

(12) **PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2015.06.15**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2016.12.15**

(45) Data e BPI da concessão: /

(73) Titular(es):

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
CALIFORNIA  
12TH FLOOR, 1111 FRANKLIN STREET  
OAKLAND, CA 94607-5200  
UNIVERSIDADE DO MINHO**

**US  
PT**

(72) Inventor(es):

**FRANCISCO MIGUEL PORTELA DA GAMA  
JOÃO PEDRO MARTINS SOARES DE CASTRO E SILVA  
SANDEEP DHALL  
MANUELA MARTINS-GREEN**

**PT  
PT  
IN  
US**

(74) Mandatário:

**LUÍS HUMBERTO SILVESTRE DE ALMEIDA FERREIRA  
EDIFÍCIO NET, RUA DE SALAZARES 842 4149-002 PORTO**

**PT**

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÕES DE ENTREGA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PARA A  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE DIVULGAÇÃO DIZ RESPEITO A FORMULAÇÕES DE ENTREGA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS, EM PARTICULAR DIZ RESPEITO A UMA COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE PELO MENOS UM POLÍMERO, PELO MENOS UM PÉPTIDO ANTIMICROBIANO COMPREENDENDO PELO MENOS UMA SEQUÊNCIA 95% IDÊNTICA À SEQUÊNCIA SEQ. ID 1, EM PARTICULAR IDÊNTICA À SEQ ID 1. E COM UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DE TODOS COMPONENTES ANTERIORES.

## **R E S U M O**

### **FORMULAÇÕES DE ENTREGA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS**

A presente divulgação diz respeito a formulações de entrega de peptídeos antimicrobianos para a cicatrização de feridas, em particular diz respeito a uma composição que compreende pelo menos um polímero, pelo menos um péptido antimicrobiano compreendendo pelo menos uma sequência 95% idêntica à sequência SEQ. ID 1, em particular idêntica à SEQ ID 1. E com uma quantidade terapêuticamente eficaz de todos componentes anteriores.

## D E S C R I Ç Ã O

### “FORMULAÇÕES DE ENTREGA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS”

#### **Domínio técnico**

[0001] A presente solução diz respeito a uma nova formulação para a entrega de um péptido antimicrobiano para melhoria da cicatrização de feridas. O referido péptido é, preferencialmente, um análogo de catelicidina. Mais particularmente, diz respeito a um péptido conjugado com um polímero de dextrina e pode ser embebido num hidrogel. Em alternativa, o referido péptido pode ser diretamente incorporado no hidrogel. Mais particularmente, o referido hidrogel pode ser carbopol. Esta solução destina-se a ser utilizada em farmácia e medicina.

#### **Antecedentes**

[0002] As feridas constituem uma causa importante de morbilidade e de redução da qualidade de vida, absorvendo recursos de saúde substanciais nos países desenvolvidos. Como exemplo, cada membro da União Europeia despende, em média, 2 a 4% do respetivo orçamento de saúde com o tratamento de feridas e, só nos EUA, todos os anos são despendidos 25 mil milhões de dólares com o tratamento de feridas. Por este motivo, o desenvolvimento de tratamentos para feridas que sejam seguros, eficazes, fáceis de utilizar e de baixo custo tem vindo a tornar-se imperativo.

[0003] Os hidrogéis têm sido frequentemente estudados para aplicações farmacêuticas e biomédicas, como, por exemplo, pensos para feridas e sistemas de entrega de fármacos. São compostos por polímeros hidrofílicos de ligação cruzada com um

teor intrínseco de água bastante elevado, que proporcionam um ambiente húmido semioclusivo na área da ferida, absorvem os exsudatos, reduzem a dor e o tempo de cicatrização e são indolores, quer na aplicação, quer na remoção. A manutenção de um ambiente húmido é particularmente relevante, dado promover a proliferação de células e a deposição de colagénio. Mais importante, entre os diferentes tipos de pensos disponíveis, os hidrogéis têm sido descritos como sendo os mais adequados para feridas de queimaduras de espessura parcial.

[0004] Muitos agentes terapêuticos, incluindo fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento epidermal, em inglês *epidermal growth factor* EGF, fator de crescimento transformante Beta, em inglês *transforming growth factor Beta* TGF-beta) e hormonas, têm sido utilizados com sucesso no tratamento de feridas. Contudo, os elevados custos de produção dos mesmos desencorajam a sua aplicação. Em particular, têm sido incorporados em pensos agentes antimicrobianos como a sulfadiazina de prata, o iodo ou o mel para aplicações médicas, como forma de manter as feridas protegidas contra infeções. No entanto, muitos estudos demonstraram que o tratamento apenas com estes agentes não é suficiente para obter a completa cicatrização da ferida e, em alguns casos, pode resultar em problemas de toxicidade (Broussard KC, Powers JG. (2013) *Wound Dressings: Selecting the Most Appropriate Type. Am J Clin Dermatol* 14, 449-459).

[0005] Neste sentido, os péptidos antimicrobianos (AMPs - Antimicrobial Peptides), que, geralmente, são péptidos pequenos, catiónicos e anfipáticos, surgem como candidatos adequados para a terapia de feridas. O LL37 é um péptido que pertence à família catelicidina de AMPs e é sobre-expresso em vários tipos de células diferentes. Para além da sua atividade antimicrobiana, o LL37 revelou estar envolvido na quimiotaxia

de mastócitos e leucócitos, na angiogénese e na promoção da cicatrização de feridas. Na verdade, o LL37 é sobre-expresso na epiderme e no interior da própria ferida após a lesão. Contudo, os mecanismos moleculares através dos quais o LL37 acelera a cicatrização de feridas e envolvidos na melhoria da cicatrização causada pelo LL37 não são claros. Recentemente, utilizando um método mais eficaz em termos económicos, foi produzida uma versão recombinante deste péptido capaz de manter a sua atividade antimicrobiana. Na verdade, nesse trabalho, os autores aproveitaram as propriedades de ligação à celulose da família III do módulo de ligação a carboidratos (CBM - Carbohydrate Binding Module) do *Clostridium thermocellum* para purificação do péptido. Isto resultou em menos etapas de purificação e em custos de produção menores.

[0006] Este LL37 recombinante demonstrou acelerar a cicatrização comprometida de feridas excisionais induzida por dexametasona em ratinhos C57BL/6 (Ramos R, Silva JP, Rodrigues AC, Costa R, Guardão L, Schmitt F, Gama M. (2011) *Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37*. *Peptides* 32, 1469-1476), sugerindo ainda a sua eventual utilização como um agente terapêutico de baixo custo.

[0007] Regra geral, a administração exógena destes péptidos é condicionada por toxicidade do fármaco, bem como pelas limitações em termos de estabilidade e solubilidade. Durante muito tempo foram utilizados processos de PEGilação para otimizar a estabilidade de proteínas e melhorar a farmacocinética, mas a não biodegradabilidade do poli(etilenoglicol) (PEG) pode inviabilizar a sua utilização. Uma alternativa promissora consiste na conjugação do péptido com dextrina, utilizando um método de succinilação previamente descrito. A dextrina é um polissacarídeo aprovado pela FDA, não imunogénico, biocompatível e eficientemente excretado

graças ao seu baixo peso molecular; estabiliza o péptido, protege-o das protéases e constitui em si um sistema de libertação, dado degradar-se mediante contacto com as amílases presentes no tecido da ferida, libertando o péptido ao longo do tempo (Hreczuk-Hirst D, Chicco D, German L, Duncan R. *Dextrins as potential carriers for drug targeting: tailored rates of dextrin degradation by introduction of pendant groups*. Int J Pharm 2001; 230: 57-66).

[0008] Não obstante, um veículo adequado pode ajudar a administrar e a libertar de forma sustentada o péptido. Os hidrogéis têm sido frequentemente estudados para aplicações farmacêuticas e biomédicas (por exemplo, como pensos para feridas e sistemas de entrega de fármacos). São semioclusivos e altamente hidrofílicos, proporcionando humidade na área da ferida, absorvendo os exsudatos, reduzindo a dor e o tempo de cicatrização e sendo de aplicação e remoção indolor. A manutenção de um ambiente húmido é particularmente importante, dado promover o crescimento de células e a deposição de colagénio.

[0009] Em 2012, Ferguson e colaboradores submeteram um pedido de patente (W02012035310) descrevendo um sistema para entrega de colistina (um AMP) em locais de infeção. A invenção baseava-se na conjugação de colistina com dextrina, como um método para aumentar a bioatividade e biodisponibilidade do péptido, reduzindo simultaneamente a toxicidade sistémica. No entanto, a referida patente centra-se na utilização dos referidos conjugados para combater infeções, aproveitando-se das propriedades antimicrobianas da colistina. Na verdade, não proporciona qualquer evidência de que a utilização de colistina ou de conjugados dextrina-colistina possa melhorar a cicatrização de feridas. Além disso, o facto de os conjugados não serem incorporados em nenhum sistema veículo e não

constituírem, em si, um penso, pode inviabilizar a sua utilização na terapia de feridas, uma vez que requereriam um regime de doses mais frequentes. Além disso, a administração dos referidos conjugados pode resultar na pronta absorção da colistina, o que pode fazer com que a mesma entre na corrente sanguínea em concentrações elevadas, passíveis de induzir efeitos adversos. Para além disto, ao limitar a utilização de dextrina com um peso molecular superior a 5.000 g/mol, a referida invenção não compreende a utilização da maioria das dextrinas comercialmente disponíveis (por exemplo, Tackidex<sup>®</sup>, Koldex<sup>®</sup>).

[0010] Estes factos são divulgados por forma a ilustrar o problema técnico solucionado pela presente divulgação.

### **Descrição geral**

[0011] A presente divulgação diz respeito a uma nova formulação para a entrega sustentada de um AMP para melhoria da cicatrização de feridas. Esta nova formulação compreende um AMP que é conjugado com um polímero de dextrina, um polímero de carbopol ou misturas dos mesmos. Os referidos AMP e polímero de dextrina podem ainda ser embebidos num hidrogel.

[0012] A conjugação do AMP com o polímero de dextrina, polímero de carbopol ou misturas dos mesmos apresenta as seguintes vantagens:

estabiliza o péptido;

impede que o péptido seja prontamente degradado por proteases no ambiente agressivo do tecido da ferida;

permite a libertação sustentada do péptido à medida que o polímero de dextrina se degrada por exposição às  $\alpha$ -amílases presentes na ferida.

[0013] A conjugação do AMP com polímero de dextrina, polímero de carbopol ou misturas dos mesmos pode, ainda, ser embebida num hidrogel, o qual proporciona o ambiente húmido necessário no local da ferida e também atua como um veículo para a aplicação tópica dos conjugados. No geral, a formulação de hidrogel contendo AMP apresenta as vantagens de melhorar e estimular a cicatrização adequada da ferida, é segura, fácil de aplicar e de remover, mantém um ambiente húmido adequado no interior do local da ferida e mantém a ferida protegida das infeções, devido à presença do péptido antimicrobiano.

