

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 254**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2009 E 09700525 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2244724**

54 Título: **Uso de péptidos para estimular la cicatrización de heridas**

30 Prioridad:

07.01.2008 EP 08075012

30.10.2008 NL 2002152

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

17.08.2015

73 Titular/es:

RAPID PATHOGEN SCREENING, INC. (100.0%)

7227 Delainey Court

Sarasota, FL 34240, US

72 Inventor/es:

BOLSCHER, JOHANNES GERHARDUS MARIA;

VAN NIEUW AMERONGEN, ARIE;

VEERMAN, ENGELMUNDUS CORNELIS

IGNATUS;

UDHOFF, MENNO JOHANNES;

NAZMI, KAMRAN;

VAN DEN KEIJBUS, PETRONELLA ADRIANA

MARIA y

VAN'T HOF, WILLEM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 254 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

Uso de péptidos para estimular la cicatrización de heridas

La presente descripción se refiere al uso de un péptido para la preparación de un medicamento para la regeneración de tejidos, para el tratamiento de la piel y/o para el tratamiento de una herida. Además, la descripción se refiere a estos péptidos y a las composiciones que los comprenden, y al uso de dichos péptidos en aplicaciones médicas y no médicas (cosméticas).

Durante la vida de cualquier ser animal, se producen inevitablemente heridas, y pueden ser consecuencia de una amplia diversidad de sucesos, tales como el contacto con objetos afilados o calientes, o aparecer en ciertos trastornos clínicos, tales como la diabetes.

Otro ejemplo clínico importante es el desarrollo de úlceras de decúbito, es decir, lesiones provocadas por una presión no mitigada sobre cualquier parte del cuerpo, en especial de porciones sobre áreas óseas o cartilaginosas. Aunque son completamente tratables si se descubren en una fase temprana, las úlceras de decúbito, sin atención médica, como cualquier otra herida, pueden llegar a ser mortales.

En el caso de un estado de salud general reducida, el cierre (cicatrización) de las heridas puede retrasarse, y puede provocar otros problemas, tales como infecciones, inflamación, necrosis de tejidos, y el cierre ineficaz de una herida vuelve a ser, de nuevo, potencialmente mortal.

No resulta sorprendente que gran cantidad de investigaciones se hayan dirigido a comprender los mecanismos que son importante para el cierre (cicatrización) de las heridas y la reparación de tejido dañado, que incluye piel dañada, puesto que es inevitable que el cierre rápido de las heridas sea importante para la salud humana y animal.

En efecto, en la actualidad se entienden mejor los mecanismos implicados (véase, por ejemplo, el excelente artículo de Martin *et al.*, Science, vol. 276, 75 (1997)).

En general, la cicatrización de heridas se describe como consistente en tres fases, concretamente, la fase inflamatoria, la fase proliferativa, y la fase de maduración (denominadas fase inflamatoria aguda, síntesis de matriz extracelular y de colágeno, y remodelación (Peacock, E. E., Jr., Wound Repair, 2ª edición, W. B. Saunders, Filadelfia (1984)).

La secuencia del proceso de cicatrización se inicia durante una fase inflamatoria aguda con el depósito de tejido provisional. A esto le sigue una reepitalización, la síntesis y depósito de colágeno, la proliferación de fibroblastos, y una neovascularización, todo lo cual define en última instancia el depósito de tejido provisional. A esto le sigue una reepitalización, la síntesis y depósito de colágeno, la proliferación de fibroblastos, y una neovascularización, todo lo cual define en última instancia la fase de remodelación (Clark, R. A. F., J. Am. Acad. Dermatol., 13:701 (1985)).

Estos acontecimientos se ven influidos por factores del crecimiento y citoquinas segregadas por células inflamatorias o por las células localizadas en los bordes de la herida (Assoian, R. K. *et al.*, Nature (Lond.), 309:804 (1984); Nemeth, G. G. *et al.*, "Growth Factors and Their Role in Wound and Fracture Healing," Growth Factors and Other Aspects of Wound Healing in Biological and Clinical Implications, Nueva York (1988), pp. 1-17).

