables o pueden estar contenidos en composiciones que no son adecuadas para la administración a un ser vivo (por ejemplo, soluciones concentradas o composiciones congeladas o liofilizadas).
- 50
- Las composiciones fisiológicamente aceptables pueden ser composiciones farmacéuticas y métodos para tratar a los pacientes se describen más adelante. Las composiciones fisiológicamente aceptables también pueden ser composiciones no farmacéuticas o composiciones farmacéuticas que pueden dispensarse sin prescripción médica. Por ejemplo, pueden venderse a un distribuidor o adquirirse "sin receta" con fines cosméticos (por ejemplo, para reducir el riesgo de daños en la piel o para minimizar o reparar daños en la piel). Por ejemplo, los fragmentos de fibronectina y las composiciones que los incluyen o combinaciones de ellos (por ejemplo, un complejo de factor de crecimiento FN) se pueden incorporar en formulaciones tópicas vendidas como
- 55

cosméticos, humectantes y similares, protectores solares, champús o acondicionadores, jabones u otros limpiadores espumosos o bálsamos labiales.

La invención también abarca moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos descritos aquí.

5 A continuación, se describen moléculas de ácidos nucleicos específicos, vectores (por ejemplo, vectores plasmídicos o vectores virales) y células huésped que los contienen, así como composiciones fisiológicamente aceptables que los contienen.

10 Otras composiciones de la presente invención son productos de manipulación genética tisular que incluyen un fragmento de una fibronectina o una variante biológicamente activa de la misma. Al igual que en otras composiciones, el fragmento o la variante de este puede enlazar a un factor de crecimiento polipeptídico o potenciar la actividad del factor de crecimiento (como se describe anteriormente y más adelante), factor que posteriormente puede retener la actividad biológica y puede administrarse a un paciente.

15 Otras composiciones de la presente invención comprenden un soporte sólido que está asociado con (por ejemplo, enlazado a o impregnado con) uno o más de los fragmentos de fibronectina, o las variantes biológicamente activas de la misma, descritos aquí. El soporte puede ser, por ejemplo, un recipiente de cultivo de tejidos (por ejemplo, una placa o matraz) o un dispositivo (por ejemplo, un dispositivo médico como uno utilizado para curar heridas (por ejemplo, una venda o gasa), reparar heridas (por ejemplo, una sutura o "steri-strip"), reparar quirúrgicamente (por ejemplo, una malla quirúrgica) o un implante de tejido (por ejemplo, un stent). El fragmento de fibronectina, o la variante biológicamente activa del mismo, puede enlazarse a un factor de crecimiento activo, incluido cualquiera de los descritos anteriormente.

20 Los métodos de la invención incluyen métodos para promover la cicatrización de heridas. Estos métodos incluyen una etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un fragmento de fibronectina, o una variante biológicamente activa de la misma, como se describe aquí. El fragmento de fibronectina, o la variante biológicamente activa de la misma, puede estar presente en un complejo con uno o más factores de crecimiento. Los métodos pueden incluir
25 opcionalmente una etapa de identificación de un paciente que necesita tratamiento. Dichos pacientes incluyen pacientes que sufren una extirpación quirúrgica o incisión de la piel, mucosa, tejido conectivo subyacente, fascia, ligamento, tendón, cartílago, hueso, nervio o músculo; pacientes que sufren una laceración traumática o pérdida de tejido de la piel, mucosa, tejido conectivo subyacente, fascia, nervio o músculo; y pacientes que sufren una quemadura térmica, quemadura química o ulceración de la piel, mucosa, tejido conectivo
30 subyacente, fascia, nervio o músculo.

Tal como se utiliza aquí, una "quemadura" es un daño tisular debido a la exposición al calor o a una sustancia química cáustica. Una "quemadura térmica" es un daño tisular debido a la exposición al calor. Una "quemadura química" es un daño tisular debido a la exposición a una sustancia química cáustica, a menudo un álcali fuerte o un ácido fuerte. Los agentes de quemaduras químicas que se tratarán con los péptidos definidos por la
35 invención incluyen, pero no se limitan a, fenol, creosol, gas mostaza, fósforo, mostaza nitrogenada, compuestos de arsénico, amoníaco, potasa cáustica, cal, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico.

40 Los métodos de la invención incluyen métodos para tratar enfermedades cardiovasculares, incluyendo la disminución de la oclusión de los vasos sanguíneos por agregados de glóbulos rojos y/o fibrinógeno y/o fibrina, como puede ocurrir en heridas por quemaduras; infarto de miocardio; insuficiencia de múltiples órganos; diabetes; anemia de células falciformes; policitemia vera; e hiperfibrinogenemia. Estos métodos incluyen una etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un fragmento de fibronectina, o una variante biológicamente activa de la misma, como se describe aquí. El fragmento de fibronectina, o la variante biológicamente activa de la misma, puede estar presente en un complejo con uno o más factores de crecimiento. Los métodos pueden incluir opcionalmente
45 una etapa de identificación de un paciente que necesita tratamiento.

Las formulaciones adecuadas se describen más adelante y, generalmente, toman la forma de una solución, loción, ungüento, gel, crema o bálsamo. Los fragmentos de fibronectina, ya sea que estén o no complejados con un factor de crecimiento, también se pueden administrar mediante su inclusión en una matriz extracelular (ECM; por ejemplo, una ECM natural o manipulada genéticamente), un vendaje, apósito, compresa o similar.

50 Mediante otros métodos de la invención, se puede localizar un factor de crecimiento endógeno en un tejido de un paciente. Estos métodos pueden llevarse a cabo administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye un fragmento de fibronectina, o una variante biológicamente activa de la misma, como se describe aquí. Al igual que en los métodos de tratamiento más específicos descritos anteriormente, estas composiciones se pueden administrar mediante aplicación tópica de una composición
55 farmacéutica, un ECM manipulado genéticamente o un soporte sólido. Estos métodos pueden describirse como métodos para administrar uno o más factores de crecimiento a un paciente. Los métodos pueden incluir opcionalmente una etapa de identificación de un paciente que necesita tratamiento. Estos pacientes incluyen pacientes que sufren una lesión en un tejido, una pérdida de un tejido o un trastorno que resulta en una

desfiguración o disfunción del tejido. Más específicamente, el paciente puede estar sufriendo una lesión o pérdida en el cerebro, médula espinal o nervios o un trastorno que resulte en una disfunción del cerebro, médula espinal o nervios; una lesión o pérdida en el corazón o los vasos sanguíneos o un trastorno que resulte en una disfunción del corazón o los vasos sanguíneos; una lesión o pérdida en el pulmón, tracto nasofaríngeo, senos nasales, tráquea o vías respiratorias o un trastorno que resulte en una disfunción del pulmón, tracto nasofaríngeo, senos nasales, tráquea o vías respiratorias; una lesión o pérdida en el tracto gastrointestinal, hígado o páncreas o un trastorno que resulte en una disfunción del tracto gastrointestinal, hígado o páncreas; una lesión o pérdida en un riñón, uréteres, vejiga o uretra o un trastorno que resulte en una disfunción del riñón, uréter, vejiga o uretra; una lesión o pérdida de hueso, cartílago, sinovial, menisco, ligamento, tendón o núcleo pulposo o un trastorno que resulte en disfunción de hueso, cartílago, sinovial, menisco, ligamento, tendón o núcleo pulposo; una lesión o pérdida de labios, lengua o encías o un trastorno que resulte en disfunción de labios, lengua o encías; una lesión o pérdida del tejido subcutáneo o un trastorno que resulte en disfunción del tejido subcutáneo.

La invención también puede describirse en términos de "uso", en cuyo caso abarca el "uso" de las composiciones descritas aquí, incluidos fragmentos de FN, derivados peptídicos de fragmentos de FN, complejos que contienen uno o más fragmentos de FN y/o derivados peptídicos de fragmentos de FN, incluidos aquellos con un GF enlazado, ácidos nucleicos que codifican los presentes fragmentos de FN y/o derivados peptídicos de fragmentos de FN, vectores de expresión, células huésped y productos de manipulación genética tisular, incluidos aquellos que contienen biomateriales, para promover la regeneración tisular y/o la reparación tisular. Por ejemplo, las presentes composiciones se pueden utilizar para promover la cicatrización de heridas o para la preparación de un medicamento para promover la regeneración de tejidos o la cicatrización de heridas. La regeneración o reparación del tejido puede dar como resultado una curación con poca o ninguna cicatriz, a diferencia de la curación habitual de heridas en adultos.

Tal como se utilizan aquí, "péptido de enlace al factor de crecimiento" (o "GFBP") y "péptido potenciador del factor de crecimiento" (o "GFEP") se utilizan como sinónimos.

Tal como se utiliza aquí, "tratamiento cosmético" se refiere al uso de una composición fisiológicamente aceptable para mejorar o mantener la apariencia de un individuo.

Como se detalla anteriormente, hemos descubierto, *inter alia*, que fragmentos específicos de fibronectina y péptidos derivados de la fibronectina pueden enlazar varios factores de crecimiento (por ejemplo, IGF-1, HGF, TGF- β 1, TGF- β 2, bFGF, FGF-7, PDGF-BB, VEGF-A o NGF), y los factores de crecimiento enlazados pueden retener o mostrar una actividad biológica potenciada/disminuida. La presente invención presenta composiciones que incluyen dichos fragmentos y péptidos, con o sin factores de crecimiento enlazados en las familias representadas (es decir, en las familias IGF, TGF, FGF, PDGF, VEGF y NGF), en diversas formulaciones y configuraciones. Los fragmentos y péptidos pueden promover la sinergia con los GF a los que los fragmentos o péptidos de FN no se enlazan. En una configuración, los fragmentos o péptidos de FN, o los complejos que contienen fragmentos o péptidos de FN/GF se pueden incorporar en matrices extracelulares bidimensionales o tridimensionales manipuladas genéticamente (que podemos abreviar aquí como engECM o denominar matrices sintéticas), y estas pueden incluir cualquiera de; o cualquier combinación de, los péptidos descritos aquí (por ejemplo, un péptido que se ajuste a las Fórmulas I) o variantes biológicamente activas de los mismos. El factor o factores de crecimiento incorporados pueden ser, por ejemplo, IGF-1, TGF- β 1, TGF- β 2, bFGF, FGF-7, PDGF-BB, VEGF-A o NGF; cualquier combinación o subcombinación de los mismos; u otro factor de crecimiento específico de la misma familia que los enumerados. Los factores de crecimiento se pueden agregar exógenamente a la formulación que contiene péptidos (por ejemplo, una matriz que contiene fragmentos de FN), o la formulación (por ejemplo, la matriz) se puede generar sin factores de crecimiento. En el último caso, cuando se colocan en la proximidad de un suministro endógeno de factores de crecimiento, estos pueden ser reclutados por la matriz. La matriz también puede reclutar células e inducir las a diferenciarse, producir tejido o proliferar (presumiblemente en virtud de la inclusión o reclutamiento de factores de crecimiento, aunque la invención no se limita a composiciones que funcionan mediante algún mecanismo particular).

La matriz puede incluir cualquier tipo de biomaterial (por ejemplo, un biopolímero). Por ejemplo, la matriz puede ser o puede incluir un hidrogel (por ejemplo, un hidrogel entrecruzado intramolecularmente). Los presentes péptidos y GF se pueden incorporar o asociar con muchos tipos diferentes de materiales (por ejemplo, hialuronano). La matriz puede tener, por ejemplo, un esqueleto principal de policarbonato o incluir poliuretanos biodegradables. Otros ejemplos de biopolímeros adecuados son: proteínas (por ejemplo, colágeno), macromoléculas que contienen proteínas (por ejemplo, proteoglicanos), seda (por ejemplo, una seda derivatizada), alginato, quitina y quitosano.

Para la preparación de composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de los péptidos presentes, para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos, los ingredientes activos (por ejemplo, el péptido solo o el péptido enlazado a GF(s)) se pueden incorporar solos o en combinación con otros agentes activos en composiciones adecuadas para la administración a un paciente. Las formulaciones se pueden realizar utilizando métodos rutinarios en la técnica y se puede proporcionar una guía particular mediante formulaciones anteriores de terapias a base de proteínas. Las composiciones serán fisiológicamente aceptables (es decir, sustancialmente

no tóxicas) y podrán formularse como medicamentos de prescripción o productos de venta libre. Los productos farmacéuticos o composiciones farmacéuticamente aceptables contienen compuestos (por ejemplo, polipéptidos), otros materiales (por ejemplo, diluyentes) y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico sólido, son adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una proporción beneficio/riesgo razonable.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos descritos aquí también pueden formularse para uso en cultivos celulares o administración a un paciente o sujeto. Dichas composiciones comúnmente incluyen un portador farmacéuticamente aceptable, y los portadores se contemplan en las presentes formulaciones. En las presentes composiciones se puede utilizar cualquier medio o agente convencional compatible con los ingredientes activos. Si bien las formulaciones y métodos de uso se describen más adelante, observamos aquí que está prevista la aplicación a pacientes humanos, así como también a animales (por ejemplo, animales domésticos, de granja o de exhibición). La invención se extiende a composiciones no fisiológicamente aceptables en el sentido de que se extiende a composiciones preparatorias y composiciones adecuadas para el almacenamiento (por ejemplo, soluciones madre concentradas y preparaciones congeladas o liofilizadas).

Las secuencias específicas descritas aquí se derivan de la fibronectina plasmática humana. Además, se pueden utilizar secuencias correspondientes (por ejemplo, fragmentos que tienen una secuencia correspondiente de cualquier isoforma de fibronectina de cualquier especie).

Con respecto a la función, los péptidos destacados pueden enlazar un factor de crecimiento polipeptídico, por ejemplo, PDGF-BB, con una afinidad de aproximadamente o al menos aproximadamente 1×10^{-6} – 1×10^{-7} (por ejemplo, aproximadamente o al menos aproximadamente 5×10^{-7} ; 1×10^{-8} ; 5×10^{-8} ; 1×10^{-9} ; o 5×10^{-9}). Alternativamente o además, los péptidos apoyan la supervivencia y/o proliferación de células nulas de FN secundaria a la actividad del factor de crecimiento intrínseco y/o a la actividad potenciadora del factor de crecimiento.

Aunque los solicitantes no desean limitarse a la teoría, los péptidos descritos aquí son útiles en el tratamiento del envejecimiento de la piel o el fotoenvejecimiento (por ejemplo, para el tratamiento de arrugas) y en otros tratamientos cosméticos en los que se ha demostrado que ciertos fragmentos derivados de la fibronectina promueven la supervivencia y proliferación de fibroblastos. Además, los péptidos descritos aquí pueden usarse para administrar factores de crecimiento que promuevan la supervivencia y proliferación de fibroblastos en sitios que necesitan tratamiento cosmético. Por ejemplo, los péptidos pueden incorporarse en parches transdérmicos o cualquier otro dispositivo para facilitar su administración con o sin factores de crecimiento.