[0014] Um aspeto do presente objeto da invenção está relacionado com uma composição compreendendo:

um polímero selecionado a partir da seguinte lista:  
polímero de dextrina, polímero de carbopol ou misturas dos mesmos, e;

pelo menos um péptido antimicrobiano, compreendendo, pelo menos, uma sequência 95% idêntica à sequência SEQ. ID 1 - KEFKRIVKRIKKFLRKLV;

com uma quantidade terapeuticamente eficaz de todos os componentes anteriores, em particular, preferencialmente, 96%, 97,%, 98%, 99% idêntica ou idêntica à SEQ ID 1.

[0015] Numa outra forma de realização, a composição da presente invenção pode compreender dextrina e um péptido antimicrobiano compreendendo, pelo menos, uma sequência 95% idêntica à SEQ ID 1, em particular, preferencialmente, 96%, 97,%, 98%, 99% idêntica, mais preferencialmente um péptido antimicrobiano compreendendo a SEQ ID 1.

[0016] Numa outra forma de realização, a composição da presente invenção pode compreender carbopol e um péptido antimicrobiano compreendendo, pelo menos, uma sequência 95% idêntica à SEQ ID



1, em particular, preferencialmente, 96%, 97,%, 98%, 99% idêntica, mais preferencialmente um péptido antimicrobiano compreendendo a SEQ ID 1.

[0017] Numa outra forma de realização, a composição da presente invenção pode compreender dextrina, carbopol e um péptido antimicrobiano compreendendo, pelo menos, uma sequência 95% idêntica à SEQ ID 1, em particular, preferencialmente, 96%, 97,%, 98%, 99% idêntica, mais preferencialmente um péptido antimicrobiano compreendendo a SEQ ID 1.

[0018] Numa outra forma de realização, a composição da presente invenção pode ainda compreender um hidrogel, em particular carbopol, matrigel, ácido hialurónico, dextrano, alginato, colagénio, entre outros.

[0019] Numa outra forma de realização, a concentração do péptido antimicrobiano da composição da presente invenção pode ser entre 1 - 20  $\mu$ M, em particular 10 - 12  $\mu$ M.

[0020] Numa outra forma de realização, a concentração de dextrina da composição da presente invenção pode ser entre 5 - 10 mg/ml, em particular 2 - 3 mg/ml. Numa outra forma de realização, a composição da presente invenção pode ainda compreender um polímero de dextrina compreendendo um peso molecular entre 1.000 - 20.000 g/mol, preferencialmente o polímero de dextrina tem um peso molecular entre 1.000 - 5.000 g/mol.

[0021] Numa outra forma de realização, a concentração do carbómero, em particular carbopol, na composição da presente invenção pode ser entre 0,2 - 1% (p/v), em particular 0,4 - 0,6% (p/v).

[0022] Outro aspeto da presente invenção está relacionado com a utilização da composição como uma composição farmacêutica, médica, veterinária ou cosmética.

[0023] Numa outra forma de realização, a composição da presente invenção pode ser uma formulação tópica ou uma formulação injetável, preferencialmente uma composição tópica como um gel, um creme ou uma loção.

[0024] Numa outra forma de realização, a composição da presente invenção pode ainda compreender um agente anti-inflamatório, um agente antisséptico, um agente antipirético, um agente anestésico, um agente terapêutico ou misturas dos mesmos, entre outros.

[0025] Outro aspeto da presente invenção relaciona-se com um péptido antimicrobiano compreendendo uma sequência 95% idêntica à SEQ ID 1, ou uma porção/fragmento para a utilização no tratamento de feridas em mamíferos. Em particular, preferencialmente, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica, mais preferencialmente um péptido antimicrobiano compreendendo a SEQ ID 1.

[0026] Numa forma de realização, a composição/composto descrito na presente divulgação destina-se a utilização em medicina ou cosmética, em particular para a utilização no tratamento de feridas em mamíferos, em particular em mamíferos diabéticos; nomeadamente, para a utilização no tratamento de doenças isquémicas e vasculares, ou para a utilização no tratamento de feridas superficiais ou de espessura parcial, mais especificamente de queimaduras. Outro aspeto do presente objeto da invenção está relacionado com uma composição compreendendo:

um polímero de carbopol e;  
pelo menos um péptido antimicrobiano, compreendendo, pelo menos, uma sequência 95% idêntica a uma das sequências da seguinte lista:

SEQ ID 1 - KEFKRIVKRIKKFLRKLV;

SEQ ID 2 - LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRLRNLPRTES;

SEQ ID 3 - GLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVPQPEQ,

com uma quantidade terapeuticamente eficaz de todos os componentes anteriores, em particular, preferencialmente, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica à SEQ ID 1.

[0027] Numa outra forma de realização, a composição da presente invenção pode compreender um péptido antimicrobiano compreendendo, pelo menos, uma das sequências da seguinte lista: SEQ ID 1; SEQ ID 2; SEQ ID 3.

[0028] Numa outra forma de realização, a composição da presente invenção pode ainda compreender um AMP compreendendo a SEQ ID 2, SEQ ID 3 ou misturas das mesmas.

[0029] Em alternativa, numa forma de realização, o referido péptido SEQ ID 1, SEQ ID 2 ou SEQ ID 3 pode ser diretamente embebido em carbopol, o que é vantajoso para feridas que naturalmente cicatrizam mais depressa e nas quais não é necessária uma libertação muito lenta do péptido, como é o caso das feridas excisionais. Também foram criados análogos do LL37 SEQ ID 2 com o objetivo de melhorar as propriedades antimicrobianas do mesmo e diminuir a citotoxicidade e a ligação a proteínas plasmáticas. Um deles, o SEQ ID 1 (LLKKK18), no qual os resíduos polares não carregados glutamina, asparagina e ácido aspártico carregado negativamente são substituídos por resíduos de lisina carregados positivamente, exhibe hidrofobicidade e cationicidade mais elevadas do que o LL37 SEQ ID 2, tal como

previamente descrito. Isto resulta numa maior atividade antimicrobiana e quimioatraente. Contudo, até à data não são conhecidos dados sobre a capacidade da SEQ ID 1 (LLKKK18) para melhorar a cicatrização de feridas.

[0030] O carbopol é feito de carbómeros reticulados entre si, formando uma estrutura que apresenta boas propriedades reológicas e uma boa capacidade tampão, elevada viscosidade, boa biocompatibilidade, propriedades bioadesivas, boa estabilidade térmica e uma boa aceitabilidade por parte do paciente. Nomeadamente:

- Os homopolímeros de carbopol são polímeros de ácido acrílico reticulados com alilo de sacarose ou alilo de pentaeritritol;
- Os copolímeros de carbopol são polímeros de ácido acrílico e acrilato de alquilo C10-C30 reticulados com alilo de pentaeritritol;
- Os interpolímeros de carbopol são um homopolímero ou copolímero de carbómero que contém um bloco copolímero de polietilenoglicol e um éster de ácido alquilo de cadeia longa.

[0031] De acordo com a presente divulgação, o carbopol ou carbopóis podem ser vantajosamente escolhidos, por exemplo, a partir das categorias carbopol da Lubrizol, por exemplo: carbopol 71G NF, 971P NF, 974P NF, 980 NF, 981 NF, 5984 EP, EDT 2020 NF, 934 NF, 934P NF, 940 NF, 941 NF, 1342 NF, ou misturas dos mesmos, entre outros.

[0032] Numa forma de realização, a presente divulgação também diz respeito a uma nova formulação para a entrega sustentada de um AMP, mais particularmente o SEQ ID 1 (LLKKK18), para

melhoria da cicatrização de feridas, nomeadamente feridas de queimaduras.

[0033] Numa forma de realização, o péptido antimicrobiano - SEQ ID 1 (LLKKK18) - é conjugado com um polímero de dextrina que pode ainda ser embebido num hidrogel. A referida conjugação com dextrina estabiliza o péptido, impede que o mesmo seja rapidamente degradado por proteases no ambiente agressivo do tecido da ferida, ao mesmo tempo permitindo a sua libertação sustentada à medida que a dextrina se degrada por exposição às  $\alpha$ -amílases presentes na ferida. Os referidos conjugados podem ser embebidos num hidrogel, o qual proporciona o ambiente húmido necessário no local da ferida e também atua como um veículo para a aplicação tópica dos conjugados.

[0034] Numa forma de realização, os conjugados dextrina-SEQ ID 1 (LLKKK18) são ainda embebidos num hidrogel de Carbopol<sup>®</sup>. O Carbopol<sup>®</sup> é feito de carbómeros, os quais são polímeros que consistem em ácido acrílico reticulado com éteres de polialqueno ou divinilglicol. Estes carbómeros formam uma estrutura com boas propriedades de fluxo e uma boa capacidade tampão, elevada viscosidade, boa biocompatibilidade, propriedades bioadesivas, boa estabilidade térmica e uma boa aceitabilidade por parte do paciente. Após libertação do hidrogel, a dextrina degrada-se em resultado da ação das amílases presentes na ferida, libertando o péptido de uma forma sustentada. Em alternativa, o péptido pode ser diretamente embebido em Carbopol<sup>®</sup>, sem passar por conjugação prévia com outra molécula. Isto permite uma administração mais rápida e mais direta do péptido, sendo vantajoso nas feridas que naturalmente cicatrizam mais depressa, como é o caso das feridas excisionais.

[0035] A presente solução consiste numa nova formulação em hidrogel, segura, de baixo custo e eficaz, vocacionada para o tratamento de feridas, que acelera o processo de cicatrização e melhora a qualidade dos tecidos das feridas: é fácil de aplicar e de remover, mantém um ambiente húmido no interior do local da ferida e tem a capacidade de manter o local da ferida livre de infeções, graças à presença de um péptido antimicrobiano. Consequentemente, este sistema de entrega tem um enorme potencial enquanto abordagem terapêutica para o tratamento de feridas de queimaduras.

[0036] Normalmente, os péptidos antimicrobianos (AMPs) são péptidos pequenos, catiónicos e anfipáticos, que surgem como candidatos adequados para a terapêutica de feridas. O LL37 - SEQ ID 2, a única catelicidina humana conhecida (família dos AMPs) é sobre-expresso em vários tipos de células. É armazenado intracelularmente sob a forma de um pró-péptido inativo, o hCAP18, o qual, mediante estimulação e secreção, é clivado a nível extracelular a partir do domínio catelina de terminal N pela proteinase 3, conduzindo à formação do LL-37 ativo. Para além da sua atividade antimicrobiana, foi registado na quimiotaxia de mastócitos/leucócitos, na angiogénese e na promoção da cicatrização de feridas. Na verdade, a sobre-expressão do LL37 foi demonstrada na epiderme e no interior das próprias feridas após lesão. Além disso, o LL37 partilha muitas semelhanças com a murina - o péptido antimicrobiano relacionado com a catelina (cRAMP - Cathelin-Related Antimicrobial Peptide), incluindo não só a conformação  $\alpha$ -helicoidal, mas também um espectro de atividade antimicrobiana e uma distribuição tecidual similares (Ramos R, Silva JP, Rodrigues AC, Costa R, Guardão L, Schmitt F, Gama M. (2011) *Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37*. Peptides 32, 1469-1476).