La fase inflamatoria se caracteriza por una hemostasis e inflamación. El colágeno expuesto durante la formación de la herida activa la cascada de la coagulación (tanto la vía intrínseca como la extrínseca), iniciando la fase inflamatoria. Las plaquetas, la primera célula de respuesta, liberan múltiples quimioquinas que ayudan a estabilizar a la herida mediante la formación del coágulo. Estos mediadores actúan para controlar el sangrado y limitar el alcance de la lesión. La segunda célula de respuesta que migra hacia la herida, los neutrófilos, son responsables de la captación de residuos, la opsonización mediada por el complemento de bacterias, y la destrucción de bacterias mediante mecanismos de estallido oxidativo (es decir, formación de superóxido y peróxido de hidrógeno). Los macrófagos son fundamentales para la cicatrización de las heridas. Numerosas enzimas y citoquinas son segregadas por los macrófagos, lo cual marca la transición al proceso de reconstrucción del tejido, es decir, la fase proliferativa.

Durante la fase proliferativa, la epitelización, la angiogénesis, la formación de tejido de granulación y el depósito de colágeno son las etapas principales en la cicatrización de heridas. La epitelización aparece en una fase temprana de la reparación de heridas. La angiogénesis, estimulada, por ejemplo, por TNF-alfa, se advierte por la migración de células endoteliales y la formación de capilares. Los nuevos capilares transportan nutrientes hacia la herida y ayudan a mantener el lecho del tejido de granulación. La parte final de la fase proliferativa es la formación de tejido granulación. Los fibroblastos se diferencian y producen sustancia basal y después colágeno. La sustancia basal se deposita en el lecho de la herida; después, el colágeno se deposita a medida que la herida se somete a la fase final de reparación. Muchas citoquinas diferentes, que incluyen PDGF, el factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF) y

EGF, están implicadas en la fase proliferativa de la reparación de heridas. Durante la fase de maduración, la herida sufre una contracción que da como resultado, en último término, que se aprecie una cantidad menor de tejido cicatricial.

A partir de lo anterior, resulta obvio que la cicatrización adecuada de una herida implica una interacción compleja de células y sustancias, tales como citoquinas, que actúan en concierto. Basándose en la investigación básica, se han propuesto muchos fármacos, sustancias y procedimientos de tratamiento para estimular la cicatrización de heridas.

En efecto, la manipulación del proceso de cicatrización a través del suministro a la herida de agentes que son contribuyentes (naturales) al proceso de cicatrización es un concepto atractivo. Los estudios experimentales tempranos que evalúan heridas suplementadas con mediadores inflamatorios emplean materiales extraídos de preparaciones celulares y han generado unos resultados alentadores (véase, por ejemplo, Clin. Plast. Surg., octubre de 2007, 34(4):659-671). La tecnología recombinante ha permitido la producción de volúmenes más grandes de estos mediadores que pueden utilizarse de una manera más práctica y segura en un entorno clínico.

Los ejemplos típicos de estas sustancias incluyen, por ejemplo, Regranex (becaplermina, un PDGF recombinante modificado genéticamente; Johnson & Johnson, Inc.), una medicina que contiene un factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y que está indicada para el tratamiento de úlceras en pies diabéticas neuropáticas profundas.

Otro ejemplo es el uso de FGF, por ejemplo, FGF-2 (por ejemplo, Curr. Drug Deliv., octubre de 2006, 3(4):351-358), solo o en combinación con otros fármacos en vehículos especiales, tales como hidrogeles de quitosano.

También se ha sugerido el ácido hialurónico como agente activo útil para el tratamiento de úlceras de la piel (documento US 5.897.880). Además, se ha indicado que la fibronectina (una glicoproteína que se encuentra en el plasma sanguíneo) aplicada por vía tópica es útil para aumentar la velocidad de cicatrización de heridas en heridas corneales (Nishida, Larch Ophthalmology, 101:1046 (1983)) y en úlceras en las piernas (Wysocki *et al.*, Arch. Dermatol., 124:175 (1988)).