Aunque los solicitantes no desean limitarse a la teoría, los péptidos descritos aquí son útiles en el tratamiento de heridas en la medida en que estimulan la supervivencia, proliferación y/o migración de fibroblastos. Además, los péptidos descritos aquí son útiles, por ejemplo, como componentes de dispositivos de administración de factores de crecimiento, tales como matrices extracelulares tridimensionales manipuladas genéticamente.

Modificaciones de péptidos:

Los fragmentos destacados y sus variantes biológicamente activas pueden modificarse de numerosas maneras. Por ejemplo, se pueden agregar agentes, incluidos residuos de aminoácidos adicionales, otros sustituyentes y grupos protectores, al terminal amino, al terminal carboxi o a ambos. La modificación puede realizarse con el propósito de alterar la forma de los fragmentos o alterar la manera en que los fragmentos se enlazan o interactúan entre sí, con fragmentos no idénticos o con otros polipéptidos. Si bien los péptidos de la presente invención pueden ser lineales o cíclicos, los péptidos cíclicos generalmente tienen una ventaja sobre los péptidos lineales en que su estructura cíclica es más rígida y, por lo tanto, su actividad biológica puede ser mayor que la del péptido lineal correspondiente (véase, en general, Camarero and Muir, *J. Am. Chem. Soc.* 121:5597-5598, 1999).

Se han descrito estrategias para la preparación de polipéptidos circulares a partir de precursores lineales y pueden emplearse con los presentes fragmentos. Por ejemplo, se puede utilizar un método de entrecruzamiento químico para preparar una versión ciclizada del esqueleto principal del péptido (Goldenberg and Creighton, *J. Mol. Biol.* 165:407-413, 1983). Otras metodologías incluyen métodos de ligadura intramolecular química (véase, por ejemplo, Camarero et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37:347-349, 1998; Tam and Lu, *Prot. Sci.*, 7: 1583-1592, 1998; Camarero and Muir, *Chem. Commun.*, 1997:1369-1370, 1997; y Zhang and Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 119:2363-2370, 1997) y métodos de ligadura intramolecular enzimática (Jackson et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117:819-820, 1995), que permiten que los péptidos sintéticos lineales se ciclen de manera eficiente bajo condiciones acuosas. Véase también Patente de Estados Unidos No. 7,105,341.

Alternativamente, o además, cualquiera de los fragmentos presentes puede incluir además uno o más sustituyentes. Por ejemplo, el fragmento puede incluir un sustituyente en el terminal amino, terminal carboxi y/o en una cadena lateral de un residuo de aminoácido reactivo. El sustituyente puede ser un grupo acilo o un grupo amina sustituido o no sustituido (por ejemplo, el sustituyente en el terminal N puede ser un grupo acilo y

el terminal C puede estar amidado con un grupo amina sustituido o no sustituido (por ejemplo, un grupo amino que tiene uno, dos o tres sustituyentes, que pueden ser iguales o diferentes)). El grupo amino puede ser un grupo alquilo inferior (por ejemplo, un alquilo que tiene entre 1-4 carbonos), alqueno, alquino o haloalquilo. El grupo acilo puede ser un grupo acilo inferior (por ejemplo, un grupo acilo que tiene hasta cuatro átomos de carbono), especialmente un grupo acetilo. El sustituyente puede ser un polímero no proteico, por ejemplo, un poliéter, un polietilenglicol (PEG), un polipropilenglicol o un polioxilalqueno, un polialquilenglicol (por ejemplo, polipropilenglicol (PPG), un polibutilenglicol (PBG) o un polímero de bloque/aleatorio PPG-PEG. El péptido puede modificarse mediante un polímero no proteico mediante métodos conocidos en la técnica y de la manera establecida en la Patente de Estados Unidos No. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337. La modificación (por ejemplo, PEGilación) puede estabilizar el péptido, reducir su antigenicidad, disminuir la dosificación requerida y/o aumentar su capacidad de direccionamiento.

El polímero no proteico puede variar en tamaño y forma. Por ejemplo, cualquiera de los polímeros no proteicos enumerados anteriormente (por ejemplo, PEG) puede ser lineal, ramificado o tener forma de peine. Respecto al tamaño, el peso molecular puede variar. Por ejemplo, el PEG puede tener un peso molecular de, por ejemplo, aproximadamente 300 kDa, aproximadamente 1,000 kDa, aproximadamente 2,000 kDa, aproximadamente 3,000 kDa, aproximadamente 4,000 kDa, aproximadamente 5,000 kDa, aproximadamente 6,000 kDa, aproximadamente 7,000 kDa, aproximadamente 8,000 kDa, aproximadamente 9,000 kDa, aproximadamente 10,000 kDa, aproximadamente 11,000 kDa, aproximadamente 12,000 kDa aproximadamente 13,000 kDa aproximadamente 14,000 kDa, aproximadamente 15,000 kDa, aproximadamente 20,000 kDa, aproximadamente 30,000 kDa, aproximadamente 40,000 kDa o aproximadamente 50,000 kDa. Por ejemplo, el PEG puede tener un peso molecular entre 300 kDa y 2000 kDa, 300 kDa y 3000 kDa, 1000 kDa y 2000 kDa y 1000 y 3000 kDa.

El polímero no proteico (por ejemplo, PEG) se puede enlazar al fragmento mediante cualquier número de químicas de grupos funcionales (por ejemplo, carboxilados-mPEG, p-nitrofenil-PEG, aldehído-PEG, amino-PEG, tiol-PEG, maleimida-PEG, aminoxi-PEG, hidrazina-PEG, tosil-PEG, yodoacetamida-PEG, succinimidilsuccinato-PEG, succinimidilglutarato-PEG, succinimidilcarboxipentil-PEG, p-nitrofenilcarbonato-PEG o etanotiol-PEG). El polímero no proteico (por ejemplo, PEG) se puede enlazar al fragmento a través de cualquier número de grupos químicos que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos con terminal amino, aminoácidos con terminal carboxi, aminas libres y grupos sulfhidrilo libres.

El polímero no proteico (por ejemplo, PEG) puede ser un PEG funcionalizado (por ejemplo, un PEG lineal activado monofuncional, un PEG lineal activado homobifuncional, un PEG lineal activado heterobifuncional, un PEG activado de múltiples brazos (por ejemplo, de 2 brazos, de 4 brazos, de 8 brazos, etc.), un PEG activado ramificado y un PEG activado en forma de peine).

Tal como se utiliza aquí, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada. Los grupos alquilo de ejemplo incluyen metilo (Me), etilo (Et), propilo (por ejemplo, n-propilo e isopropilo), butilo (por ejemplo, n-butilo, isobutilo, t-butilo), pentilo (por ejemplo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo) y similares. Un grupo alquilo puede contener de 1 a aproximadamente 20, de 2 a aproximadamente 20, de 1 a aproximadamente 10, de 1 a aproximadamente 8, de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4 o de 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono.

Como se utiliza aquí, "alqueno" se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen etenilo, propenilo y similares. "Alquino" se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquino incluyen etinilo, propinilo y similares. "Haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más sustituyentes halógenos. Los grupos haloalquilo de ejemplo incluyen CF₃, C₂F₅, CHF₂, CCl₃, CHCl₂, C₂Cl₅ y similares.

Tal como se utiliza aquí, "poliéter" se refiere a un polímero que contiene enlaces de éter. Los ejemplos incluyen polietilenglicol.

Los fragmentos, incluidos los fragmentos modificados descritos anteriormente, pueden ser resistentes a las proteasas y pueden incluir uno o más tipos de grupos protectores, tales como un grupo acilo, un grupo amida, un grupo bencilo o benzoilo, o un polietilenglicol. Más específicamente, un fragmento, incluidos los fragmentos modificados descritos anteriormente, puede estar acetilado en el terminal N y/o amidado en el terminal C.

Cuando se incluyen residuos de aminoácidos que no son de origen natural o modificados, se pueden seleccionar entre los siguientes o muchos otros disponibles en la técnica: 4-hidroxiprolina, ácido gamma-carboxiglutámico, o-fosfoserina, o-fosfotirosina o delta-hidroxisilina. Otros ejemplos incluyen naftilalanina, que puede ser sustituido por triptófano para facilitar la síntesis, L-hidroxipropilo, L-3,4-dihidroxifenilalanilo, alfa-aminoácidos como L-alfa-hidroxisililo y D-alfa-metilalanilo, L-alfa-metilalanilo, beta-aminoácidos e isoquinolilo. Los fragmentos que tienen residuos de aminoácidos que no son de origen natural pueden denominarse fragmentos sintéticos y constituyen un tipo de variante como se describe aquí. Otras variantes incluyen fragmentos en los que una cadena lateral natural de un residuo de aminoácido (en forma L o D) se reemplaza por una cadena lateral que no es de origen natural.

En una realización, los fragmentos pueden tener tres aminoácidos adicionales (MetGlySer) en cualquiera de los terminales (o en ambos) (por ejemplo, en el terminal N) y de siete a ocho aminoácidos adicionales (ThrSerHisHisHisHisHisCys) en cualquiera de los terminales (o en ambos) (por ejemplo, en el terminal C).

5 Para obtener orientación sobre la modificación de fragmentos por reducción/alquilación y/o acilación, se puede consultar Tarr, *Methods of Protein Microcharacterization*, J. E. Silver ed., Humana Press, Clifton N.J. 155-194, 1986; para obtener orientación sobre el acoplamiento químico a un portador apropiado, se puede consultar Mishell and Shiigi, eds., *Selected Methods in Cellular Immunology*, WH Freeman, San Francisco, Calif. (1980) y Patente de Estados Unidos No. 4,939,239; y para obtener orientación sobre el tratamiento suave con formalina, se puede consultar Marsh, *Int. Arch. of Allergy and Appl. Immunol.*, 41:199-215, 1971.

10 Cualquiera de los péptidos en las composiciones presentadas puede ser uno de una pluralidad presente en una forma multimérica (por ejemplo, un dímero). Estos multímeros pueden ser lineales o ramificados. La forma multimérica también puede incluir uno o más tipos de fragmentos y un esqueleto principal. Donde hay dos o más fragmentos, pueden ser idénticos o no idénticos. También puede estar presente una estructura más pequeña, denominada enlazador, que puede mediar la unión de los fragmentos al esqueleto principal.

15 Generalmente, el enlazador es más pequeño que el esqueleto principal. La naturaleza del esqueleto principal no es crítica y se pueden utilizar muchos tipos diferentes de moléculas. Un ejemplo de una estructura de enlazador es una molécula de oligolisina que tiene, por ejemplo, dos o más residuos de lisina (por ejemplo, 2, 3, 4 o más residuos de lisina). Dos o más fragmentos de la invención (por ejemplo, dos, tres o cuatro polipéptidos) pueden unirse a residuos de lisina mediante, por ejemplo, enlaces peptídicos. Estos fragmentos,

20 que tienen un enlazador de polilisina, pueden enlazarse a un esqueleto principal. Por ejemplo, la invención abarca:

Esqueleto principal-KKK HIGKYGLRWRPKGSV

y

HIGKYGLRWRPKGSVKKK-Esqueleto principal.

25 Un esqueleto principal, por ejemplo, una molécula de oligolisina, puede ser lineal o ramificada. Un péptido multimérico de la invención en una molécula de esqueleto principal ramificada puede denominarse aquí como un péptido "dendrimérico".

Cualquiera de los fragmentos descritos aquí, incluidas las formas variantes descritas aquí, puede incluir además un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que tiene una secuencia que no aparece en una fibronectina). El polipéptido heterólogo puede ser un polipéptido que aumenta la vida media circulante del fragmento al que está unido (por ejemplo, fusionado, como en una proteína de fusión). El polipéptido heterólogo puede ser una albúmina (por ejemplo, una albúmina sérica humana o una porción de esta) o una porción de una inmunoglobulina (por ejemplo, la región Fc de una IgG).

30

Los factores de crecimiento polipeptídicos que pueden ser enlazados por el FN descrito aquí pueden estar dentro de la familia del factor de crecimiento tipo insulina (IGF) (por ejemplo, IGF-1), dentro de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF) (por ejemplo, TGF- β 1 o TGF- β 2), dentro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, bFGF o FGF-7), dentro de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (por ejemplo, PDGF-BB), dentro de la subfamilia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, VEGF-A) o dentro de la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF). Para determinar si los fragmentos de fibronectina enlazan factores de crecimiento que han conservado una actividad biológica, se pueden llevar a cabo ensayos biológicos estándar. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos siguientes, se pueden llevar a cabo respuestas migratorias a factores de crecimiento enlazados que normalmente estimulan la migración. Por ejemplo, se puede comparar el efecto de un factor de crecimiento enlazado y no enlazado sobre la migración de fibroblastos o la formación de tejido de granulación.

35

40 Específicamente, si un factor de crecimiento es un PDGF (por ejemplo, PDGF-BB), se puede analizar la migración de células AHDF.

45

Los compuestos que imitan la conformación necesaria de los fragmentos de fibronectina descritos aquí se contemplan dentro del alcance de esta invención. Son posibles diversos diseños para tales miméticos. La Patente de Estados Unidos No. 5,192,746; Patente de Estados Unidos No. 5,169,862; Patente de Estados Unidos No. 5,539,085; Patente de Estados Unidos No. 5,576,423; Patente de Estados Unidos No. 5,051,448; y Patente de Estados Unidos No. 5,559,103, describen múltiples métodos para crear dichos compuestos.

50

Composiciones fisiológicamente aceptables:

Una composición farmacéutica presente está formulada para ser compatible con su vía de administración prevista, por ejemplo, oral o parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, por inhalación, transdérmica (tópica) y administración transmucosa). Dada la capacidad de los actuales fragmentos de FN y de los complejos que contienen GF que portan estos fragmentos para facilitar la cicatrización de heridas, se prevén especialmente formulaciones tópicas.

55

Las soluciones o suspensiones utilizadas para administración parenteral pueden incluir: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; reguladores como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La composición puede ser dividida en alícuotas o envasada en ampollas, jeringas desechables, viales de dosis única o múltiples hechos de vidrio o plástico, botellas y similares, y dichas formas envasadas, junto con las instrucciones de uso, están dentro del alcance de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones son estériles a un nivel médicamente aceptable en vista de la vía de administración prevista.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para inyección incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) y solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, las composiciones preparadas para la administración deben ser estériles y deben ser fluidas o convertibles a un fluido al menos suficiente para facilitar su administración mediante jeringa. La composición y/o las construcciones de ácidos nucleicos deben ser estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. Los conservantes contra microorganismos pueden incluir diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares.

El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

En muchos casos, será deseable que la composición sea isotónica a la sangre. Esto se puede lograr utilizando diversos agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición.