[0037] Foram criados análogos do LL37 com o objetivo de otimizar as propriedades antimicrobianas e reduzir a citotoxicidade e a ligação às proteínas plasmáticas. Um deles, o LLKKK18 (SEQ ID 1), dispõe de uma cadeia principal semelhante à do LL37 mas é composto por apenas 18 aminoácidos. Além disso, os resíduos polares não carregados glutamina, asparagina e ácido aspártico carregado negativamente são substituídos por resíduos de lisina carregados positivamente. Este péptido é também mais catiónico e hidrofóbico do que o LL37, com claras implicações na obtenção de atividades antimicrobiana e quimioatraente mais elevadas do que as conseguidas pelo respetivo análogo. Além do mais, o seu menor tamanho é vantajoso, pois não só facilita o seu transporte através das membranas celulares, como também custa menos a sintetizar.

[0038] O carbopol é escolhido como um veículo preferido devido às suas boas propriedades reológicas e capacidade tampão, elevada viscosidade, boa biocompatibilidade, propriedades bioadesivas, boa estabilidade térmica e boa aceitabilidade por parte do paciente, que o tornam ideal para aplicações dermatológicas, incluindo a cicatrização de feridas. Além disso, permite a fácil incorporação dos conjugados ou nanopartículas, pois estes podem ser misturados numa solução de carbopol que apenas se transforma num gel depois de o pH ser aumentado para 6 - 6,5. Além do mais, o gel proporciona um veículo adequado para administração tópica, dado ser seguro, indolor e fácil de aplicar e remover.

[0039] A divulgação aqui descrita também se relaciona com uma nova formulação para administração tópica de um péptido antimicrobiano em feridas, em particular em feridas de queimaduras. A referida formulação baseia-se na inclusão de um AMP, diretamente ou após conjugação com dextrina, carbopol ou suas misturas, num hidrogel, a conjugação do AMP com dextrina

e a posterior inclusão dos conjugados num hidrogel. No referido hidrogel são ainda embebidos os conjugados num hidrogel, tipicamente carbopol.

[0040] Numa forma de realização, é demonstrado que o SEQ ID 1 (LLKKK18) acelera a cicatrização da ferida em feridas excisionais com 5 mm de diâmetro no dorso de ratinhos C57BL/6. A cicatrização de feridas nestes ratinhos tinha sido previamente comprometida pela administração intraperitoneal de dexametasona. Em seguida, o SEQ ID 1 (LLKKK18) foi administrado topicamente, numa base diária, por um período total de 7 dias. Além disso, foram administradas combinações de SEQ ID 1 (LLKKK18) + carbopol, dextrina - SEQ ID 1 (LLKKK18) e dextrina - SEQ ID 1 (LLKKK18) + carbopol. Uma solução salina tamponada com fosfato (PBS - Phosphate Buffered Saline) foi utilizada como controlo. Conforme representado na Fig. 1, a presença de LLKKK18, quer diretamente incorporado em carbopol, quer conjugado com dextrina antes da incorporação no hidrogel, acelera o fecho da ferida no modelo de ferida resultante de excisão comprometida por dexametasona. Isto é indicativo do envolvimento deste péptido na melhoria da cicatrização da ferida.

[0041] Numa forma de realização, o SEQ ID 1 (LLKKK18) acelera o fecho da ferida resultante de queimadura num modelo de rato, ao mesmo tempo melhorando simultaneamente a qualidade da cicatrização. Em particular, observa-se que a libertação deste péptido a partir de conjugados com dextrina posteriormente embebidos num hidrogel de carbopol induziu a cicatrização adequada da ferida resultante de queimadura. Na verdade, a libertação de SEQ ID 1 (LLKKK18) reduz o *stress* oxidativo e a inflamação (baixos níveis de infiltração de neutrófilos e macrófagos e de citocinas pró-inflamatórias). Mais importante ainda, induz uma resolução mais rápida do estágio inflamatório,



através do recrutamento precoce de macrófagos M2. Além disso, o SEQ ID 1 (LLKKK18) estimula a angiogénese (maior VEGF e maior desenvolvimento de microvasos *in vivo*), contribuindo potencialmente para um transporte mais eficaz de nutrientes e citocinas para o local da ferida. Além do mais, o SEQ ID 1 (LLKKK18) melhora a qualidade do tecido cicatrizado, ao promover a deposição adequada de colagénio.

[0042] No geral, esta divulgação diz respeito a uma formulação eficaz, segura e de baixo custo que mantém um ambiente húmido na ferida, que é fácil de aplicar e remover e tem a capacidade de prevenir infeções. Estes achados sugerem que o SEQ ID 1 (LLKKK18), em si, apresenta um enorme potencial como abordagem terapêutica para o tratamento de feridas.

[0043] Além disso, a presente divulgação também diz respeito a uma formulação para melhoria da cicatrização de feridas, consistindo na entrega de um péptido antimicrobiano (AMP), preferencialmente o SEQ ID 1 (LLKKK18), em que a referida formulação estabiliza o referido péptido, impede a sua degradação por proteases e permite a sua libertação sustentada.

[0044] Numa forma de realização, o referido AMP é o LLKKK18 (SEQ ID 1).

[0045] Numa forma de realização, os péptidos previamente mencionados podem ser embebidos num hidrogel.

[0046] Numa forma de realização, o referido péptido pode ser conjugado com um polímero de dextrina.

[0047] Numa forma de realização, o polímero de dextrina tem um peso molecular entre 10.000 - 20.000 g/mol, preferencialmente de 1.000 - 10.000 g/mol, mais preferencialmente de 1.000 - 5.000 g/mol.

[0048] Numa forma de realização, o AMP é conjugado por via de uma reação de succinilação com o polímero de dextrina.

[0049] Numa forma de realização, o polímero de dextrina é modificado por succinilação de 0,5 - 10% mol.

[0050] Numa forma de realização, os conjugados são embebidos num hidrogel, sendo o referido hidrogel, em particular, carbopol.

[0051] Numa forma de realização, os péptidos e conjugados são primeiramente dissolvidos numa solução de carbómero, seguindo-se a gelificação do hidrogel.

[0052] A presente divulgação também diz respeito a um método para cicatrizar uma ferida, o qual compreende a administração da formulação a um mamífero necessitado.

[0053] Numa forma de realização, o referido método é um método de tratamento de feridas superficiais ou de espessura parcial num mamífero necessitado do mesmo, em particular, sendo o mamífero um humano, um equino, um canino, um felino, um suíno ou qualquer outra espécie doméstica ou agrícola.

[0054] Numa forma de realização, a ferida é uma ferida infetada ou uma ferida não infetada.

[0055] Numa forma de realização, o AMP e a composição da presente divulgação reduz os níveis de *stress* oxidativo inicial pós-cicatrização, aumenta a angiogénese e induz a resolução precoce da inflamação.

[0056] Numa forma de realização, o AMP é administrado em combinação com qualquer outro composto.

[0057] Numa forma de realização, a divulgação do sistema de entrega contendo AMP constitui uma abordagem nova, segura, de

baixo custo e eficaz para o tratamento de feridas, acelerando o processo de cicatrização e melhorando a qualidade dos tecidos das feridas. Isto foi conseguido através da regulação do *stress* oxidativo e da inflamação iniciais. De forma igualmente importante, induz uma resolução mais rápida da fase inflamatória, através do recrutamento precoce de macrófagos M2 após a lesão. Além disso, estimula a angiogénese no tecido de granulação, o que é da máxima importância para a obtenção do rápido transporte de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas para o local da ferida, contribuindo assim para uma cicatrização mais rápida da ferida com a adequada organização tecidual. Além disso, a referida formulação é fácil de aplicar e remover, mantém um ambiente húmido e tem a capacidade de manter o local da ferida livre de infeções, devido à presença de um péptido antimicrobiano. Consequentemente, este sistema de entrega tem um enorme potencial enquanto abordagem terapêutica para o tratamento de feridas de queimaduras.

[0058] Métodos para o alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na arte, incluindo tais métodos os métodos GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA e TFASTA. O GAP utiliza o algoritmo de Needleman e Wunsch ((1970) *J Mol Biol* 48: 443-453) para encontrar o alinhamento geral (ao longo de toda a sequência) de duas sequências, maximizando o número de correspondências e minimizando o número de lacunas. O algoritmo BLAST (Altschul *et al.* (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10) calcula a percentagem de identidade da sequência e executa uma análise estatística da similaridade entre as duas sequências. O *software* para realização da análise BLAST está acessível ao público através do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI - National Centre for Biotechnology Information). As percentagens globais de similaridade e identidade também podem ser determinadas utilizando um dos

métodos disponíveis no pacote de *software* MatGAT (Campanella *et al.*, *BMC Bioinformatics*. 2003 Jul 10; 4: 29. MatGAT: uma aplicação que cria matrizes de similaridade/identidade utilizando sequências de proteínas ou de ADN). Pode ser executada uma pequena edição manual para otimizar o alinhamento entre motivos conservados, tal como será evidente para um perito na arte. Os valores de identidade da sequência, que são indicados no presente objeto da invenção sob a forma de uma percentagem, foram determinados ao longo de toda a sequência de aminoácidos, empregando o método BLAST com os parâmetros predefinidos.

[0059] Ao longo da descrição e das reivindicações, a palavra "compreende" e variantes da palavra não se destinam a excluir outras características técnicas, aditivos, componentes ou etapas. Objetos, vantagens e características adicionais da invenção tornar-se-ão evidentes para os peritos na arte após exame da descrição ou podem ser conhecidos através da colocação em prática da invenção. Os exemplos e desenhos a seguir apresentados são proporcionados a título ilustrativo e não se destinam a limitar a presente divulgação. Além disso, a presente divulgação abrange todas as possíveis combinações das formas de realização particulares e preferidas aqui descritas.

### **Breve descrição dos desenhos**

[0060] As figuras seguintes proporcionam formas de realização preferidas para ilustrar a descrição e não devem ser encaradas como limitadoras do âmbito da invenção.

[0061] **Figura 1: Tratamento em ratinhos de feridas excisionais comprometidas com dexametasona com LLKKK18.** Evolução do fecho das feridas em ratinhos C57BL/6 com cicatrização comprometida por dexametasona após tratamento com LLKKK18, quer diretamente

embebido em carbopol, quer conjugado com dextrina antes da inclusão em carbopol, durante 7 dias.

[0062] **Figura 2: Caracterização dos conjugados dextrina-LLKKK18.** (A) Perfil FT-IR de dextrina succinilada, revelando a presença de grupos éster em torno de  $1730\text{ cm}^{-1}$  (indicados por \*), comparativamente com dextrina não modificada. (B) Degradação da dextrina succinilada, conjugada ou não com LLKKK18 (DexSuc-LL18 e DexSuc, respetivamente) e dextrina não funcionalizada (Dex). (C) Libertação cumulativa de LLKKK18 (conjugado com dextrina) a partir do hidrogel de carbopol.