La absorción retardada o prolongada de las composiciones inyectables puede ser deseable y se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina, o recubriendo micro o nanopartículas de agente activo en la composición con materiales que retrasen o prolonguen la liberación de los componentes.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar, por ejemplo, solubilizando o suspendiendo el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes adicionales. Normalmente, la creación de dicha solución o suspensión va seguida de una filtración estéril. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes deseados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, la preparación se seca, por ejemplo, mediante secado bajo vacío y/o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica pueden incluir, pero no se limitan a, composiciones en forma de productos para el cuidado de la piel, limpieza de la piel o antiarrugas, champús, maquillaje, acondicionadores, lociones, aerosoles, geles, esponjados, colorantes o blanqueadores. Estas composiciones pueden contener uno o más aditivos o adyuvantes cosméticos o dermatológicos convencionales, incluyendo, pero no limitado a, agentes de relleno, tensioactivos, agentes tixotrópicos, antioxidantes, agentes conservantes, colorantes, pigmentos, fragancias, espesantes, vitaminas, hormonas, humectantes, protectores solares orgánicos que absorben los rayos UV, protectores solares inorgánicos que dispersan los rayos UV, agentes humectantes, polímeros catiónicos, aniónicos, no iónicos o anfóteros y sustancias activas para coloración del cabello. Estos adyuvantes son bien conocidos en el campo de la cosmética y se describen en numerosas publicaciones, véase por ejemplo Harry's Book of Cosmeticology, 8.sup.th edition, Martin Rieger, ed., Chemical Publishing, New York (2000). Composiciones de ejemplo se describen, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos Solicitud 2005008604, Patente de Estados Unidos Solicitud 20050025725 y Patente de Estados Unidos Solicitud 20040120918.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden incluir uno o más potenciadores de la penetración química (como se describe, por ejemplo, en la Publicación Internacional No. WO2005009510).

Los potenciadores de la penetración química de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, 1-dodecil pirrolidona, cloruro de bencil dimetil dodecil amonio, cocamidopropil betaína, cocamidopropil hidroxisultaina, oleil betaína, cineol, bromuro de cetil trimetil amonio, dodecil amina, cloruro de dodecil piridinio, sulfonato de hexadecil trimetil amoniopropano, miristato de isopropilo, ácido láurico, limoneno, ácido linoleico, ácido linoléico, mentol

(terpeno), laurato de metilo, 1-metil-2-pirrolidona, N-lauril sarcosina (Número CAS 137-16-6, también llamado lauroil sarcosinato de sodio), sulfato de nicotina, ácido oleico, bromuro de octil trimetil amonio, dodecil éter de polietilenglicol, 1-fenil piperazina, monolaurato de sorbitán, lauril éter sulfato de sodio, dodecil sulfato de sodio, oleato de sodio, octil sulfato de sodio, tetracaína y Tween-20™.

- 5 Los potenciadores de la penetración química aumentan la permeabilidad de la piel y son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Shah et al. "Skin Penetration Enhancement: Clinical pharmacological and regulatory considerations." Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement, ed. K. Walters. 1993, New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker. 417-427).

- 10 Los presentes péptidos pueden utilizarse en composiciones cosméticas ya sea como los propios péptidos o en forma de una premezcla en un excipiente adecuado y pueden utilizarse en forma de una solución, dispersión, emulsión, pasta o polvo. Pueden ser portados individualmente o con otras sustancias activas, incluidas pero no limitadas a las específicamente descritas aquí, por vectores cosméticos tales como macro-, micro- o nanocápsulas, liposomas o quilomicrones, macro-, micro- o nanopartículas o microesponjas. También pueden adsorberse en polímeros orgánicos en polvo, talcos, bentonitas y otros portadores inorgánicos.

- 15 Los péptidos pueden ser utilizados en cualquier forma o en forma enlazada, incorporada, absorbida o adsorbida sobre macro-, micro- y nanopartículas, macro-, micro- y nanocápsulas para el tratamiento de textiles, fibras sintéticas o naturales, lanas y todos los materiales susceptibles de ser utilizados en la fabricación de prendas de vestir o ropa interior de día o de noche, destinadas al contacto con la piel, tales como panti, ropa interior, pañuelos y toallitas, con el fin de ejercer un efecto cosmético a través del contacto entre el textil y la piel y
20 permitir una administración tópica continua.

- Los péptidos se pueden utilizar en composiciones tópicas (por ejemplo, composiciones terapéuticas o cosméticas) en concentraciones que oscilan entre 0.00001 % (p/p) ("p/p" es peso/peso) y 10 % (p/p) (por ejemplo, entre aproximadamente 0.0001 % (p/p) y 1 % (p/p)). Otro intervalo útil es de aproximadamente 0.001 % a aproximadamente 5 % (p/p). Los péptidos también pueden usarse en el intervalo de aproximadamente 1
25 ppm a aproximadamente 500 ppm (por ejemplo, aproximadamente 100 a aproximadamente 400 ppm).

- Las composiciones para administración oral normalmente incluyen un diluyente inerte o comestible o un portador comestible. Estas composiciones se pueden formular de diversas maneras, por ejemplo, en forma líquida, de cápsulas o de comprimidos. Se pueden incluir agentes aglomerantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos
30 y similares pueden contener uno o más de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un agente aglomerante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o
35 sabor de naranja.

Para administración por inhalación (por ejemplo, para aplicación a tejidos heridos, tales como mucosas, dentro de los conductos nasales, nasofaringe, tráquea o pulmones), las presentes composiciones se administran en forma de un aerosol húmedo o seco, por ejemplo, desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

- 40 La administración sistémica también puede realizarse por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, normalmente se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear. En la técnica se conocen generalmente varios de estos penetrantes, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración también puede facilitarse mediante iontoforesis, microagujas y otros dispositivos
45 diseñados para potenciar la penetración transdérmica.

La administración transmucosa se puede lograr mediante el uso de aspersores nasales o supositorios (por ejemplo, utilizando bases de supositorios convencionales como manteca de cacao y otros glicéridos). Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

- 50 Estas composiciones también pueden formularse con portadores que protegerán las composiciones contra la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, como etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, policarbonatos y ácido poliláctico. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, de Alza Corporation y Nova
55 Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluidos los liposomas direccionados a células particulares (por ejemplo, direccionados a células infectadas) con anticuerpos monoclonales) también pueden usarse para preparar composiciones farmacéuticas. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos

conocidos por las personas experimentadas en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4,522,811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación tal como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones de las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se desea lograr, y de las limitaciones inherentes a la técnica de preparación de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos. En una realización de los fragmentos de fibronectina y derivados peptídicos de fragmentos de fibronectina de la invención, la forma unitaria de dosificación es de aproximadamente 0.1 a 5 mg de péptido liofilizado o derivado peptídico. En otra realización de los fragmentos de fibronectina y derivados peptídicos de fragmentos de fibronectina de la invención, la forma unitaria de dosificación es de aproximadamente 1 mg de péptido liofilizado o derivado peptídico.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos activos y las composiciones farmacéuticas se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación. Por ejemplo, estos procedimientos se aplican rutinariamente para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD50/ED50. Generalmente se prefieren los compuestos que muestran grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios con animales (incluidos los descritos en los ejemplos a continuación) se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos u otros sujetos previstos. La dosificación de dichos compuestos generalmente se selecciona para producir un intervalo de concentraciones circulantes que incluyan la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Así, por ejemplo, se puede establecer inicialmente una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la EC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una respuesta media de la máxima) determinada en el cultivo celular. Esta información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento o mediante otro método de análisis adecuado adaptado al compuesto de interés.

Como se señaló, los péptidos (por ejemplo, péptidos sintéticos o producidos de forma recombinante) con actividad de enlace y/o potenciación/inhibición de factores de crecimiento se pueden incorporar a un producto tisular manipulado genéticamente. También se pueden incluir dominios FN que promueven la migración de fibroblastos. Preferiblemente, los productos son robustos (es decir, relativamente resistentes a la degradación rápida). Se pueden utilizar, por ejemplo, en el tratamiento de heridas, incluidas las agudas o que no cicatrizan (por ejemplo, úlceras crónicas). Los pacientes que pueden someterse al tratamiento se describen más adelante. Como alternativa o adicionalmente, los péptidos que se enlazan y/o mejoran los factores de crecimiento se pueden ligar a un polímero biocompatible para administrar uno o más factores de crecimiento a una célula, tejido u órgano que necesita tratamiento o para la localización endógena de factores de crecimiento. Como alternativa o además, se pueden incorporar péptidos que se enlazan y/o potencian factores de crecimiento en un biomaterial polimérico o no polimérico para su liberación controlada en una herida aguda o que no cicatriza.

Hemos desarrollado un ECM manipulado genéticamente que es conductor e inductor de la formación de tejido nuevo en heridas cutáneas porcinas utilizando los dominios moleculares C, H y HV o péptidos de adhesión celular de la proteína sanguínea fibronectina (FN) ligados a un hidrogel de hialuronano (HA) entrecruzado intramolecularmente. Por lo tanto, en una implementación, la invención incluye un ECM manipulado genéticamente que incluye un fragmento de una fibronectina (por ejemplo, una fibronectina plasmática) o una variante biológicamente activa de la misma. El fragmento puede estar ligado a (por ejemplo, enlazado de forma covalente o no covalente) un hidrogel (por ejemplo, un hidrogel de HA) y puede ser un fragmento que enlaza y/o potencia un factor de crecimiento polipeptídico. El fragmento se puede ligar de acuerdo con los métodos de fijación discutidos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20050282747.

La ECM de origen natural se compone de diversos componentes, como glicoproteínas, proteoglicanos, carbohidratos complejos y otras moléculas. Las principales funciones de la ECM incluyen, pero no se limitan a, proporcionar soporte estructural, resistencia a la tracción o amortiguación; proporcionar sustratos y vías para adhesión celular y migración celular; y regular la diferenciación celular y función metabólica. Las proteínas ECM incluyen, por ejemplo, colágenos, elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanos, vitronectina, trombospondina, tenascina (citoactina), entactina (nidogen), osteonectina (SPARC), ancorina CII, condronectina, proteína de enlace, osteocalcina, sialoproteína ósea, osteopontina, epinectina, hialuronectina, componente amiloide P, fibrilina, merosina, s-laminina, undulina, epiligrina y kalinina.

El producto de manipulación genética tisular presentado (por ejemplo, la ECM manipulada genéticamente) puede incluir componentes biológicos y/o sintéticos. Puede incluir un biopolímero (por ejemplo, hialuronano (HA), un glicosaminoglicano (GAG), fibrinógeno, laminina o colágeno). El polímero biocompatible puede ser un polímero biodegradable sintético, muchos de los cuales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polímero biodegradable puede ser un poli(láctido), un poli(glicolido), un poli(láctido-coglicolido), un poli(ácido láctico), un poli(ácido glicólico), un poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), una poli(caprolactona), un policarbonato, una poliésteramida, un polianhídrido, un poli(aminoácido), un poli(ortoéster), un policianoacrilato, una poliamida, un poliacetato, un poli(éter éster), un copolímero de poli(etilenglicol) y un poli(ortoéster), una poli(dioxanona), un poli(alquilato de alquilenos), un poliuretano biodegradable o cualquier mezcla o copolímero de los mismos. Otros polímeros útiles incluyen un polímero de alginato y un polímero de carboxivinilo (por ejemplo, un polímero que incluye al menos un 90 % de monómeros de ácido acrílico y aproximadamente entre un 0.1 % y aproximadamente un 5.0 % de un agente de entrecruzamiento difuncional).

Una matriz "inteligente" de tejidos modificados genéticamente que sería conductora e inductora de la repoblación de células tisulares en un sitio de herida y del desarrollo de tejido nuevo, respectivamente, puede estar compuesta de GF, o fragmentos activos de los mismos, en el contexto de un ECM apropiado que se requiere para una reparación óptima de la herida. Además, el o los dominios de enlace GF de FN pueden proporcionar una herramienta útil para la manipulación genética de muchos otros sistemas de localización de GF (de fuentes endógenas o exógenas) y/o administración para la reparación, aumento y regeneración de tejidos blandos o duros. Además, los péptidos de enlace al factor de crecimiento FNNN o los derivados modificados genéticamente molecularmente de los dominios de enlace de GF FN y VN podrían volverse fuertemente inhibidores de la actividad del GF y, por lo tanto, útiles para trastornos proliferativos o fibróticos como el cáncer, fibrosis pulmonar, estenosis GI o GU, contracturas por quemaduras y esclerosis de origen autoinmune.

La engECM se puede generar con o sin factores de crecimiento, o fragmentos activos de los mismos (por ejemplo, factores de crecimiento y fragmentos descritos aquí). En el primer caso, la dosificación de factores de crecimiento en el engECM puede variar, por ejemplo, como se describe a continuación, 100 ng/ml (15 ng en total por herida) de PDGF-BB añadidos a 2:1 ECM manipulada genéticamente que potenció la formación de granulación a los 4 días después de la lesión y aplicación del material. En el último caso, cuando se colocan en la proximidad de un suministro endógeno de factores de crecimiento, estos pueden ser reclutados por la matriz.

La invención abarca además moléculas de ácido nucleico, incluidas moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos descritos aquí. Las moléculas de ácido nucleico pueden formularse en composiciones fisiológicamente aceptables para su administración. La invención también presenta vectores que incluyen los presentes constructos de ácidos nucleicos. De particular beneficio son los vectores de expresión, especialmente aquellos para la expresión en células eucariotas. Dichos vectores pueden ser, por ejemplo, vectores virales, plasmídicos, cósmidos o de cromosomas artificiales (por ejemplo, cromosomas artificiales de levadura). Normalmente, los plásmidos son elementos de ADNds circulares que incluyen uno o más sitios de clonación para la inserción de secuencias de ADN seleccionadas, por ejemplo, secuencias codificantes. Dichos plásmidos pueden incluir un origen de replicación funcional y, por lo tanto, son competentes para la replicación, o pueden ser defectuosos para la replicación.

Además de los plásmidos, también se pueden utilizar con ventaja vectores virales (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados). Se ha desarrollado un gran número de estos vectores virales que tienen una amplia variedad de propiedades diferentes. Por ejemplo, dichos vectores virales pueden ser retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados. Se proporcionan técnicas y procedimientos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células in vitro o in vivo con dichos virus en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio estándar. Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM, que son bien conocidos por las personas experimentadas en la técnica. Ejemplos de líneas de virus de envasado adecuadas son psi.Crip, psi.Cre, psi.2 y psi.Am. El genoma del adenovirus se puede manipular de manera que codifique y exprese un constructo de ácido nucleico, como se describe aquí, pero se inactiva en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. (véase, por ejemplo, Berkner et al., BioTechniques 6:616, 1988; Rosenfeld et al., Science 252:431-434, 1991; y Rosenfeld et al., Cell 68:143-155, 1992). Las personas experimentadas en la técnica conocen bien los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.). Alternativamente, un vector de virus adenoasociado como el descrito en Tratschin et al. (Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260, 1985) se puede utilizar para expresar una proteína de fusión transactivadora. Otras alternativas de vectores virales incluyen los vectores lentivirales. Dichos vectores y su preparación y uso se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6,924,123; 6,863,884; 6,830,892; 6,818,209; 6,808,923; 6,799,657.

Los vectores de la invención pueden incluir ventajosamente un fragmento de polipéptido descrito aquí. Otros elementos incluidos en el diseño de un vector de expresión particular pueden depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de

expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir de ese modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas de fusión o péptidos, codificados por ácidos nucleicos como se describe aquí.

Los vectores descritos aquí pueden introducirse en células o tejidos mediante una cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1992). Véase también, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Hitt et al., "Construction and Propagation of Human Adenovirus Vectors," in *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Ed. J. E. Celis., Academic Press. 2nd Edition, Volume 1, pp: 500-512, 1998; y Hitt et al., "Techniques for Human Adenovirus Vector Construction and Characterization," in *Methods in Molecular Genetics*, Ed. K. W. Adolph, Academic Press, Orlando, Fla., Volume 7B, pp: 12-30, 1995. Los métodos incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. El término "transfectando" o "transfección" pretende abarcar todas las técnicas convencionales para introducir ácido nucleico en células huésped, incluidas la coprecipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAF-dextrano, lipofección, electroporación y microinyección. Se pueden encontrar métodos adecuados para transfectar células huésped en Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)) y otros libros de texto de laboratorio.

Para las células de plantas, a menudo se utiliza un plásmido Ti o un vector viral. Por ejemplo, dichos plásmidos y vectores virales se pueden utilizar para transfectar células de plantas huésped a través de la transfección mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (para células de plantas susceptibles a la infección por *A. tumefaciens*), o se pueden insertar directamente en las células, por ejemplo, mediante microinyección, bombardeo de partículas o electroporación. En otros métodos, se pueden fabricar protoplastos a partir de células de plantas y luego transfectarlos.

El número de células huésped transformadas con un constructo de ácido nucleico de la invención dependerá, al menos en parte, del tipo de vector de expresión recombinante y del tipo de técnica de transfección utilizada. El ácido nucleico se puede introducir en una célula huésped de forma transitoria o para su expresión a largo plazo. Para la expresión a largo plazo, el ácido nucleico se integra de forma estable en el genoma de la célula huésped o permanece como un elemento episomal estable.

Para la integración del ácido nucleico en el ADN de la célula huésped, normalmente se utiliza un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a un fármaco) que se introduce en las células huésped junto con el ácido nucleico de interés. Se utilizan comúnmente una variedad de estos marcadores seleccionables, como los fármacos higromicina y neomicina. Los marcadores seleccionables se pueden introducir en un plásmido separado u otro vector del ácido nucleico de interés o se introducen en el mismo vector. Las células huésped transfectadas con un constructo de ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un vector de expresión recombinante) y un gen para un marcador seleccionable se pueden identificar seleccionando células que utilizan el marcador seleccionable.

Los presentes constructos de ácidos nucleicos se pueden introducir en células eucariotas que crecen en cultivo *in vitro* mediante técnicas de transfección convencionales (por ejemplo, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, electroporación y otros métodos). Las células también pueden transfectarse *in vivo*, por ejemplo, mediante la aplicación de un mecanismo de administración adecuado para la introducción de ácido nucleico en células *in vivo*, como vectores virales (véase, por ejemplo, Ferry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381, 1991, y Kay et al., *Human Gene Therapy* 3:641-647, 1992), vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Rosenfeld, *Cell* 68:143-155, 1992; y Herz and Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2812-2816, 1993), captación de ADN mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 263:14621, 1988; Wilson et al., *J. Biol. Chem.* 267:963-967, 1992; y Patente de Estados Unidos No. 5,166,320), inyección directa de ADN (véase, por ejemplo, Acsadi et al., *Nature* 332:815-818, 1991; y Wolff et al., *Science* 247:1465-1468, 1990) o bombardeo de partículas (véase, por ejemplo, Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4455-4459, 1993; y Zelenin et al., *FEES Letters* 315:29-32, 1993). Así, en la presente invención, las células pueden transfectarse *in vitro* o *ex vivo*, y el péptido expresado puede aislarse de las mismas mediante métodos conocidos en la técnica. Las células también pueden administrarse a un sujeto o, alternativamente, las células pueden modificarse directamente *in vivo*. En cualquiera de estas situaciones, el constructo de ácido nucleico utilizado para expresar el péptido puede incluir una secuencia señal para facilitar la exportación desde la célula.

Otro aspecto de la invención se refiere a células huésped en las que se ha introducido un constructo de ácido nucleico de la invención, es decir, una "célula huésped recombinante". Se entiende que el término "célula huésped recombinante" se refiere no sólo a la célula en cuestión, sino a la progenie o progenie potencial de dicha célula.

Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún así está incluida dentro del alcance del término tal como se utiliza aquí.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota, aunque se prefieren las células eucariotas. Las células eucariotas de ejemplo incluyen células de mamíferos (como las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células COS). Se conocen en la técnica otras células huésped adecuadas.

5 No se pretende que la presente invención esté limitada por la naturaleza particular de la preparación terapéutica, siempre que la preparación comprenda un fragmento apropiado de fibronectina que enlaza a un factor de crecimiento polipeptídico o que tenga actividad intrínseca de factor de crecimiento o de supervivencia o un fragmento apropiado de un factor de crecimiento que enlaza fibronectina. Por ejemplo, dichas composiciones pueden proporcionarse junto con portadores líquidos, en gel o sólidos, diluyentes, adyuvantes y/o excipientes fisiológicamente tolerables.

10 Estas preparaciones terapéuticas pueden administrarse a mamíferos para uso veterinario, como por ejemplo animales domésticos, y para uso clínico en humanos de manera similar a otros agentes terapéuticos. En general, la dosificación requerida para la eficacia terapéutica variará de acuerdo con el tipo de uso y modo de administración, así como los requisitos particulares de cada huésped.

15 Estas composiciones se preparan normalmente como soluciones o suspensiones líquidas o en formas sólidas. Las formulaciones pueden incluir aditivos normalmente empleados tales como agentes aglomerantes, agentes de relleno, portadores, conservantes, agentes estabilizadores, emulsionantes, reguladores y excipientes como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, y típicamente
20 contienen entre 1 %-95 % de ingrediente activo, preferiblemente entre 2 %-70 %.

Las composiciones también se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección.

25 Los fragmentos de la presente invención a menudo se mezclan con diluyentes o excipientes que son fisiológicamente tolerables y compatibles. Los diluyentes y excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, las composiciones pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes estabilizadores o reguladores de pH.

30 Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración, como la administración tópica, incluyen ungüentos, tinturas, cremas, lociones y, en algunos casos, supositorios. Para ungüentos y cremas, los aglomerantes, portadores y excipientes tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos.

Métodos de uso:

35 Los fragmentos de fibronectina y derivados peptídicos de fragmentos de fibronectina descritos aquí son útiles para promover la regeneración de tejidos, por ejemplo, la cicatrización de heridas, y en formulaciones cosméticas y terapéuticas para la prevención y tratamiento de la mala apariencia de la piel relacionada, por ejemplo, con el envejecimiento. También se describe su uso en cultivo celular. Los polipéptidos (o ácidos nucleicos o vectores de expresión que los codifican o células que los expresan) se pueden incorporar, por ejemplo, en formulaciones terapéuticas para las indicaciones descritas aquí, así como en productos y
40 composiciones para mejorar, por ejemplo, la apariencia de la piel y/o la sensación de la piel que muestra signos de envejecimiento cutáneo.

Por ejemplo, las composiciones de la presente invención son útiles para regular la apariencia de la piel debido a las arrugas y al fotodaño UVB al proporcionar una mejora visual en la apariencia de la piel después de la aplicación de la composición a la piel. En términos generales, las composiciones de la presente invención que
45 además contienen materiales particulados serán más útiles para proporcionar una mejora visual inmediata.

La invención presenta tratamientos cosméticos que incluyen aquellos para regular profilácticamente una condición de la piel y aquellos para regular terapéuticamente una condición de la piel. "Signos de envejecimiento de la piel", "mala apariencia de la piel" y otras frases similares que se refieren, por ejemplo, a síntomas de envejecimiento y similares incluyen, pero no se limitan a, todas las manifestaciones externas perceptibles visiblemente y táctilmente, así como cualquier otro efecto macro o micro debido al envejecimiento de la piel. Estos signos pueden ser inducidos o causados por factores intrínsecos y/o extrínsecos, por ejemplo, envejecimiento cronológico y/o daño ambiental (por ejemplo, fotodaño UVB, exposición a contaminantes y mala alimentación). Estos signos pueden ser resultado de procesos que incluyen, pero no se limitan a, el desarrollo de discontinuidades texturales como arrugas y arrugas profundas gruesas, líneas de la piel, grietas,
50 protuberancias, poros grandes (por ejemplo, asociados con estructuras anexas como conductos de glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas o folículos pilosos), o irregularidades o asperezas, pérdida de elasticidad de la piel (pérdida y/o inactivación de la elastina funcional de la piel), flacidez (incluida la hinchazón en el área de los ojos y la papada), pérdida de firmeza de la piel, pérdida de tirantez de la piel, pérdida de la elasticidad de
55

la piel por deformación, decoloración (incluidas las ojeras), manchas, palidez, regiones cutáneas hiperpigmentadas como manchas de la edad y pecas, queratosis, diferenciación anormal, hiperqueratinización, elastosis, degradación del colágeno y otros cambios histológicos en el estrato córneo, dermis, epidermis, sistema vascular de la piel (por ejemplo, telangiectasia o vasos aracniformes) y los tejidos subyacentes, especialmente los próximos a la piel. Particularmente preferidos de acuerdo con la presente invención, los signos del envejecimiento de la piel son las arrugas y las composiciones de la presente invención son, en ciertas realizaciones preferidas, útiles para combatir, tratar o prevenir las arrugas.

Las arrugas pueden deberse a numerosas causas. Por ejemplo, las arrugas pueden ser causadas por el proceso natural de envejecimiento de la piel, por fumar y por la exposición a la radiación ultravioleta (por ejemplo, la exposición crónica al sol). Las arrugas se pueden clasificar como se describe en Kligman et al. (Br. J. Derm. 113:37-42, 1985), Kligman clasifica las arrugas en tres clases: arrugas lineales, arrugas glíficas y grietas, y cualquiera de estos tipos de arrugas, independientemente de su causa, puede tratarse como se describe aquí. Aparte de las arrugas en sí, las presentes composiciones se pueden utilizar para mejorar el aspecto de la piel.

Los métodos divulgados aquí son útiles para prevenir, tratar o reducir las arrugas, incluidas las arrugas inducidas por rayos UV, y/o para mejorar la calidad y la apariencia de la piel en un sujeto. Los métodos pueden llevarse a cabo administrando al sujeto una composición que contenga un fragmento de fibronectina o una variante biológicamente activa del mismo. Un método de tratamiento de ejemplo puede incluir localizar una arruga o un sitio potencial de arrugamiento y aplicar una composición descrita aquí.

Tal como se utiliza aquí, la regulación profiláctica de una afección de la piel incluye retrasar, minimizar y/o prevenir discontinuidades visibles y/o táctiles en la piel (por ejemplo, irregularidades en la textura de la piel que pueden detectarse visualmente o al tacto), incluidos los signos del envejecimiento de la piel.

Tal como se utiliza aquí, la regulación terapéutica del estado de la piel incluye mejorar, por ejemplo, disminuir, minimizar y/o borrar, discontinuidades en la piel, incluidos los signos del envejecimiento cutáneo. Algunos de los productos elaborados utilizando las composiciones de la presente invención y, de hecho, las propias composiciones pueden utilizarse para regular profiláctica o terapéuticamente una afección de la piel.

En ciertos aspectos preferidos, la presente invención es útil para mejorar el estado fisiológico y/o la apariencia física de la piel humana, en particular para reducir los signos de envejecimiento de la piel que se generan por la exposición al sol (por ejemplo, fotodaño UVB), estrés físico y hormonal, abrasión, efectos nutricionales y otras causas similares. Las composiciones pueden utilizarse a menudo para prevenir los signos del envejecimiento y/o tratarlos con el fin de proporcionar al consumidor que las utiliza una apariencia más juvenil.

Todos los términos como "envejecimiento de la piel", "signos de envejecimiento de la piel", "mala apariencia de la piel", "aplicación tópica" y similares se utilizan en el sentido en el que se utilizan general y ampliamente en la técnica de desarrollo, prueba y comercialización de productos cosméticos y de cuidado personal. "Arrugas" son surcos en la superficie lisa de la piel del rostro, visibles a simple vista, con una profundidad promedio de 50 a más de 200 μm y que aparecen esencialmente con la edad progresiva. El término "composición cosmética" de acuerdo con la presente invención se relaciona con una formulación que puede utilizarse con fines cosméticos, fines de higiene o como base para la administración de uno o más ingredientes farmacéuticos. Esto incluye cosméticos, productos de cuidado personal y preparaciones farmacéuticas. También es posible que estas formulaciones se utilicen para dos o más de los mismos propósitos al mismo tiempo. Un champú anticasca medicinal, por ejemplo, tiene propiedades farmacológicas y se utiliza como producto de cuidado personal para dejar el cabello limpio. Estas composiciones también pueden incluir ingredientes adicionales tales como un portador dermatológicamente aceptable.

"Cosméticos", tal como se utiliza aquí, incluyen, sin limitación, lápiz labial, rímel, colorete, base, rubor, delineador de ojos, delineador de labios, brillo de labios, polvos faciales o corporales, protectores y bloqueadores solares, esmaltes de uñas, esponjados, aspersores, geles para peinar, acondicionadores de uñas, ya sea en forma de cremas, lociones, geles, ungüentos, emulsiones, coloides, soluciones, suspensiones, compactos, sólidos, lápices, formulaciones por aspersión, formulaciones para aplicar con pincel y similares. Los "productos de cuidado personal" incluyen, sin limitación, geles de baño y ducha, champús, acondicionadores, enjuagues en crema, tintes para el cabello y productos colorantes, acondicionadores sin enjuague, protectores solares y bloqueadores solares, bálsamos labiales, acondicionadores de piel, cremas frías, humectantes, aspersores para el cabello, jabones, exfoliantes corporales, exfoliantes, astringentes, depilatorios y soluciones para ondulación permanente, formulaciones anticasca, composiciones antisudor y antitranspirantes, productos para el afeitado, antes y después del afeitado, humectantes, desodorantes, cremas frías, limpiadores, geles para la piel, enjuagues, ya sea en forma sólida, en polvo, líquida, crema, gel, ungüento, loción, emulsiones, coloides, soluciones, suspensiones u otra forma. Las "preparaciones farmacéuticas" de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, portadores para fines dermatológicos, incluida la aplicación tópica y transdérmica de ingredientes farmacéuticamente activos. Estos pueden presentarse en forma de geles, parches, cremas, aspersores nasales, ungüentos, lociones, emulsiones, coloides, soluciones,

suspensiones, polvos y similares. Las composiciones de acuerdo con la invención incluyen cosméticos, productos de cuidado personal y preparaciones farmacéuticas.