[0063] **Figura 3: Tratamento com LLKKK18 de feridas de queimaduras em ratos.** (A) Alterações macroscópicas, em termos do tamanho da ferida, ao longo do tempo após tratamento com o péptido, comparativamente com o tratamento apenas com o hidrogel. (B) Percentagem de fecho da ferida ao longo do tempo após rastreamento da ferida e análise ImageJ. Os dados no gráfico representam a média  $\pm$  D.P. para um  $n = 6$ .  $**p < 0,01$ , comparativamente com carbopol.

[0064] **Figura 4: Avaliação histológica de secções transversais de ferida de queimadura.** (A) Os tecidos a partir do dia 18 pós-lesão foram corados utilizando hematoxilina e tricromo de Eosin e Masson. Os tecidos tratados com LLKKK18 revelam um maior conteúdo de colagénio (azul), com fibrilas bem formadas. (B) Maior ampliação de tecidos equivalentes aos mostrados em (A).

[0065] **Figura 5: Regulação do estágio redox inicial em feridas de queimaduras.** Os efeitos do LLKKK18 sobre o *stress* oxidativo ocorrido durante os primeiros dias após a lesão foram avaliados analisando as atividades de enzimas antioxidantes e os níveis de peróxido de hidrogénio. (A) A superóxido dismutase (SOD) dismuta o radical superóxido, produzindo (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  no processo.

Este H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é, em seguida, removido pela atividade da (C) catalase e (D) glutathiona peroxidase. Os danos oxidativos sobre o (E) ADN, (F) lípidos e (G) proteínas também foram avaliados. Os dados representam a média ± D.P. de, pelo menos, três experiências independentes. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, comparativamente com carbopol. B = pele queimada.

[0066] **Figura 6: Estimulação da angiogénese pelo LLKKK18.** (A) Imagens representativas de secções de tecido queimado coradas com  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) no dia 9. (B) O número de vasos sanguíneos por área foi contado em, pelo menos, 10 campos diferentes. A (C) área e a (D) largura dos vasos sanguíneos foram calculadas utilizando o ImageJ. As barras representam a média ± D.P. \*p < 0,05, comparativamente com carbopol.

[0067] **Figura 7: Estimulação *in vivo* de angiogénese pelo LLKKK18 num modelo de rato.** (A) Ratinhos C57BL/6 foram injetados subcutaneamente diariamente, durante 4 dias, com PBS ou com 10  $\mu$ g de LLKKK18. No 5º dia, a área da injeção foi excisada, os vasos sanguíneos foram fotografados e o comprimento total dos microvasos foi medido. (B) Representação gráfica do comprimento total dos microvasos sanguíneos no 5º dia, calculado utilizando o *software* ImageJ. (C) Análise de imunomarcção dos níveis de caderina-endotelial vascular (VE-cadherin) para avaliar a estabilidade dos vasos sanguíneos recentemente formados. (D) Quantificação dos níveis de caderina-endotelial vascular. Os dados representam a média ± D.P. de, pelo menos, três experiências independentes. \*\*p < 0,01, comparativamente com PBS.

[0068] **Figura 8: Recrutamento de células inflamatórias pelo LLKKK18.** (A) Secções da ferida de queimadura dos dias 1 e 3 foram imunomarcadas para mieloperoxidase (MPO), um marcador de neutrófilos. (B) Quantificação de neutrófilos presentes em ambos os tratamentos, utilizando o *software* ImageJ. O LLKKK18

reduziu o recrutamento precoce de neutrófilos observado com o carbopol. Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de, pelo menos, três experiências independentes. **\*\*p < 0,01**, comparativamente com carbopol. **(C)** Foi realizada uma análise FACS de células marcadas com anticorpos CD80, CD86 e CD163. As células que revelaram níveis elevados de CD80 e CD86, mas baixos níveis de CD163, foram selecionadas como pertencendo ao fenótipo de macrófagos M1 e a percentagem de macrófagos M1 em cada ponto temporal foi calculada relativamente ao número total de células. **(D)** As células que eram CD163+ mas apresentavam baixos níveis de CD80 e CD86 foram consideradas macrófagos M2 e a respetiva percentagem relativamente ao número total de células foi representada graficamente.

[0069] **Figura 9. Níveis de quimiocinas e citocinas após tratamento das feridas de queimaduras com o LLKKK18.** Foi realizado um ensaio multiplex para medir os níveis de diferentes quimiocinas e citocinas: **(A)** Gro- $\alpha$ , que é uma citocina que atrai quimicamente neutrófilos; **(B)** proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), que recruta monócitos e, em seguida, os diferencia em macrófagos no tecido; **(C)** fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual estimula a angiogénese; **(D)** interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória; e **(E)** fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), o qual está envolvido em muitos processos biológicos diferentes, incluindo inflamação, angiogénese e produção e deposição de matrizes extracelulares. Os níveis de TGF- $\beta$  nos homogeneizados foram determinados empregando um ensaio ELISA. **\*p < 0,05**, **\*\*p < 0,01**, **\*\*\*p < 0,001**, comparativamente com carbopol. B = pele queimada.

### **Descrição detalhada**

Conjugados de dextrina-LLKKK18 (SEQ ID 1) embebidos em carbopol

Modificação da dextrina

[0070] A dextrina foi succinilada utilizando uma versão modificada de um método previamente descrito por Hreczuk-Hirst *et al.* (Hreczuk-Hirst D, Chicco D, German L, Duncan R. *Dextrins as potential carriers for drug targeting: tailored rates of dextrin degradation by introduction of pendant groups*. Int J Pharm 2001; 230: 57-66), baseado na introdução de um grupo carboxilo na cadeia principal de dextrina por via de uma ligação éster, numa reação catalizada por 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Resumidamente, 1 g ( $6,17 \times 10^{-3}$  mol) de dextrina (Tackidex®) com um peso molecular médio ( $M_w$ )  $\approx 2.000$  Da foi dissolvido em 10 ml de dimetilformamida anidro (DMF).

[0071] Podem ser utilizadas moléculas de dextrina com um peso médio entre 1.000 - 20.000 g/mol. Na verdade, as dextrinas de baixo peso molecular degradam-se mais rapidamente, sendo, por conseguinte, vantajosas no tratamento de feridas nas quais é necessária uma libertação relativamente rápida do péptido. Isto é importante ao utilizar o LLKKK18 (SEQ ID 1), por exemplo, dado se ter verificado que este péptido exerce os seus efeitos principalmente durante as fases iniciais da cicatrização da ferida. Além disso, os pesos moleculares médios da maioria das dextrinas comercialmente disponíveis estão dentro desta gama.

[0072] A succinilação da dextrina foi obtida, em particular, por adição subsequente de anidrido succínico (370,2 mg,  $3,70 \times 10^{-3}$  mol) e DMAP (28,6 mg,  $2,34 \times 10^{-4}$  mol). O frasco com os reagentes foi purgado, em particular, com azoto, selado e deixado em agitação a 50 °C durante 48 horas. A mistura de reação foi em seguida vertida para 250 ml de éter dietílico e deixada em agitação vigorosa durante a noite, à temperatura ambiente. O éter foi removido por filtração sob vácuo e os



resíduos sólidos foram dissolvidos em 10 ml de água destilada. A solução foi dialisada, em particular, com 2 litros de água destilada durante 6 horas, sendo a água substituída de 2 em 2 horas, numa membrana de diálise com uma interrupção do peso molecular de 1000 g/mol. A solução dialisada foi, em particular, seca por congelação e mantida à temperatura ambiente até à utilização. Foi obtido um rendimento final de cerca de 90 - 95%. A relação dos reagentes utilizados foi otimizada para resultar numa dextrina modificada que: 1) apresentasse grupos funcionais suficientes para se ligar ao LLKKK18, o que, neste caso, corresponderia a uma succinilação entre 5 - 10% mol, e 2) fosse capaz de retardar a degradação por amílases, por forma a proporcionar uma libertação sustentada do péptido. A % de succinilação de mol, ou seja, o número de monómeros de glucose ativados por anidrido succínico por 100 monómeros, foi determinada por titulação da dextrina succinilada com NaOH. Devido à tendência do NaOH para absorver CO<sub>2</sub> da atmosfera, as péletes de NaOH foram primeiramente secas e tituladas com anidrido ftálico, antes de serem utilizadas para titular a dextrina succinilada. Foi obtido um lote com succinilação de 8,8% mol, sendo utilizado para todas as experiências subseqüentes. A succinilação da dextrina foi confirmada por Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FT-IR - Fourier Transformed Infrared Spectroscopy). Resumidamente, 2,5 mg de dextrina não modificada ou succinilada foram misturados com cerca de 200 mg de brometo de potássio. Após maceração, as misturas foram submetidas a alta pressão, por forma a criar comprimidos. Em seguida, o espectro de infravermelhos (IV) foi registado num espectrofotómetro Bomem MB 104 (Biotools, Espanha).

Conjugados de dextrina-LLKKK18

[0073] O LLKKK18 (SEQ ID 1) foi conjugado com dextrina, utilizando uma versão modificada de um método previamente

descrito no documento WO2012035310, baseado na ligação das aminas livres do péptido aos grupos carboxilo livres na cadeia principal da dextrina succinilada (DexSuc), o que resulta na formação de um amido. Resumidamente, 50 mg ( $2,92 \times 10^{-4}$  mol de DexSuc, correspondendo a  $2,6 \times 10^{-5}$  mol de COOH) de dextrina succinilada foram primeiramente dissolvidos em 1 ml de dH<sub>2</sub>O. 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (4 mg,  $2,6 \times 10^{-5}$  mol) e N-hidroxisuccinimida (3 mg,  $2,6 \times 10^{-5}$  mol) foram, em seguida, adicionados à mistura e deixados em agitação durante 30 minutos. O LLKKK18 (1,2 mg,  $5,15 \times 10^{-7}$  mol), dissolvido em 1 ml de dH<sub>2</sub>O, foi subsequentemente adicionado à solução anterior e o pH foi elevado até ~8,0 por adição gota a gota de NaOH. Preferencialmente, a relação molar entre a dextrina e o LLKKK18 varia entre 1:500 e 1:600. A mistura de reação foi deixada em agitação durante a noite (~16 horas). Os conjugados foram separados do péptido não ligado por passagem por uma coluna de dessalinização HiPrep 26/10 (GE Healthcare, Reino Unido), utilizando água destilada como eluente. O produto foi seco por congelação e mantido a -80 °C até à utilização. A presença dos conjugados ( $M_w \approx 4.300$  Da) foi detetada através de quantificação da quantidade de açúcares redutores presentes nas frações colhidas através do ensaio DNS (após tratamento das frações com  $\alpha$ -amílase) e determinando a quantidade de péptido pelo método de Waddell.