5 La invención presenta métodos para promover la regeneración de tejidos, incluyendo, por ejemplo, la cicatrización de heridas. Tal como se utiliza aquí, la regeneración tisular se utiliza para referirse al reemplazo de tejido dañado por la proliferación y diferenciación de células en un tejido. El daño tisular puede ocurrir por cualquier medio, incluidas lesiones físicas, enfermedades e infecciones. Como se describe aquí, "cicatrización de heridas" se utiliza como un ejemplo no limitativo de regeneración de tejidos.

10 El objetivo principal en el tratamiento de heridas es lograr el cierre de la herida. Las heridas cutáneas abiertas representan una categoría importante de heridas e incluyen heridas por quemaduras térmicas y/o químicas, úlceras neuropáticas, úlceras por presión, úlceras por estasis venosa y úlceras diabéticas. Las heridas cutáneas abiertas cicatrizan rutinariamente mediante un proceso que comprende seis componentes principales: i) inflamación, ii) proliferación de fibroblastos, iii) proliferación de vasos sanguíneos, iv) síntesis de tejido conectivo, v) epitelización, y vi) contracción de la herida. La cicatrización de heridas se ve afectada cuando estos componentes, ya sea individualmente o en conjunto, no funcionan correctamente. Numerosos factores pueden afectar la cicatrización de heridas, entre ellos la desnutrición, infección, agentes farmacológicos (por ejemplo, actinomicina y esteroides), diabetes y edad avanzada (ver Hunt and Goodson en Current Surgical Diagnosis & Treatment (Way; Appleton & Lange), pp. 86-98, 1988).

20 El término "herida" se refiere ampliamente a lesiones en la piel y el tejido subcutáneo iniciado de diferentes maneras (por ejemplo, úlceras por presión por reposo prolongado en cama y heridas inducidas por traumatismos) y con características variables, así como a lesiones en otros tejidos y huesos, incluidos tejidos y huesos en cercanía de un sitio de herida primaria. Por supuesto, las heridas también pueden producirse quirúrgicamente o por una enfermedad (por ejemplo, cáncer). Las heridas pueden clasificarse en uno de cuatro grados dependiendo de la profundidad de la herida: i) Grado I: heridas limitadas al epitelio; ii) Grado II: heridas que se extienden a la dermis; iii) Grado III: heridas que se extienden al tejido subcutáneo; y iv) Grado IV (o heridas de espesor total): heridas en donde los huesos están expuestos (por ejemplo, un punto de presión óseo como el trocánter mayor o el sacro). El término "herida de espesor parcial" se refiere a heridas que abarcan los grados I-III; ejemplos de heridas de espesor parcial incluyen heridas por quemaduras térmicas o químicas, úlceras por presión, úlceras por estasis venosa y úlceras diabéticas. El término "herida profunda" incluye tanto las heridas de grado III como las de grado IV. La presente invención contempla el tratamiento de todo tipo de heridas, incluidas heridas profundas y heridas crónicas.

35 Las frases "promover la cicatrización de heridas", "potenciar/mejorar la cicatrización de heridas" y similares se refieren a la inducción de la formación de tejido de granulación y/o la inducción de epitelización (es decir, la generación de nuevas células en el epitelio) y/o la reducción de la cicatrización. La cicatrización de heridas se mide convenientemente disminuyendo el área de la herida. No se pretende que frases como "promover la cicatrización de heridas" o "potenciar/mejorar la cicatrización de heridas" requieran una comparación cuantitativa con controles. En el caso del tratamiento de una herida crónica, es suficiente que la evidencia de curación de la herida comience después del tratamiento. Muchas heridas traumáticas y extirpaciones de cáncer deben dejarse abiertas para que cicatricen por segunda intención, y los pacientes que tienen dichas heridas y extirpaciones pueden tratarse con las composiciones descritas aquí que promueven la cicatrización de heridas.

40 La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" de los fragmentos de fibronectina o derivados peptídicos de fragmentos de fibronectina de la invención, cuando se refiere a la cicatrización de heridas, la promoción de la cicatrización de heridas o la mejora de la cicatrización de heridas es aquella cantidad que promueve la inducción de la formación de tejido de granulación y/o la inducción de la epitelización y/o la reducción de la cicatrización. Por ejemplo, los fragmentos de fibronectina o los derivados peptídicos de los fragmentos de fibronectina de la invención se pueden utilizar para promover la cicatrización de heridas en formulaciones intravenosas en una cantidad de aproximadamente 0.1 µg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente; en algunas realizaciones, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente; en algunas realizaciones, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 0.1 mg/kg de peso corporal del paciente; en algunas realizaciones, de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente; y en algunas realizaciones, de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 0.1 mg/kg de peso corporal del paciente.

55 La incidencia de heridas crónicas, a veces denominadas heridas que no cicatrizan, está aumentando debido a eventos tales como el envejecimiento de las poblaciones, un aumento de las enfermedades relacionadas con la edad en esas poblaciones, un aumento en la incidencia del SIDA, un aumento en la incidencia de la diabetes y un aumento de las heridas por radiación secundarias a la intervención del cáncer. Los pacientes que presentan heridas crónicas, incluidas aquellas asociadas a los eventos recién descritos, pueden ser tratados con las composiciones descritas aquí que promueven la cicatrización de heridas.

60 Las presentes composiciones se pueden utilizar en lugar de o para complementar los procedimientos existentes para el cuidado de heridas, tales como injertos de piel y colgajos de tejido, desbridamiento y la administración de medicamentos antiinflamatorios, antibacterianos y/o antidolor. Los pacientes que pueden recibir tratamiento

incluyen aquellos que tienen ulceraciones dérmicas crónicas, como puede ocurrir en asociación con la diabetes. Sin embargo, las úlceras diabéticas son sólo una parte del cuadro de las heridas crónicas. Se estima que 5.5 millones de personas en los Estados Unidos tienen heridas crónicas que no cicatrizan.

5 Los métodos de la invención incluyen una etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un fragmento peptídico de fibronectina, o una variante biológicamente activa del mismo, como se describe aquí. El fragmento peptídico de fibronectina, o la variante biológicamente activa de la misma, puede estar presente en un complejo con uno o más factores de crecimiento. Los métodos pueden incluir opcionalmente una etapa de identificación de un paciente que necesita tratamiento. Dichos pacientes incluyen pacientes que sufren una extirpación quirúrgica o incisión de la piel, 10 mucosa, tejido conectivo subyacente, fascia, nervio o músculo; pacientes que sufren una laceración traumática o pérdida de tejido de la piel, mucosa, tejido conectivo subyacente, fascia, nervio, músculo o hueso; y pacientes que sufren una quemadura o ulceración térmica o química de la piel, mucosa, tejido conectivo subyacente, fascia, nervio o músculo.

15 Se describen aquí formulaciones adecuadas y, generalmente, toman la forma de una solución, ungüento o pomada. Los fragmentos de fibronectina, ya sea que estén o no complejados con un factor de crecimiento, también se pueden administrar mediante su inclusión en un biomaterial, tal como un polímero sintético, una ECM manipulada genéticamente, un vendaje, apósito, compresa o similar.

20 Mediante otros métodos de la invención, se puede localizar un factor de crecimiento endógeno en un tejido de un paciente. Estos métodos pueden llevarse a cabo administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye un fragmento de fibronectina o una variante biológicamente activa de la misma, como se describe aquí. Al igual que en los métodos de tratamiento más específicos descritos aquí, estas composiciones se pueden administrar mediante aplicación tópica de una composición farmacéutica, un biomaterial o un soporte sólido, o por otras vías locales y sistémicas (por ejemplo, por vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, pericutánea o transmucosa). Estos métodos pueden describirse como 25 métodos para administrar uno o más factores de crecimiento a un paciente. Los métodos pueden incluir opcionalmente una etapa de identificación de un paciente que necesita tratamiento. Estos pacientes incluyen pacientes que sufren una lesión en un tejido, una pérdida de un tejido o un trastorno que resulta en una desfiguración o disfunción del tejido. Más específicamente, el paciente puede estar sufriendo una lesión o pérdida en el cerebro, la médula espinal o los nervios o un trastorno que resulte en una disfunción del cerebro, médula espinal o nervios; una lesión o pérdida en el corazón o los vasos sanguíneos o un trastorno que resulte en una disfunción del corazón o los vasos sanguíneos; una lesión o pérdida en el pulmón, tracto nasofaríngeo, senos paranasales, tráquea o vías respiratorias o un trastorno que resulte en una disfunción del pulmón, el tracto nasofaríngeo, los senos paranasales, la tráquea o las vías respiratorias; una lesión o pérdida en el tracto gastrointestinal, hígado o páncreas o un trastorno que resulte en una disfunción del tracto gastrointestinal, hígado o páncreas; una lesión o pérdida en un riñón, uréteres, vejiga o uretra o un trastorno que resulte en una disfunción del riñón, uréteres, vejiga o uretra; una lesión o pérdida en el cartílago, membrana sinovial, menisco, ligamento, tendón o núcleo pulposo o un trastorno que resulte en una disfunción del cartílago, membrana sinovial, menisco, ligamento, tendón o núcleo pulposo; una lesión o pérdida de hueso; una lesión o pérdida de labios, lengua o encías o un trastorno que resulte en disfunción de labios, lengua y encías; una lesión o pérdida de 35 tejido subcutáneo o un trastorno que resulte en disfunción del tejido subcutáneo.

Sistemas modelo *in vitro* e *in vivo*:

45 Los compuestos de prueba pueden caracterizarse aún más en sistemas modelo *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los compuestos de prueba pueden probarse para determinar sus efectos sobre la migración celular utilizando fibroblastos dérmicos humanos adultos (ADHF), células endoteliales microvasculares humanas (HEDMC) u otros tipos de células. Por ejemplo, los compuestos de prueba pueden probarse para determinar sus efectos sobre la cicatrización de heridas utilizando el modelo de nueva lesión porcina, el modelo de herida por escisión en cerdos o ratones, el modelo de herida por quemadura con peine caliente en cerdos o ratas, modelos de quemaduras por progresión de lesión vertical en cerdos y quemaduras químicas en cerdos.

Ejemplos

50 Los siguientes ejemplos describen y demuestran con más detalle realizaciones dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos se dan únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitaciones de la presente invención, ya que son posibles muchas variaciones de esta sin apartarse del alcance de la invención.

55 Estudios de tratamiento tópico de quemaduras porcinas con PDGF-BB y formulaciones de péptidos de Fórmula I:

Se utilizaron cuatro cerdos domésticos hembras de 20-30 kg para procedimientos de heridas cutáneas.

Protocolo de estudio: Los animales fueron sedados con Talazina (Tiletamina y Zolazepam, Fort Dodge Lab, Fort Dodge, Iowa) 5 mg/kg IM. Luego los cerdos fueron intubados endotraquealmente y mantenidos bajo un

plano quirúrgico de anestesia con isoflurano al 0.5-2.5 % en aire ambiente. Se cortó el pelo de los flancos y de la espalda con una maquinilla eléctrica y se frotó la piel con una solución de povidona yodada.

Se crearon quemaduras profundas estandarizadas de espesor parcial en el lomo y los flancos de los animales aplicando una barra de aluminio de 2.5 cm por 2.5 cm y 150 gramos precalentada en agua caliente a 80 °C. Las quemaduras se crearon a ambos lados de la columna vertebral, entre las patas delanteras y traseras. La barra calentada se secó justo antes de la aplicación para evitar que las gotitas de agua provocaran quemaduras por vapor en la piel. Luego se colocó la barra en una posición vertical perpendicular a la superficie de la piel y se aplicó durante un período de 20 segundos con toda la presión suministrada por la gravedad. Este modelo de quemadura produce daños en el 30-50 % superior de la dermis y se ha demostrado que es altamente reproducible (Singer et al., Acad. Emerg. Med. 7:1-6, 2000). 24 quemaduras se distribuyeron uniformemente en ambos lados de la espalda de cuatro cerdos. Dado que los cerdos no forman ampollas después de una lesión térmica, se realizó un desbridamiento de la epidermis necrótica inmediatamente después de la lesión para simular quemaduras en humanos donde pueden formarse ampollas y luego romperse (Singer et al., Acad. Emerg. Med., 7:114-119, 2000). El desbridamiento se realizó frotando muy suavemente una gasa seca contra la superficie de la quemadura hasta que la epidermis necrótica se desprendió de toda la superficie de la quemadura. Intervenciones: En la piel de la espalda de cada cerdo, se trataron aleatoriamente conjuntos iguales de 4 quemaduras con uno de los 6 tratamientos del estudio. Cada tratamiento de geles de organogel de lecitina plurónica ("PLO"), geles de PLO que contenían PDGF-BB, geles de PLO que contenían cP12 o cNP8 y geles de PLO que contenían cP12 o cNP8 y PDGF-BB, se aplicó a 4 heridas de quemaduras por cerdo después de 24 horas posquemadura o 48 horas posquemadura. Los péptidos seleccionados para la prueba se sintetizaron en una facultad de GMP (American Peptide, Vista, California) y se diluyeron en PBS estéril libre de endotoxinas con suero porcino estéril libre de endotoxinas al 2 % (HyClone, Logan, Utah) para evitar la pérdida de péptidos por adsorción superficial no específica. El PDGF-BB recombinante estéril y libre de endotoxinas (R&D Systems) también se diluyó en PBS con suero porcino al 2 %. Las concentraciones finales de péptidos con y sin PDGF-BB se combinaron en un gel de lecitina plurónica al 30 % utilizando un kit PLO estéril libre de endotoxinas (Transderma, Coquitlam, BC, Canadá). Se utilizó PBS con suero porcino al 2 % en un gel plurónico al 30 % como control del tratamiento. Las heridas recibieron 150 µl de geles de tratamiento aplicados tópicamente diariamente durante la primera semana y dos veces por semana después de eso. Luego, las quemaduras se cubrieron con una gasa seca no adherente (Telfa, Kendall Company, Mansfield, Mass.) y las áreas quemadas se cubrieron con un rollo de vendaje de gasa (Conform, Kendall Healthcare Products Company, Mansfield, Mass.) y un vendaje elástico adhesivo (Elastoplast, Beiersdorf-Jobst, Inc., Rutherford College, N.C.). Para evitar que los apósitos se desprendieran, se aplicaron grapas en la periferia de estos. Se aplicaron cambios de apósito como se indicó anteriormente después de cada aplicación del tratamiento. Todos los animales fueron tratados con un parche transdérmico de fentanilo posoperatorio para el manejo de la analgesia.