Inclusão dos conjugados de dextrina-LLKKK18 em carbopol

[0074] Por último, os conjugados de dextrina-LLKKK18 (SEQ ID 1) foram incorporados num hidrogel Carbopol® 974 NF (Lubrizol, Ohio, EUA).

[0075] Preferencialmente, a concentração final de LLKKK18 (SEQ ID 1) em carbopol varia entre 1 e 20  $\mu$ M. Mais particularmente, deve ser de 10 - 12  $\mu$ M.

[0076] Foi preparada uma solução de 0,5% de carbopol em água destilada, a 50 °C durante 1 hora, com agitação. A quantidade pretendida de conjugado foi adicionada à solução até dissolução completa e a mistura foi neutralizada pela adição gota a gota de NaOH até se atingir um pH de 6 - 6,5.

Confirmação da modificação da dextrina

[0077] A succinilação da dextrina foi confirmada por Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FT-IR - Fourier Transformed Infrared Spectroscopy). Resumidamente, 2,5 mg de dextrina não modificada ou succinilada foram misturados com cerca de 200 mg de brometo de potássio. Após maceração, as misturas foram submetidas a alta pressão, por forma a criar comprimidos. Em seguida, o espectro de infravermelhos (IV) foi registado num espectrofotómetro Bomem MB 104 (Biotoools, Espanha).

Degradação da dextrina por amílases

[0078] Para avaliar a degradação da dextrina succinilada por amílases, 1U de  $\alpha$ -amílase (Sigma-Aldrich) foi adicionada a uma solução de 3 mg/ml de dextrina não modificada ou succinilada, ou de conjugados de dextrina-LLKKK18, preparada em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Um volume de 100  $\mu$ l foi imediatamente colhido ( $t = 0$  horas) e o volume final refeito com 100  $\mu$ l de PBS. Todas as soluções foram incubadas a 37 °C e, a pontos temporais definidos, foram colhidos 100  $\mu$ l de cada amostra e o volume final refeito. As amostras foram congeladas a -80 °C até quantificação da dextrina degradada. Isto foi realizado utilizando o ensaio de açúcares redutores com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme previamente descrito. Para este teste, foram adicionados 100  $\mu$ l de DNS a cada amostra de 100  $\mu$ l em tubos de vidro. Os tubos foram fervidos durante 5 minutos, findos os quais foi adicionado 1 ml de dH<sub>2</sub>O fria para parar a reação. Em seguida, a absorvância das amostras

foi lida a 540 nm num leitor de microplacas (Biotek Synergy HT, Alemanha) e a concentração da dextrina degradada foi determinada por comparação com a curva padrão da glucose.

#### Cinética da libertação

[0079] Numa forma de realização, a avaliação da cinética da libertação do LLKKK18 a partir do hidrogel foi realizada em câmaras Transwell® com placas de 24 poços, com um poro de 8 µm (Corning, MA, EUA). Uma quantidade de 9-10 mg de conjugado de dextrina-LLKKK18 foi incorporada em 500 µl de hidrogel carbopol, o qual, em seguida, foi colocado na câmara superior do Transwell®. Esta câmara foi colocada em contacto direto com 500 µl de PBS que foram adicionados ao poço inferior. Após libertação do carbopol, os conjugados migraram da câmara superior para o poço inferior. Foi colhida uma amostra de 100 µl do poço inferior imediatamente após a colocação da câmara superior em contacto com a solução PBS (t = 0 horas) e a pontos temporais definidos daí em diante. De cada vez, o volume foi refeito com PBS até atingir os 500 µl. As proteínas foram quantificadas utilizando um *kit* de ensaio de proteínas Micro BCA (Thermo Fisher, Ottawa, Canadá). Foi executado um branco contendo apenas o gel de carbopol, não tendo sido detetada qualquer interferência por parte do hidrogel.

[0080] O espectro FT-IR confirmou o sucesso da succinilação da dextrina (Fig. 2A). Na verdade, o espectro da dextrina succinilada revela um pico de transmitância em torno dos 1730 cm<sup>-1</sup>, o qual está ausente na dextrina não modificada e é típico para os grupos éster inseridos na cadeia principal da dextrina. Picos característicos da dextrina estão igualmente presentes em ambas as condições, em torno dos 3390 cm<sup>-1</sup> (OH) e dos 2927 cm<sup>-1</sup> (CH, CH<sub>2</sub>).

[0081] Numa forma de realização, uma dextrina modificada com succinilação de 8,8 % mol foi utilizada para conjugar o

LLKKK18, e a reação resultou na ligação de ~50% do péptido inicial adicionado. A degradação *in vitro* da dextrina succinilada e dos respetivos conjugados de péptidos ocorreu a um ritmo muito mais lento do que o verificado com a dextrina não ativada (Fig. 2B). Isto é importante para uma libertação lenta, sustentada, do LLKKK18, mediante contacto com amílases nas feridas. A conjugação do péptido não inviabilizou mais a degradação da dextrina funcionalizada. De igual modo, a libertação dos conjugados do hidrogel foi realizada num sistema que simulava o ambiente da superfície de uma ferida, utilizando uma câmara Transwell. Conforme representado na Fig. 2C, o péptido presente no hidrogel de carbopol passa por um pico de libertação de até ~35% durante os primeiros 2 dias, mas depois diminui para uma libertação mais lenta até ao dia 35.

[0082] Numa forma de realização, a conjugação de LLKKK18 com dextrina protege o péptido de ser rapidamente degradado no ambiente agressivo do tecido da ferida de queimadura, ao mesmo tempo que possibilita a sua libertação sustentada ao longo do tempo, pois a exposição da dextrina à elevada concentração de  $\alpha$ -amílases na ferida resulta na degradação da sua cadeia principal, com subsequente libertação do péptido. Um grau de modificação da dextrina de 8,8 % mol foi suficiente para retardar a degradação desta molécula por  $\alpha$ -amílases. Além disso, a incorporação dos conjugados nos hidrogéis Carbopol® apresenta várias vantagens, dado proporcionar o ambiente húmido necessário no local da ferida, contribuir para a retirada de tecidos mortos da ferida por reidratação de tecido não viável e, também, servir de veículo para a aplicação tópica dos conjugados. Adicionalmente, contribui para a lenta libertação dos conjugados ao longo do tempo, conduzindo a uma substituição mais espaçada do penso. Na verdade, os resultados demonstram que o péptido libertado a partir dos conjugados,

comparativamente com os controlos tratados apenas com o hidrogel, ajuda a acelerar o processo de cicatrização, para além de contribuir para a deposição adequada de colagénio, com melhor formação de fibras, no tecido de granulação (Figs. 3-4).

[0083] As queimaduras ativam uma miríade de respostas sistémicas, incluindo um aumento do ritmo metabólico, um maior gasto de energia, uma degradação mais rápida de proteínas, lípidos e polissacarídeos, imunodeficiência e atraso na cicatrização da ferida, processos que são mediados, sobretudo, por espécies reativas ao oxigénio (ROS - Reactive Oxygen Species) e neutrófilos ativados. O LLKKK18 reduziu esta sobrecarga oxidativa inicial, conforme demonstrado pelos níveis mais baixos de  $H_2O_2$  e de enzimas antioxidantes, em particular a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx) (Fig. 5A-D), bem como pelo menor recrutamento de neutrófilos para o tecido da ferida. Em resultado da redução do *stress* oxidativo, os danos nas principais biomoléculas celulares, em particular nos lípidos, também diminuíram na presença do LLKKK18, comparativamente com o hidrogel aplicado isoladamente (Fig. 5E-G). Isto é de enorme importância, pois pode ajudar a recuperar a ferida e a reparar os tecidos mais rapidamente.

[0084] Foi observado um aumento inesperado do *stress* oxidativo no dia 9, no seguimento de um aumento significativo dos níveis de SOD e de  $H_2O_2$ . Contudo, não foram induzidos quaisquer danos ao nível do ADN, lípidos ou proteínas, o que pode estar relacionado com o aumento da atividade da catalase, contrariando a produção de  $H_2O_2$  ao convertê-lo em água. Relativamente à atividade da GPx, observou-se ao longo do tempo uma tendência similar entre as feridas tratadas com LLKKK18 e as feridas tratadas com hidrogel, o que sugere que o péptido

exerce pouca ou nenhuma influência sobre a atividade desta enzima antioxidante.

[0085] As reações de oxidação há muito que são associadas à reticulação do colagénio na presença de elevadas concentrações de glucose. Um estudo conduzido por Elgawish e colegas proporcionou evidências do papel fulcral desempenhado pelo  $H_2O_2$  na reticulação do colagénio e na estabilidade térmica *in vivo*. Os autores acompanharam a cinética da glicação no tecido em tendões implantados em ratos diabéticos, tendo concluído que a glicoxidação e reticulação mais rápidas ocorreram 30 dias após o surgimento da diabetes, ou seja, na altura em que foi detetada a elevada glicação no tecido. No entanto, quando foi injetada catalase ou outros antioxidantes, a reticulação do colagénio foi suprimida. Também foi reportado que o elevado gasto de energia observado em queimaduras aumenta a glicogenólise, com uma subsequente produção de glucose melhorada que resulta num estado hiperglicémico. Neste sentido, é razoável considerar que a formação de peróxido de hidrogénio induzida pelo LLKKK18 em feridas de queimaduras ao 9º dia pode, na verdade, estar a acelerar a reticulação do colagénio, contribuindo assim para uma remodelação mais rápida da matriz extracelular.

[0086] A angiogénese, a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, constitui um fator importante para a adequada cicatrização das feridas de queimaduras, dado o maior ritmo metabólico observado em tais feridas exigir o rápido e eficiente transporte de nutrientes, células inflamatórias, citocinas e quimiocinas para o local da ferida. Embora já tenham sido atribuídas propriedades pró-angiogénicas ao LL37, não tinham sido registados quaisquer dados sobre a capacidade do LLKKK18 para induzir a angiogénese.

[0087] Aqui revelou-se o claro efeito pró-angiogénico do LLKKK18 *in vivo*, dado ter induzido, em comparação com o hidrogel isoladamente, um aumento três vezes superior em termos da densidade dos microvasos recentemente formados (Fig. 6A-D). Esta propriedade foi ainda confirmada num modelo de ratinho. De forma similar aos achados no modelo de rato, observou-se um acentuado efeito angiogénico na presença do LLKKK18 (Fig. 7A-C). Além disso, como algumas vezes os novos vasos apresentam fugas, condicionando assim o transporte de substâncias para o local da ferida e aumentando o edema, quantificámos os níveis de caderina vascular endotelial (em inglês *VE-cadherin*), uma proteína envolvida na regulação da permeabilidade vascular e na estanquidade dos vasos. A expressão da caderina vascular endotelial revelou-se maior na presença do LLKKK18, indicando que este péptido melhorou a integridade e estabilidade dos microvasos recentemente formados.