La cirugía de supervivencia de los cerdos y la recolección del sitio de la herida se realizaron bajo anestesia general. Los cerdos ayunaron durante 24 horas antes de los procedimientos quirúrgicos. Se administró atropina preoperatoria en una dosis de 0.05 mg/kg. Para la inducción de la anestesia general se administraron 4.4 mg/kg de Telazol, 2.2 mg/kg de Xilazina y 0.22 mg/kg de Butorfanol por vía IM. Posteriormente, el animal fue intubado y mantenido en la etapa de anestesia quirúrgica con isoflurano (1-3 %) y oxígeno. Dado que las heridas cutáneas cubiertas causan un dolor menor a los humanos que requieren como máximo acetaminofeno, los animales también fueron tratados recibiendo 10-20 mg/kg de acetaminofeno dos veces al día después de la cirugía de supervivencia.

La eutanasia se realiza con pentobarbital 100 mg/kg y xilazina 2 mg/kg por vía intravenosa.

Como se muestra en la Figura 6, la reepitelización de las heridas desbridadas durante 48 horas, 10 días después de la herida, aumentó notablemente en las heridas tratadas con cNP8, en comparación con las heridas de control o tratadas con cP12.

Estudios de tratamiento I.V. de quemaduras porcinas con PDGF-BB y formulaciones de péptidos de fórmula I:

Se utilizó el modelo de quemadura de progresión vertical (como se muestra en el experimento tópico anterior) para crear quemaduras en las espaldas de cada uno de 4 cerdos. Veinte quemaduras (80 °C/20 segundos) en la espalda de cada cerdo: una serie de quemaduras se realizó 8 horas antes de la infusión y la segunda serie se realizó 4 horas antes de la infusión. Se trataron tres cerdos con infusiones de 0.001, 0.01 o 0.1 mg/kg de cNP8 y un cerdo fue tratado con una infusión de regulador, como control. El cNP8 liofilizado se reconstituyó en PBS (11.6 mg/ml corregido en base al 75 % de pureza) para obtener una solución madre 5 mM en el laboratorio y se filtró con un filtro de jeringa con membrana de 0.22 µm. La concentración de la solución cNP8 filtrada se determinó leyendo OD280 y la concentración se calculó en función de OD280 = 6.76 por mM de cNP8. El cNP8 se diluyó a 5 mM con PBS según fue necesario. La solución de cNP8 filtrada se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. Justo antes de la infusión, se diluyó aún más el cNP8: a) 1:270 con PBS para obtener una solución de cNP8 0.019 mM. La cantidad de inyección fue de 3 ml/kg de peso corporal de cNP8 0.019 mM, lo que equivale a 0.1 mg/kg de peso corporal. b) 1:2700 con PBS para obtener una solución de cNP8 0.0019 mM. La inyección fue de 3 ml/kg de peso corporal de cNP8 0.0019 mM, lo que equivale a 0.01 mg/kg de peso

corporal. c) 1:27000 con PBS para obtener una solución de cNP8 0.00019 mM. La cantidad de inyección fue de 3 ml/kg de peso corporal de cNP8 0.00019 mM, lo que equivale a 0.001 mg/kg de peso corporal. La solución cNP8/reguladora se administró por vía intravenosa a cada cerdo - 4 horas u 8 horas después de realizar las quemaduras en cada cerdo. La infusión a temperatura ambiente se administró a través de la vena de la oreja durante un período de 30 minutos al cerdo. Se utilizó anestesia general durante todos los procedimientos. Se recolectaron biopsias poslesión en diversos puntos en el tiempo para realizar un análisis histológico para determinar el porcentaje de reepitelización. Como se muestra en Figuras 7 y 8 la reepitelización aumentó notablemente a los 10 y 14 días poslesión con cNP8.

Composiciones farmacéuticas y cosméticas:

A modo de ilustración de la invención se citarán varias fórmulas cosméticas. Las fórmulas son representativas, pero no limitan, la invención:

Gel:

1 g/100 g de parafina blanda blanca 1.5 Cicloticona 6.0 Crodacol C90 0.5 Lubrajel MS10 Trietanolamina 0.3 Palmitoil-HISKYILRWRPKNSV-OH 0.0005 Agua, conservantes, fragancia q.s. 100 g

El gel se puede elaborar disolviendo el péptido en agua a 80 °C, mezclando los tres primeros componentes (parafina, silicona y Crodacol) a 80 °C, luego mezclando las dos fases, enfriando a 30 °C, agregando el lubrajel, los conservantes y la fragancia. Este gel puede utilizarse para aplicación diaria sobre la piel del rostro, en particular alrededor de los ojos, para reducir las infiltraciones edematosas.

Crema:

2 g/100 g Volpo S2 2.4 Volpo S20 2.6 Prostearyl 15 8.0 Cera de abejas 0.5 Estearoxidimeticona 3.0 Propilenglicol 3.0 Carbómero 0.25 Trietanolamina 0.25 Ceramida H03 (SEDERMA) 0.5 Acetil-HIGKYGLRWRPKNSV-OH 0.001 Agua, conservantes, fragancia q.s. 100 g

Esta emulsión se puede utilizar para hidratar, reestructurar y calmar la piel del rostro, en particular en zonas de piel frágil y para tratar las arrugas. Para producir la emulsión, se puede disolver ceramida HO3 en volpo 52, S20 y prostearyl 15 a 85 °C, agregar cera de abejas y estearoxidimeticona; mezclar los demás ingredientes en la fase acuosa a 75-80 °C, luego mezclar las dos fases, enfriar y agregar la fragancia. Ceramida HO3 es tirhidroxipalmitamido miristil éter.

Base de maquillaje hidratante y antiarrugas:

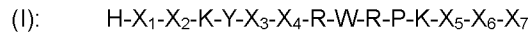
Compuesto % (p/p) Agua desmineralizada 53.36 KOH al 10 % 1.30 Polisorbato 80 0.10 Dióxido de titanio 6.00 Talco 3.05 Óxido de hierro amarillo 1.80 Óxido de hierro rojo 1.00 Óxido de hierro negro 0.15 Propilenglicol 6.00 Silicato de magnesio y aluminio 1.00 Carboximetilcelulosa de sodio 0.12 Adipato de éter miristílico DiPPG3 12.00 Neopentanoato de isoestearilo 4.00 Crodafos CS 20 4.00 Esteareth-10 2.00 Alcohol cetílico 0.50 Esteareth-2 0.50 Ceramida 2 (N-estearoil-0.10 esfingarina) HIGKYGLRWRPKGSV-OH 0.0004 Conservantes q.s.

Los sujetos pueden inscribirse en un estudio sobre el uso de una crema base como se indica anteriormente. Las arrugas alrededor de los ojos se pueden evaluar mediante autoevaluación/cuestionario y por el método de impresión. El producto se aplica en las zonas objetivo una vez al día durante 56 días. Las determinaciones se realizan el día 0 y el día 56. Como control, los sitios se tratan con la misma crema base sin péptidos y se evalúan para determinar la mejora de los síntomas del envejecimiento cutáneo.

Se han descrito varias realizaciones de la invención. No obstante, se entenderá que se pueden realizar diversas modificaciones sin alejarse del alcance de la invención. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de acuerdo con la Fórmula I:



en donde

5 X_1 es I o G o L,

X_2 es S o G,

X_3 es I o G o L,

X_4 es L o G,

X_5 es N o G,

10 X_6 está ausente o S, y

X_7 está ausente o V; y

en donde no hay dos aminoácidos consecutivos en los primeros 13 aminoácidos del polipéptido que difieran de la secuencia HISKYILRWRPKN,

15 en donde el polipéptido está opcionalmente sustituido con al menos uno de un grupo acilo inferior en el terminal N, un grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo o haloalquilamina inferior sustituido o no sustituido en el terminal C y polietilenglicol,

en donde el polipéptido es además opcionalmente un multímero lineal o ramificado de Fórmula I con un enlazador opcional entre cada secuencia determinada independientemente de Fórmula I;

o una forma ciclizada del mismo.

20 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido está sustituido con al menos uno de un grupo acilo inferior en el terminal N, un grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo o haloalquilo amina inferior sustituido o no sustituido en el terminal C y polietilenglicol.

3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido es un multímero lineal o ramificado de Fórmula I con un enlazador entre cada secuencia determinada independientemente de Fórmula I.

25 4. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido es un multímero lineal o ramificado de Fórmula I sin un enlazador entre cada secuencia determinada independientemente de Fórmula I.

5. El polipéptido de la reivindicación 1, que no es un multímero lineal o ramificado de Fórmula I.

30 6. El polipéptido de la reivindicación 5, seleccionado del grupo que consiste en HISKYILRWRPKNSV (P46), HIGKYGLRWRPKNSV (NP7), HIGKYGLRWRPKGSV (NP8), HGSKYGLRWRPKNSV, HIGKYIGRWRPKNSV, HGSKYIGRWRPKNSV, HGSKYIGRWRPKGSV y formas ciclizadas de los mismos.

7. El polipéptido de la reivindicación 6, seleccionado del grupo que consiste en HIGKYGLRWRPKGSV (NP8) y formas ciclizadas del mismo.

8. Una composición que comprende un polipéptido de acuerdo con la Fórmula I como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

35 9. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición de acuerdo con la reivindicación 8, para uso como medicamento.

40 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, para uso en un método de tratamiento de un paciente con una herida seleccionada del grupo que consiste en una incisión o extirpación quirúrgica, una lesión traumática, una quemadura térmica, una quemadura química, una lesión o ulceración de la piel, mucosa, tejido conectivo, fascia, ligamento, tendón, cartilago, nervio o músculo del paciente y una herida en el hueso del paciente, comprendiendo el método:

administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la reivindicación 8.

45 11. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la herida es una quemadura térmica o una quemadura química, preferiblemente una quemadura térmica.