[0088] Durante os primeiros dias após a lesão, desenvolve-se uma resposta inflamatória no tecido queimado, iniciando a migração e proliferação de células, bem como a depuração de detritos celulares. Mais importante ainda, o equilíbrio da humidade, tal como o proporcionado pelo hidrogel, foi reportado como sendo crucial para a cicatrização, dado o ambiente húmido facilitar a ação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Na verdade, os níveis de oncogene-alfa regulada pelo crescimento (*Gro- $\alpha$* ), uma citocina quimioatratante de neutrófilos, revelaram-se menores durante os primeiros 3 dias em queimaduras tratadas com LLKKK18 (Fig. 9A). De igual modo, a imunocoloração revelou um número muito menor de neutrófilos nas feridas tratadas com LLKKK18 no primeiro dia (Fig. 8A-B).

[0089] Durante os primeiros dias após a lesão, o LLKKK18 libertado dos conjugados com dextrina estimula uma resposta inflamatória mais baixa do que o hidrogel de carbopol aplicado



isoladamente (Fig. 8C-D). Para além da diminuição dos níveis de Gro- $\alpha$  e do número de neutrófilos, foi detetada uma menor concentração da proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) (Fig. 9B). A MCP-1 é uma citocina pró-inflamatória conhecida por recrutar monócitos que se diferenciam em macrófagos no local da ferida. Os macrófagos podem adaptar-se facilmente a diferentes funções biológicas devido à sua plasticidade, trocando de fenótipo em função dos sinais que os rodeiam. Em traços gerais, e dependendo da via de ativação, os macrófagos podem ser macrófagos do tipo M1 (classicamente ativados) ou do tipo M2 (alternativamente ativados). Os macrófagos M1, que são induzidos por lipopolissacarídeos (LPS) ou por interferão gama (IFN- $\gamma$ ), são caracterizados como pró-inflamatórios e provocam uma resposta do tipo 1. Por outro lado, os macrófagos M2 provocam uma resposta anti-inflamatória estimulada pela IL-4, IL-13 ou IL-10 [22]. Os nossos dados mostram que o tratamento com LLKKK18 resulta no recrutamento precoce de macrófagos M2, sugerindo uma resolução mais rápida do estágio inflamatório e uma potencial regulação da angiogénese através da alteração dos macrófagos M2. Na verdade, foi demonstrado que os macrófagos M2 apresentam um potencial angiogénico mais elevado quando comparados com outros subconjuntos. De forma consistente com estes achados, os níveis de IL-10 também se revelaram mais elevados na presença de LLKKK18 durante os primeiros dias após a lesão (Fig. 9D). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória cuja importante influência sobre a polarização de macrófagos e respetiva capacidade para regular a angiogénese já foi anteriormente reportada. Além disso, a concentração de VEGF aumentou quase em simultâneo nas feridas tratadas com LLKKK18 (Fig. 9C). O VEGF tem sido descrito como um dos mais importantes estimuladores da angiogénese e da vasopermeabilidade, sendo produzido por macrófagos em resultado do ambiente hipóxico da queimadura, para estimular

a migração e proliferação de células endoteliais. O aumento do número de macrófagos M1 que ocorre no 9º dia nas feridas tratadas com LLKKK18 pode estar relacionado com a maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De facto, foi reportado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modula a expressão de leucócitos e a adesão de moléculas de adesão endotelial.

[0090] O TGF- $\beta$  participa em diferentes funções celulares, incluindo a inflamação, a estimulação da angiogénese, a síntese de colagénio e a remodelação tecidular. O seu envolvimento nestes processos pode, pelo menos parcialmente, explicar a regulação ascendente e descendente dos níveis desta citocina, que foram observados durante a progressão da cicatrização das feridas (Fig. 9E). Wang e colegas reportaram a rápida regulação ascendente dos níveis de TGF- $\beta$  após a lesão, sugerindo que o mesmo é responsável pelo início da inflamação, juntamente com outras citocinas, como a MCP-1, e a formação de tecido de granulação. De facto, verificámos um aumento inicial dos níveis de TGF- $\beta$  nas feridas de controlo. No entanto, o LLKKK18 manteve esta citocina em níveis normais para a pele, confirmando assim a redução da resposta inflamatória provocada por este péptido. Além disso, a maior expressão de TGF- $\beta$  observada 18 dias após a queimadura pode estar relacionada com o papel desempenhado pelo TGF- $\beta$  na remodelação tecidular. Na verdade, sabe-se há algum tempo que o TGF- $\beta$  libertado pelas células inflamatórias estimula os fibroblastos a contrair a matriz da ferida e estimula a produção de colagénio e de fibronectina, reforçando assim o tecido da ferida.

[0091] A divulgação não deve ser encarada de forma alguma como estando restringida às formas de realização descritas e uma pessoa com conhecimentos normais na arte irá prever muitas possibilidades de modificação das mesmas.

[0092] As formas de realização acima descritas são combináveis.

[0093] As reivindicações seguintes definem mais aprofundadamente formas de realização particulares da divulgação.

Data: 11 de outubro de 2016

## R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1. Uma composição caracterizada por compreender:  
pelo menos um polímero selecionado da seguinte lista:  
polímero de dextrina, polímero compreendendo carbómero,  
ou suas misturas e;  
pelo menos um péptido antimicrobiano compreendendo pelo  
menos uma sequência 95% idêntica à sequência SEQ. ID 1,  
em particular idêntica à SEQ ID 1.;  
com uma quantidade terapeuticamente eficaz de todos  
componente anteriores.
2. A composição de acordo com a reivindicação precedente em  
que o péptido antimicrobiano é conjugado com o referido  
polímero, em particular dextrina.
3. A composição de acordo com qualquer uma das  
reivindicações anteriores em que o polímero  
compreendendo carbómero é carbopol.
4. A composição de acordo com qualquer uma das  
reivindicações 2-3 em que o péptido antimicrobiano  
conjugado é embebido em carbopol.
5. A composição de acordo com qualquer uma das  
reivindicações anteriores em que a concentração de  
péptido antimicrobiano é entre 1 -20  $\mu\text{M}$ , em particular  
10 - 12  $\mu\text{M}$ .
6. A composição de acordo com qualquer uma das  
reivindicações anteriores em que a referida concentração  
de dextrina é entre 0,5 - 10 mg/ml, em particular 2 - 3  
mg/ml.

7. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que o referido polímero dextrina tem um peso molecular entre 1.000-20.000 g/mol.
8. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que o referido polímero dextrina tem um peso molecular entre 1.000-5.000 g/mol.
9. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que a referida concentração de polímero carbómero é entre 0,2 - 1% (p/v), em particular 0,4 - 0,6% (p/v).
10. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores compreendendo ainda uma pluralidade de hidrogéis.
11. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que o segundo ou mais hidrogéis são selecionados de uma lista consistindo em carbopol, matrigel, ácido hialurónico, dextrano, alginato, colagénio, ou suas misturas.
12. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a composição é uma formulação tópica ou uma formulação injetável.
13. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a formulação tópica é um gel, um creme ou uma loção.
14. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores compreendendo ainda um agente anti-inflamatório, um agente antisséptico, um agente antipirético, um agente anestésico, um agente terapêutico, ou suas misturas.

15. Um péptido antimicrobiano caracterizado por compreender uma sequência 95% idêntica à sequência SEQ ID No. 1, ou a uma porção/fragmento para o uso no tratamento de feridas em mamíferos.
16. A composição descrita em qualquer uma das reivindicações anteriores para o uso em medicina ou cosmética.
17. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16, para o uso no tratamento de feridas em mamíferos, em particular mamíferos diabéticos.
18. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16, para o uso no tratamento de doenças isquêmicas e vasculares.
19. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16, para o uso no tratamento de feridas superficiais ou de espessura parcial.