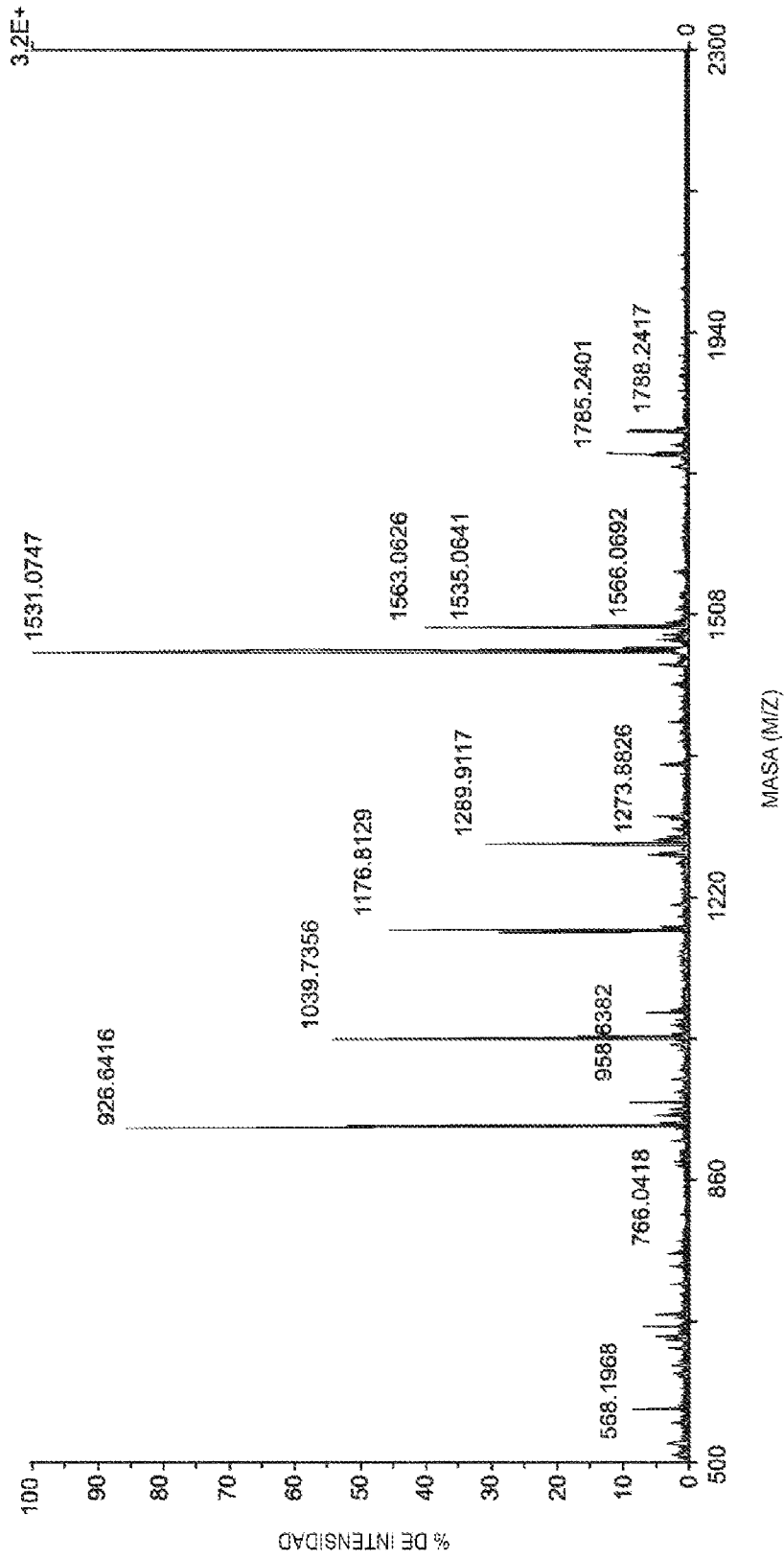


FIG. 1A

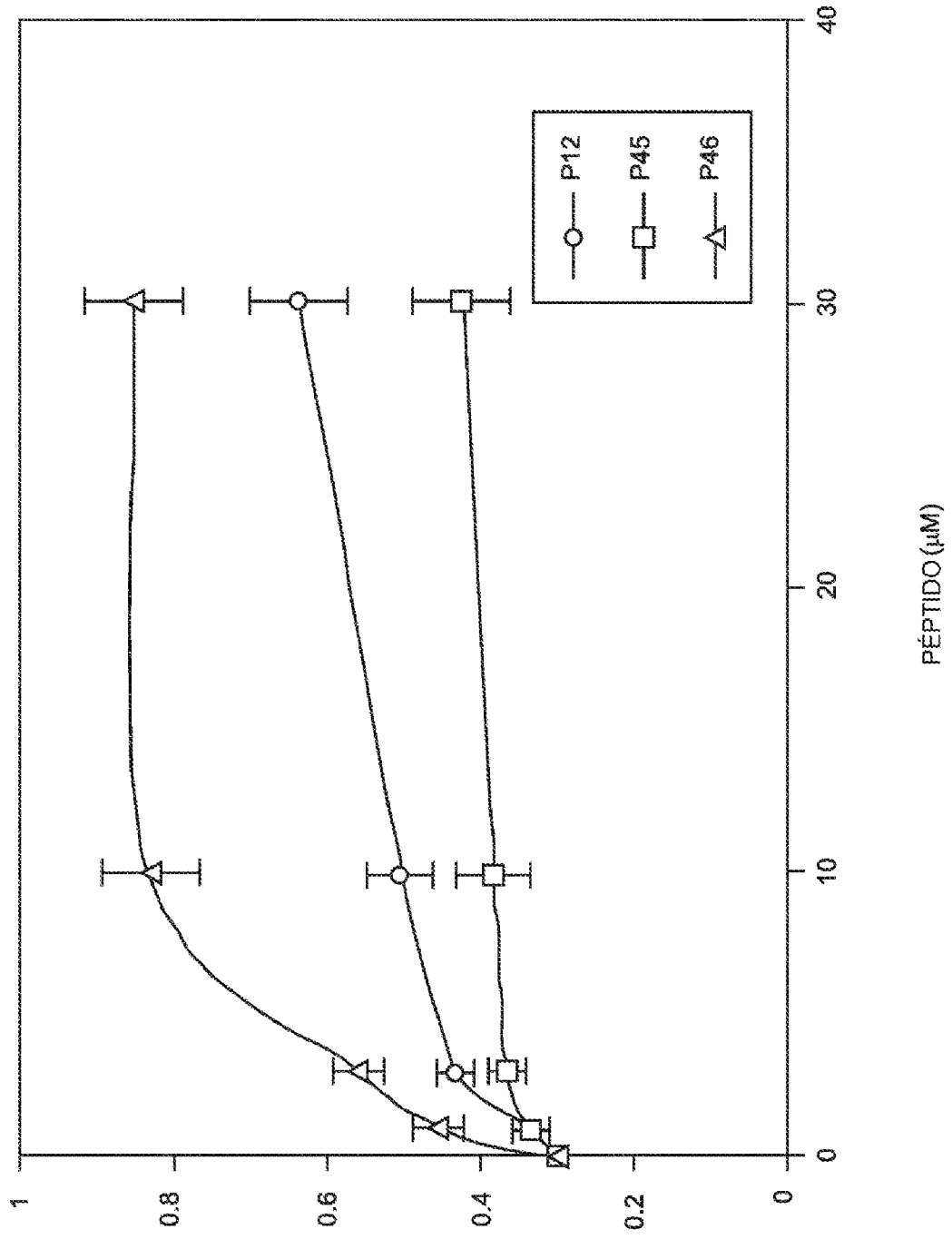


FIG. 2

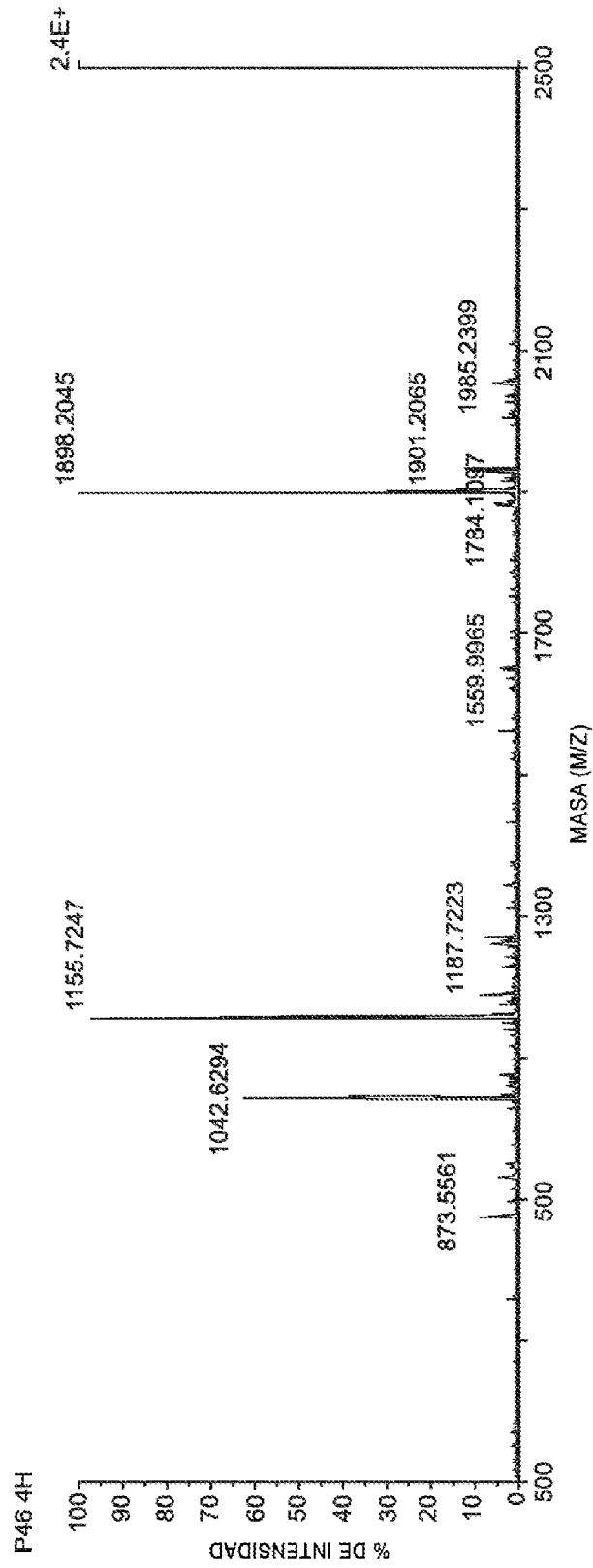


FIG. 3A

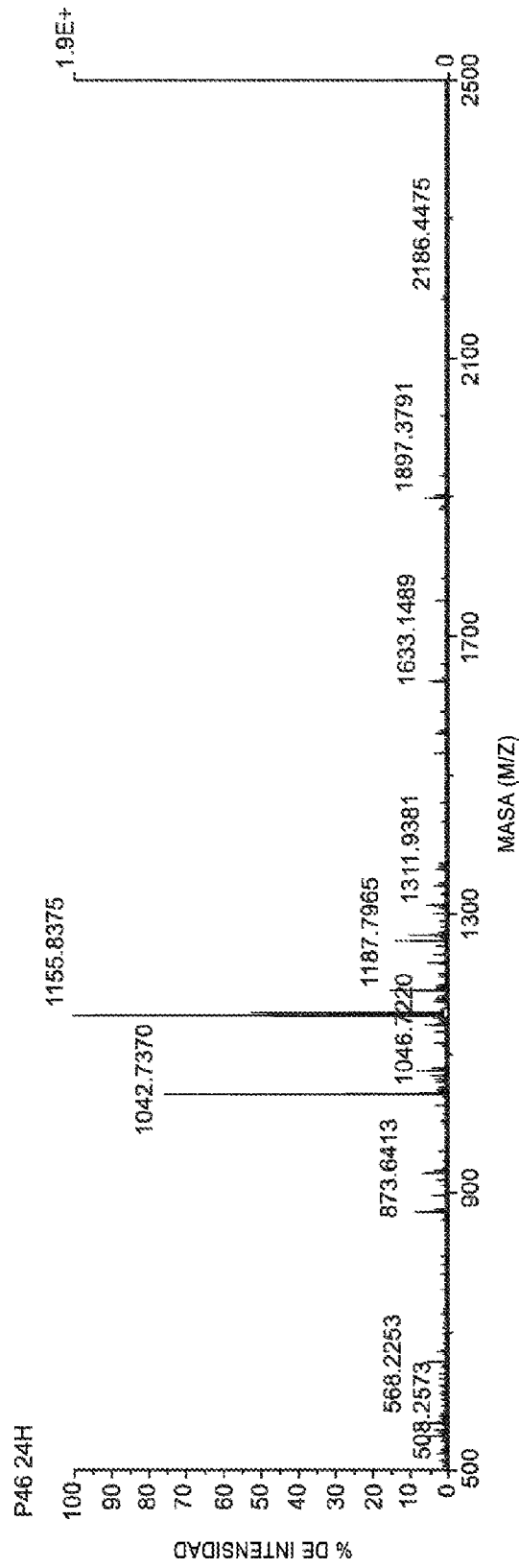


FIG. 3B

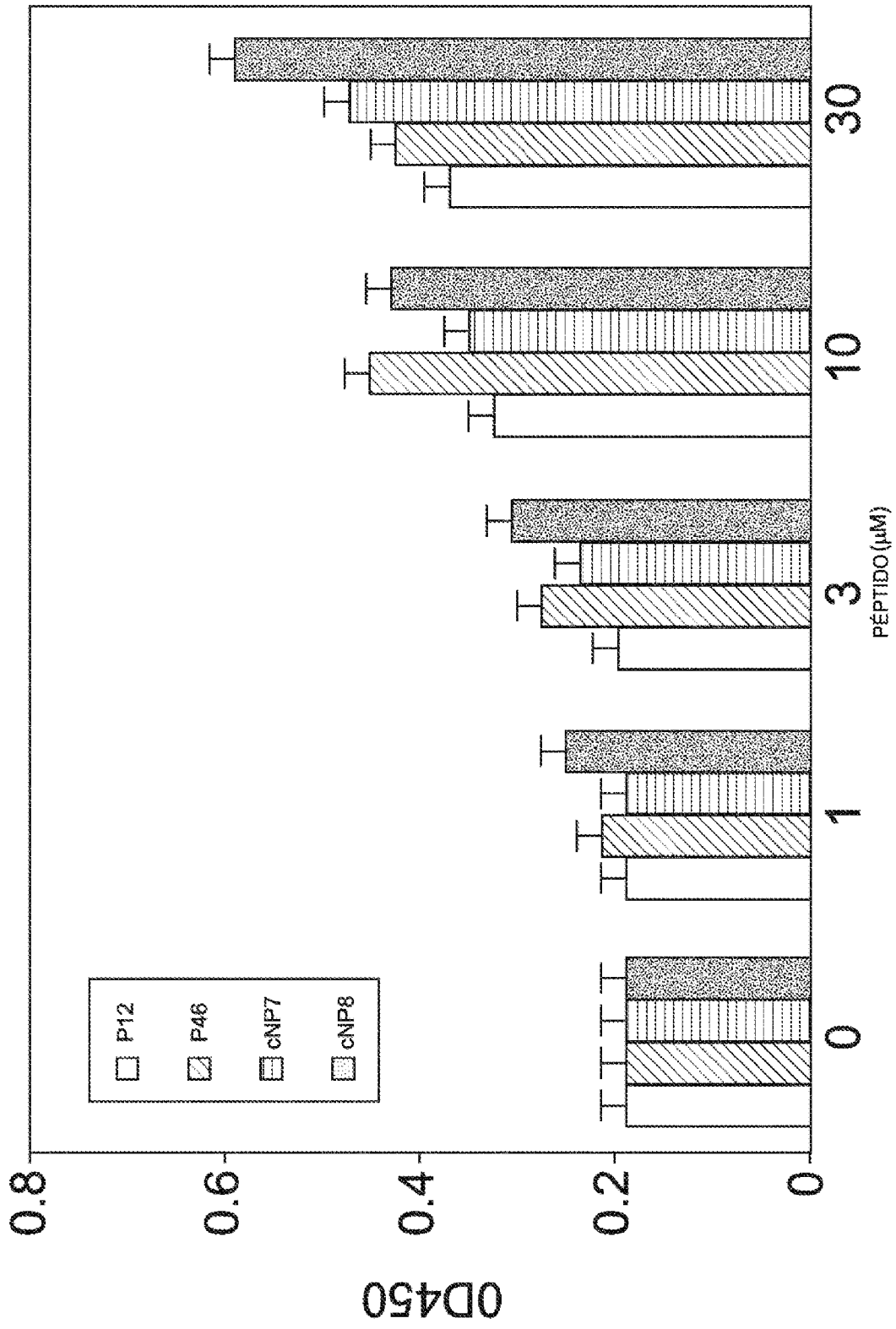


FIG. 4

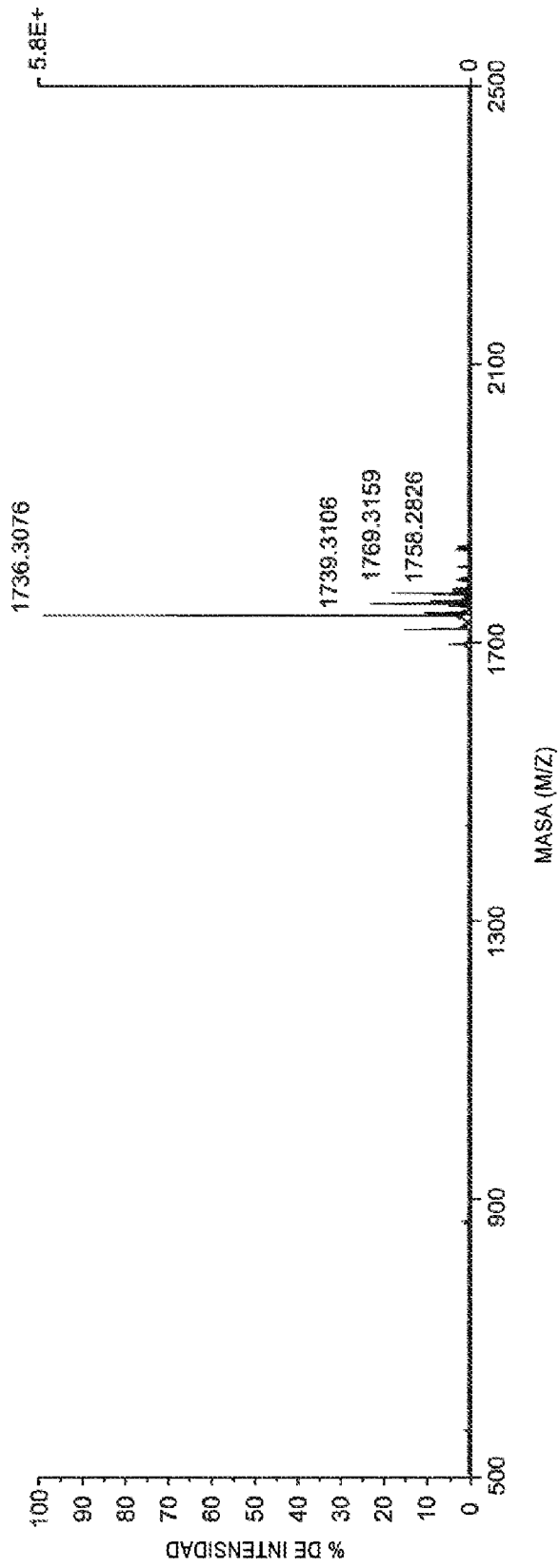