Data: 11 de outubro de 2016

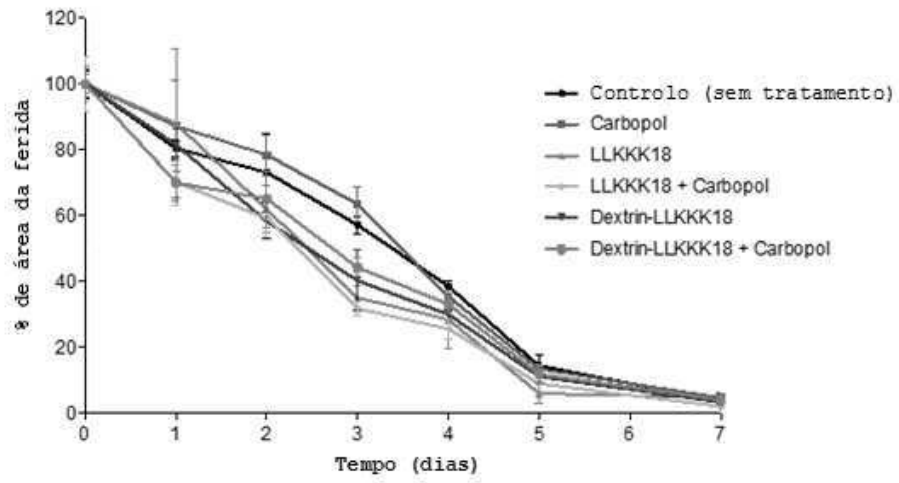


Fig. 1

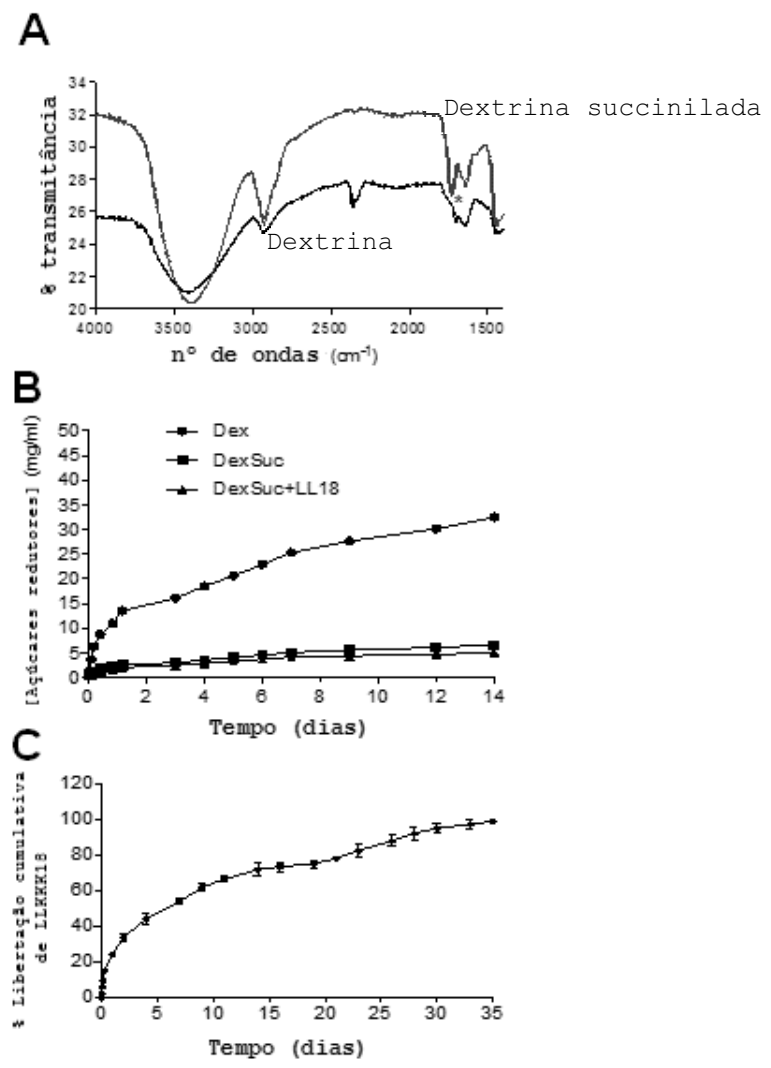


Fig. 2

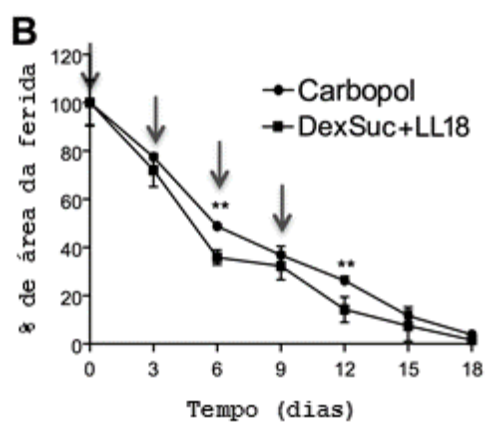


Fig. 3



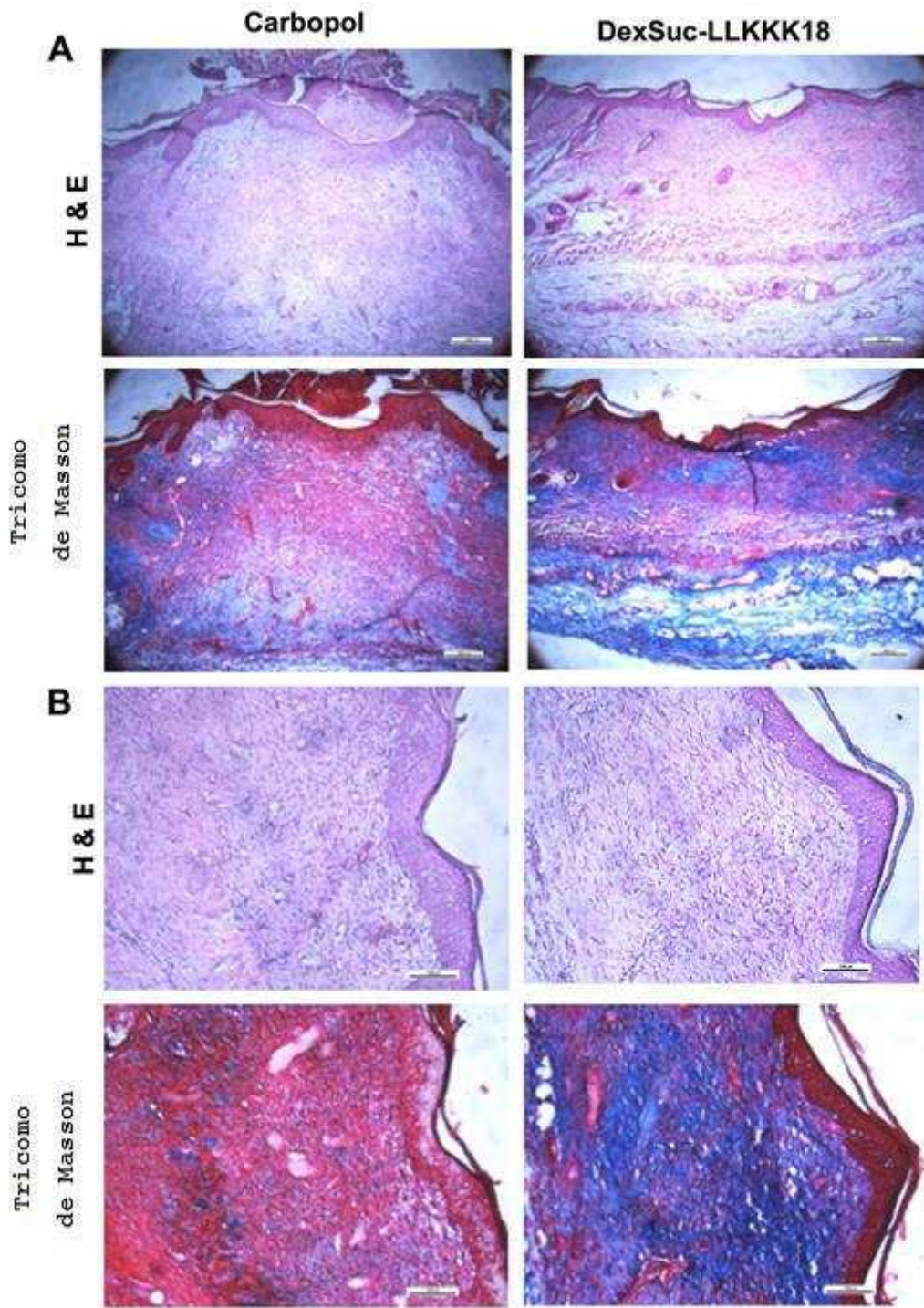


Fig. 4