FIG. 5A

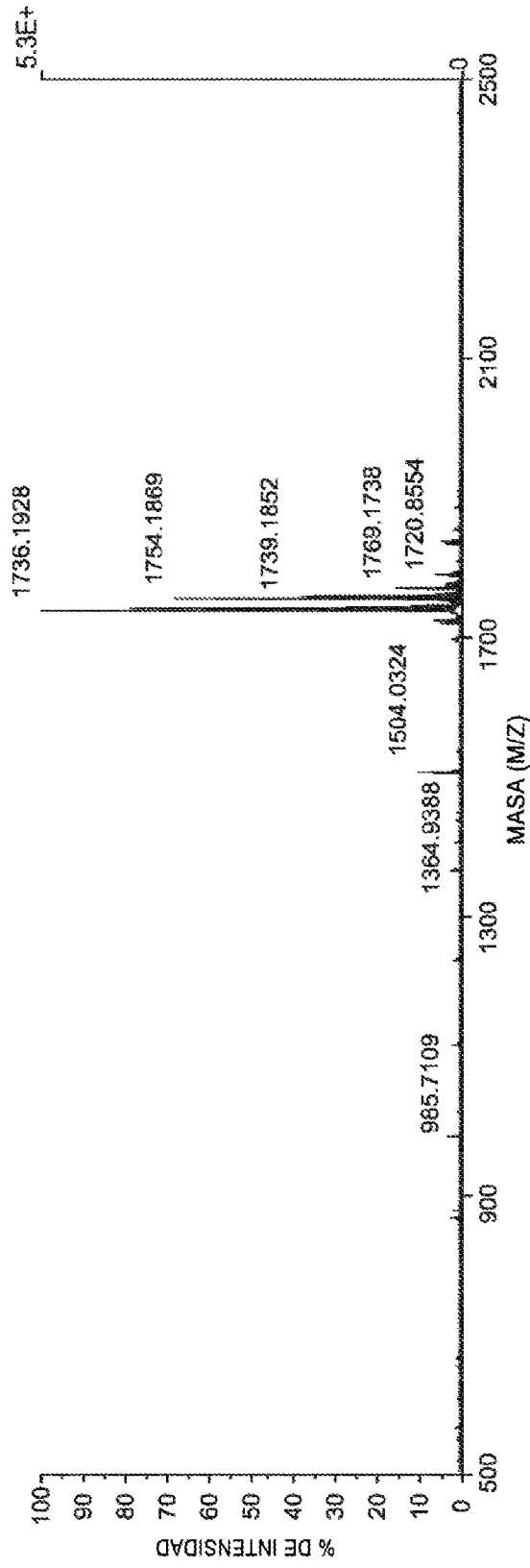


FIG. 5B

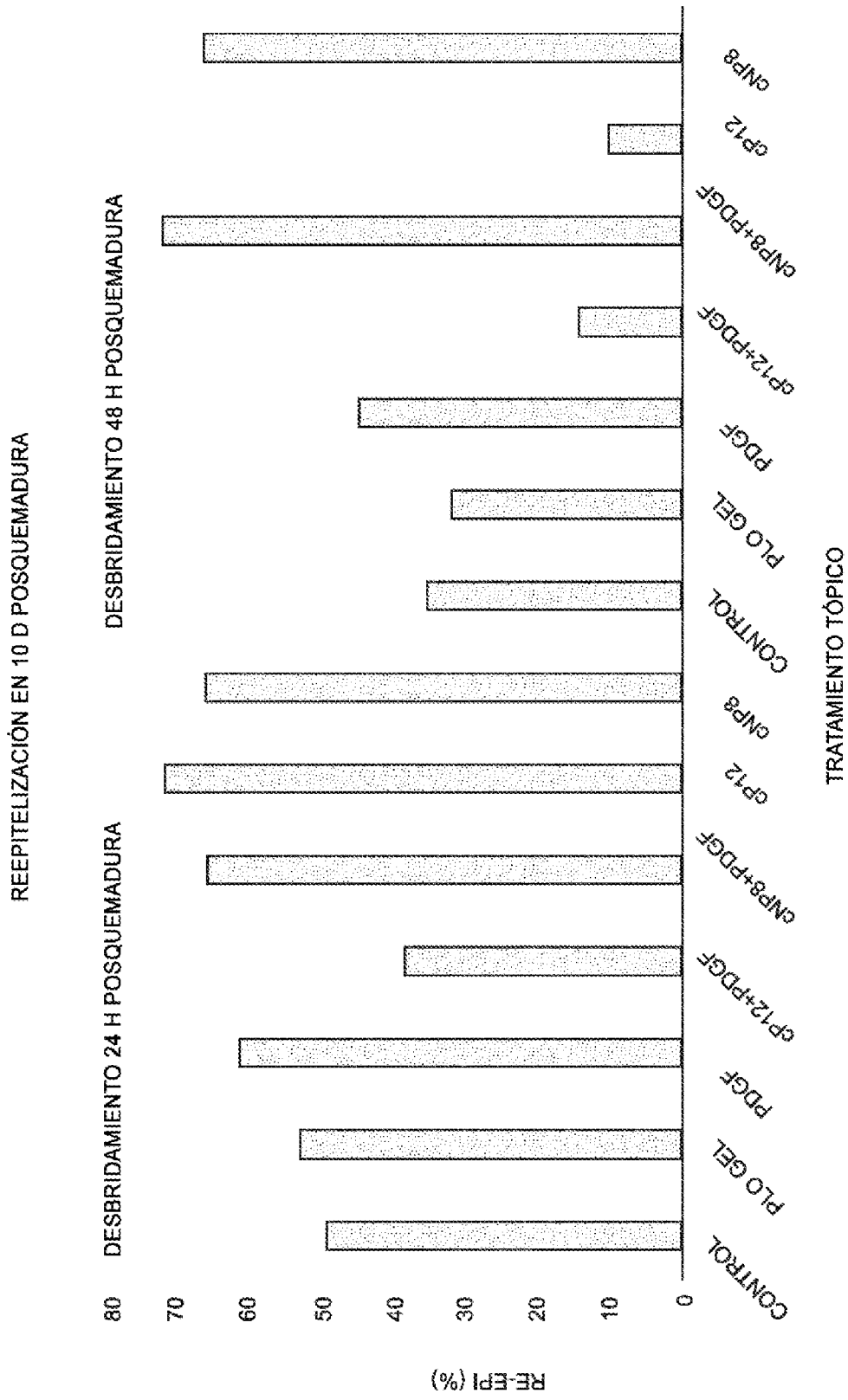


FIG. 6

10 DÍAS REEPI TELIZACIÓN

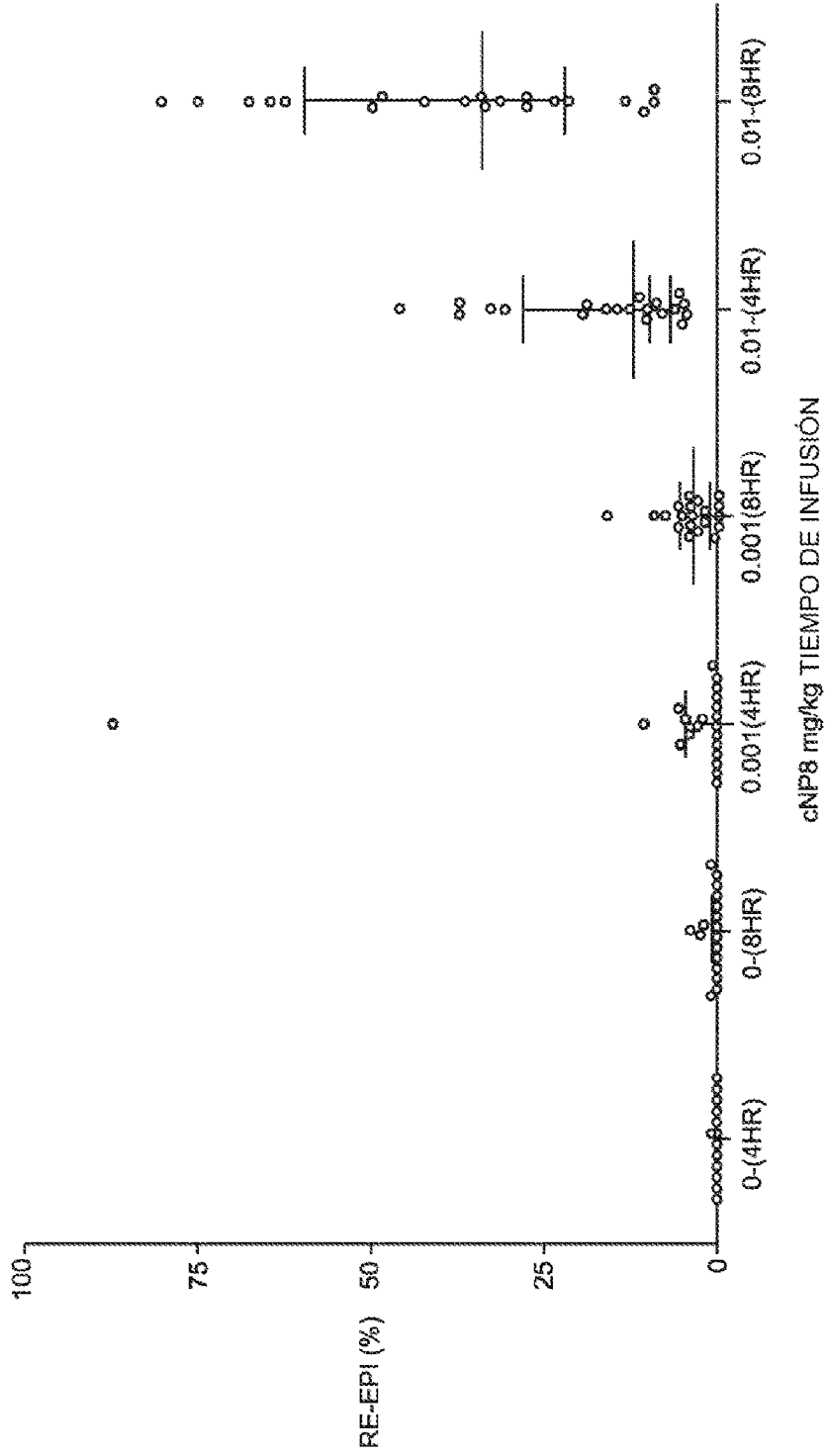


FIG. 7

14 DÍAS REEPITELIZACIÓN

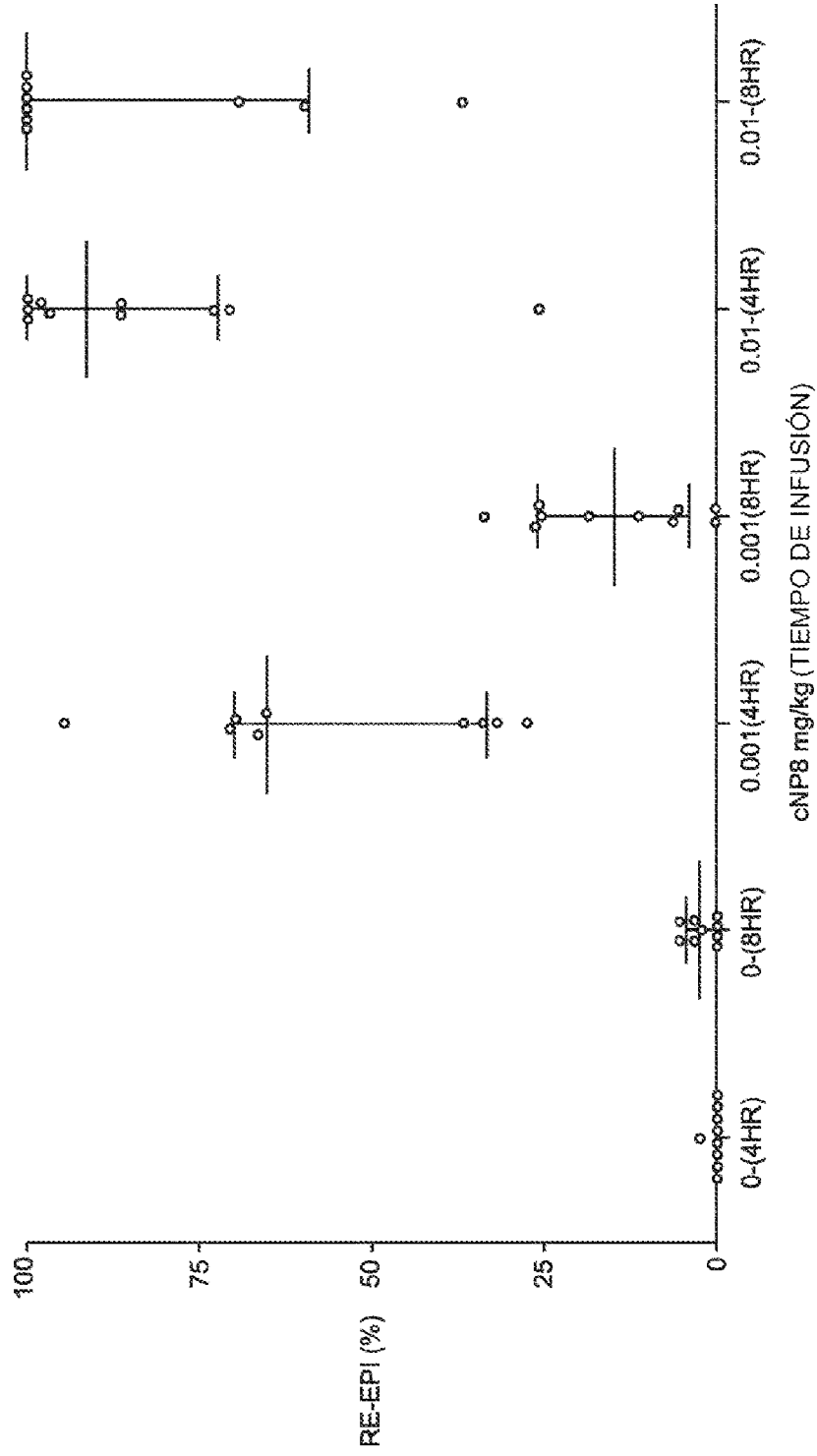


FIG. 8