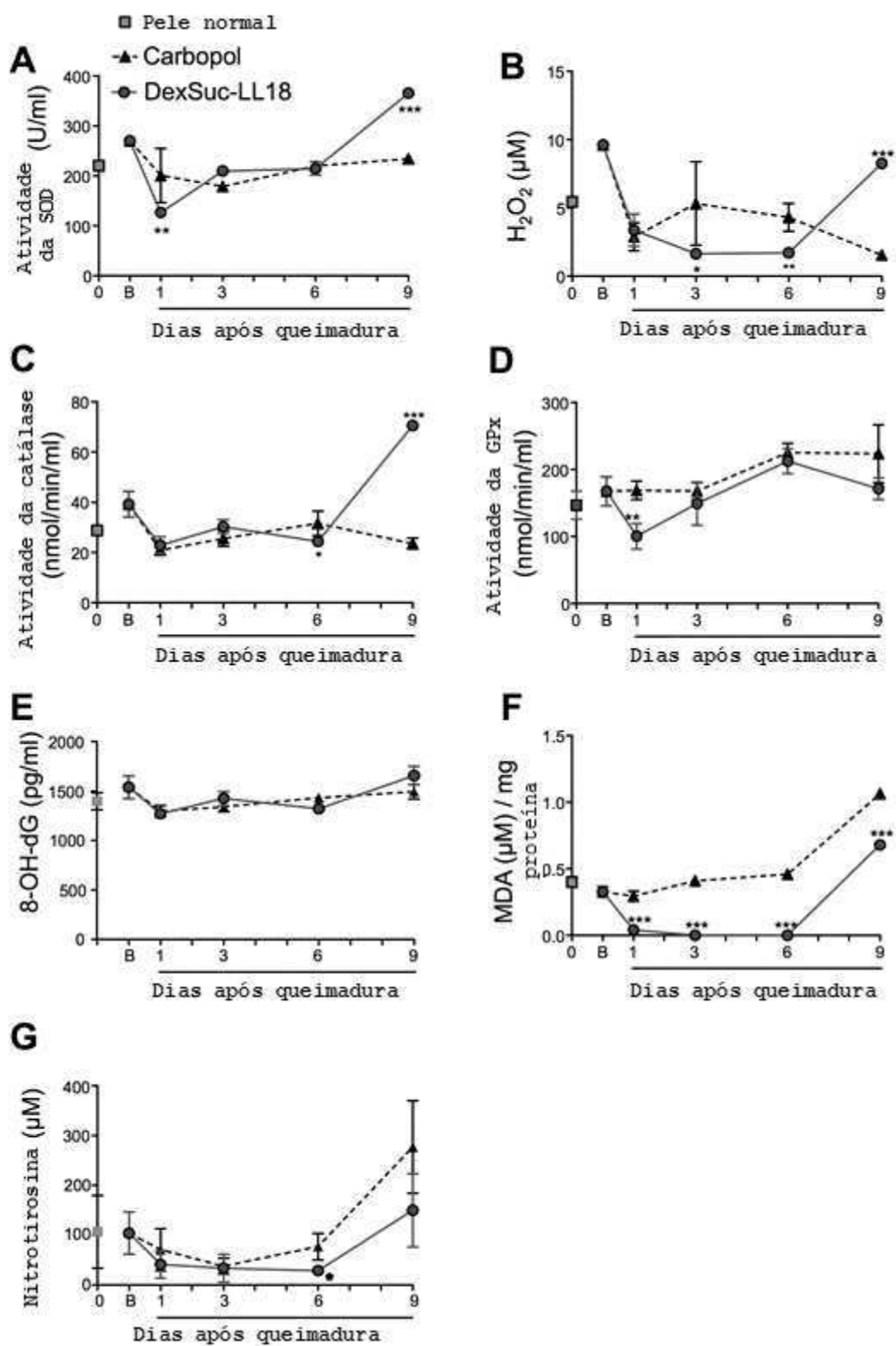


Fig. 5

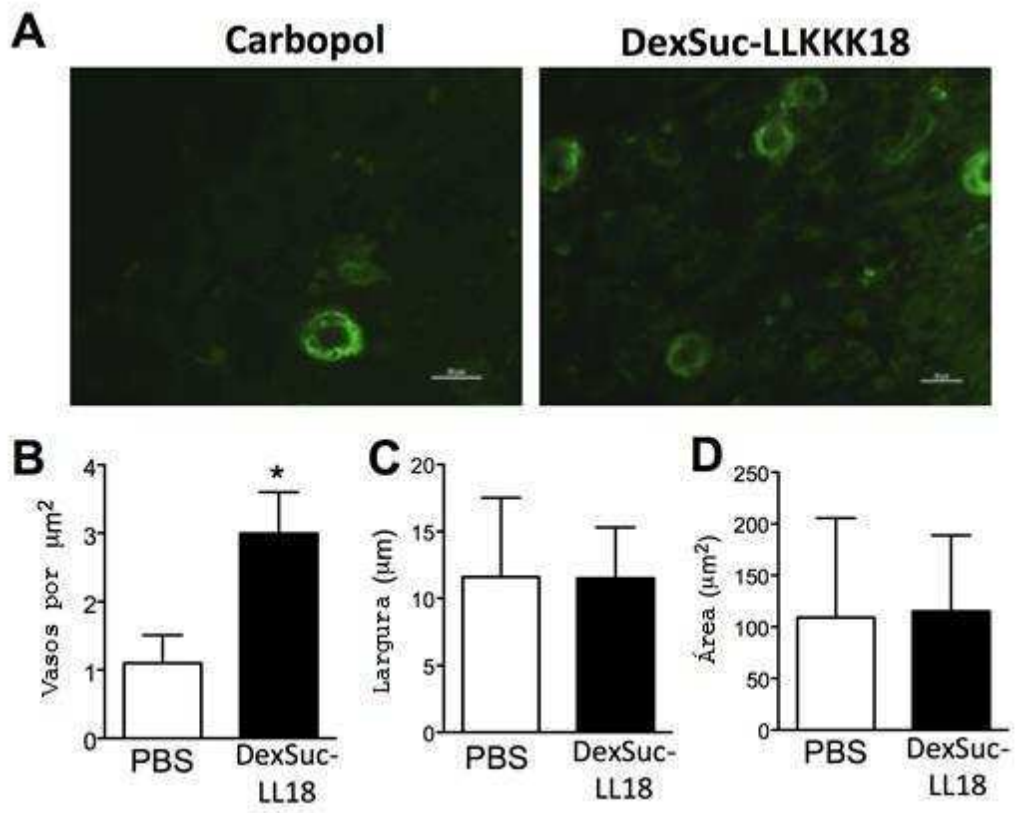
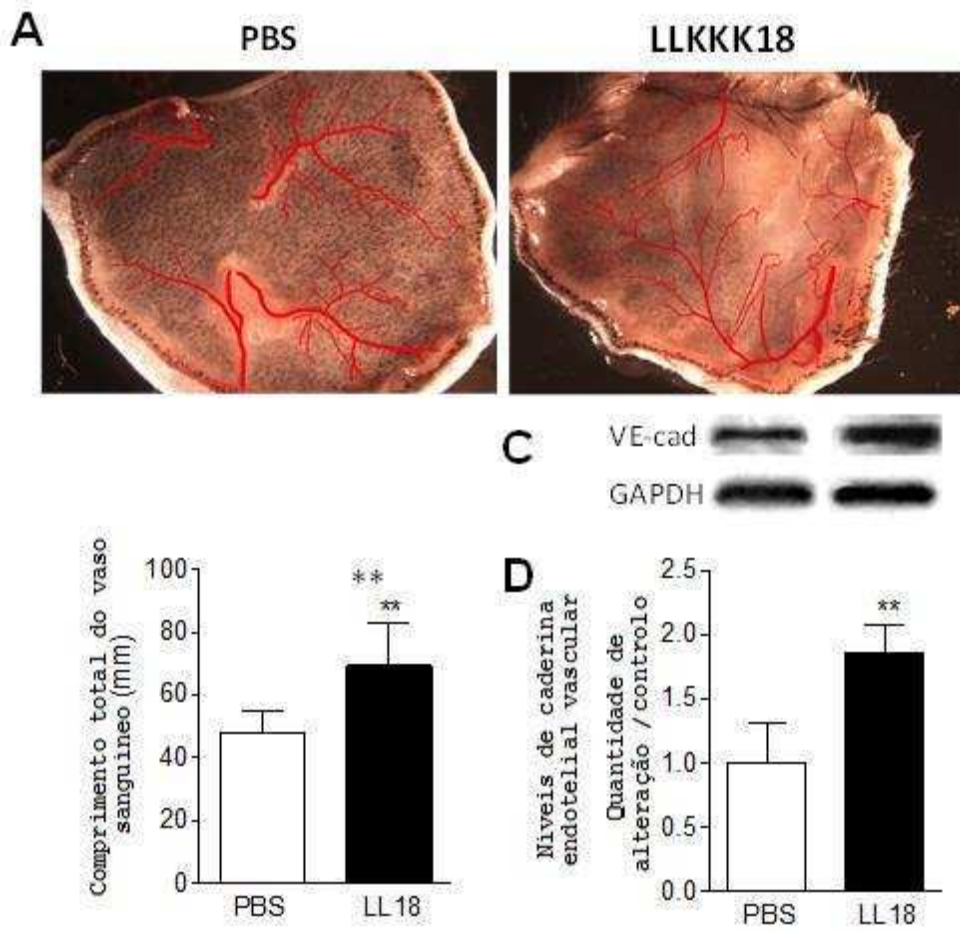


Fig. 6



**Fig. 7**

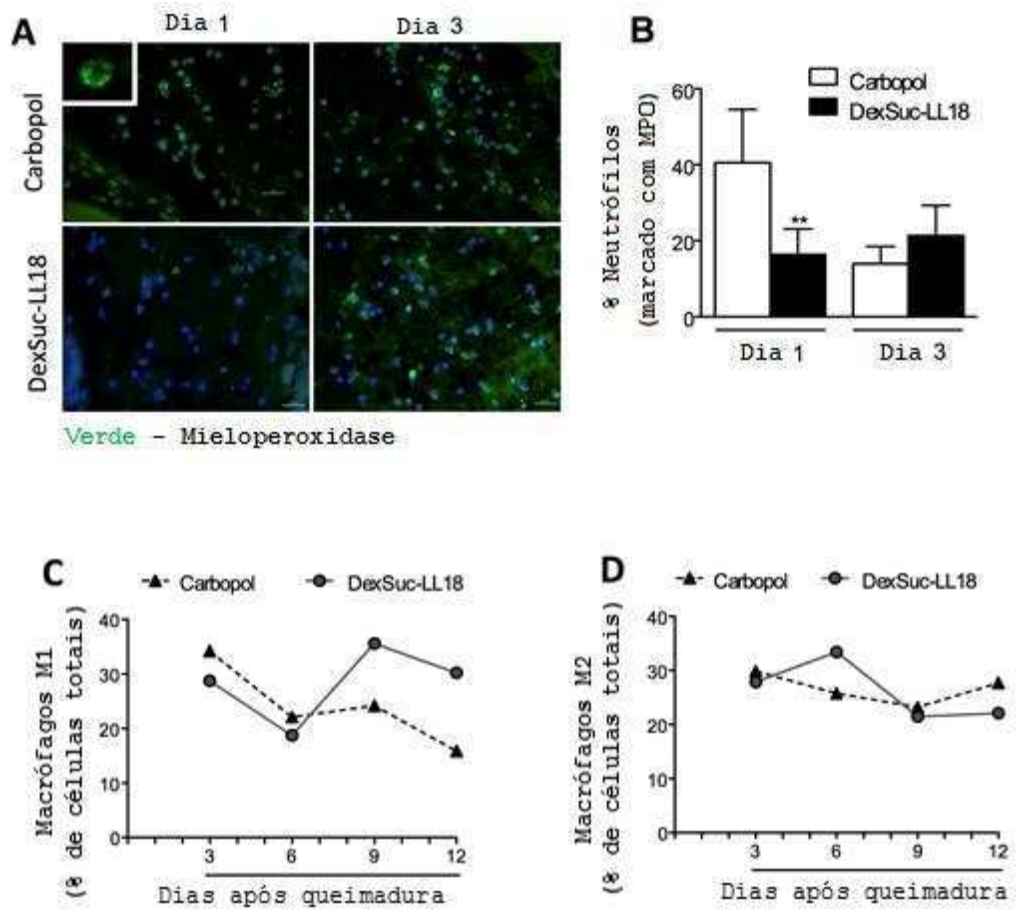


Fig. 8

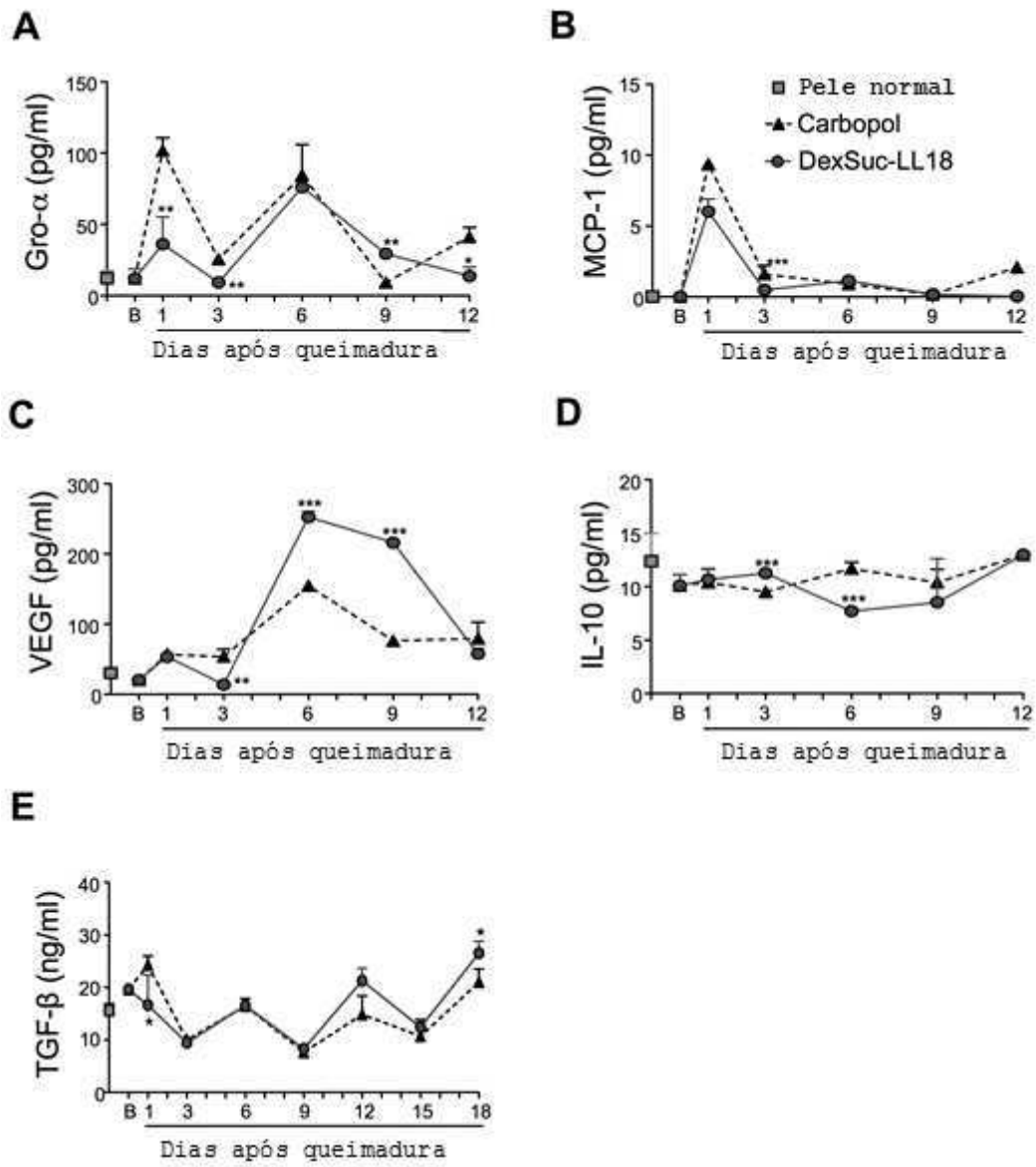


Fig. 9