En efecto, se ha sugerido que estas y otras sustancias (tales como los factores del crecimiento transformante (TGF-[alfa] y TGF-beta) (Science, 233:532, 1986); los factores del crecimiento de tipo insulínico (IGF-I y II); los factores de adhesión, tales como fibronectina, laminina y vitronectina (Ann. Rev. Biochem., 52:961, 1983); sustancias químicas, tales como retinoides y sus compuestos análogos (Am. J. Ophthalmol., 95, 353-358, 1983; Ann. Ophthalm., 19, 175-180, 1987) influyen positivamente en la cicatrización de heridas bajo las circunstancias estudiadas.

El documento EP 0575484 divulga una composición farmacéutica para la regeneración y la reparación de tejidos de mamífero, que incluye PDGF y dexametasona. El documento US 5183805 describe una composición farmacéutica que tiene el efecto de regenerar tejidos, que incluye EGF.

El documento US5912230 divulga secuencias de aminoácidos de péptidos antifúngicos y antibacterianos que representan toda la secuencia de aminoácidos, o una porción definida, de un péptido denominado péptido 113 (SEQ ID NO:18 del documento US5912230).

Por tanto, uno de los objetos de la presente invención es proporcionar una sustancia útil para estimular la cicatrización de heridas o el cierre de heridas y para el tratamiento de una amplia diversidad de heridas, sola o en combinación con otras sustancias conocidas en la técnica, y que es fácil de preparar en grandes cantidades y es muy estable.

Las heridas se producen generalmente en la piel. La piel es un órgano vital que cumple múltiples funciones, tales como funciones sensitivas, funciones protectoras frente a agresiones externas, así como funciones inmunológicas, metabólicas o termorreguladoras. Estos papeles son posibles debido a la compleja estructura que asocia diversos tejidos. La piel consiste en tres capas diferenciadas superpuestas: la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es un epitelio de revestimiento, que constituye la estructura externa de la piel y proporciona su función de protección. Esta función es proporcionada por la cohesión de las células epiteliales y por la producción de una proteína filamentosa y resistente, la queratina.

En la actualidad, la industria cosmética busca ingredientes activos que no sean solo capaces de proteger y mantener la piel, sino que también sean ingredientes activos, que sean capaces de mejorar su aspecto así como el bienestar de los individuos que los emplean. Otro objetivo de la invención es ofrecer nuevas sustancias y sus usos, que tengan una acción preventiva y curativa sobre la piel en fenómenos tales como las manifestaciones del envejecimiento, los daños a tejidos de la piel, tales como heridas, y similares.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una sustancia que es útil para estimular la cicatrización de heridas y/o el cierre de heridas, que puede utilizarse en el tratamiento de una amplia diversidad de heridas, o para el tratamiento de la piel (daños en la piel), sola o en combinación con otras sustancias conocidas en la técnica, y que es fácil de preparar en grandes cantidades y es muy estable.

5 **Descripción detallada**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se ha descubierto, de modo sorprendente, que los objetos mencionados anteriormente pueden lograrse proporcionando el uso de un péptido que comprende:

10 a. al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 6, preferiblemente al menos 7, y lo más preferiblemente al menos 8 aminoácidos presentes de modo adyacente en la histatina 1, 2 y/o 3; y/o

b. al menos una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos de al menos 6, preferiblemente al menos 7, y lo más preferiblemente al menos 8 aminoácidos presentes de modo adyacente en la histatina 1, 2 y/o 3,

15 para la preparación de un medicamento para la regeneración de tejido y/o para el tratamiento de la piel y/o para el tratamiento de una herida.

Preferiblemente, el uso del péptido según la descripción es para el tratamiento de la piel, más preferiblemente para el tratamiento de una herida (presente o no sobre la piel).

20 Preferiblemente, dicha al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 6, preferiblemente al menos 7, y lo más preferiblemente al menos 8 aminoácidos está presente de modo adyacente en la histatina 1 y/o 2.

Aún más preferiblemente, como puede observarse en los ejemplos, la secuencia de aminoácidos comprendida en el péptido según la descripción, y que está presente de modo adyacente en la histatina 1, 2 y/o 3, tiene una longitud de al menos 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos.

25 El término "péptido" se conoce en la técnica y se refiere a cualquier compuesto que consiste en dos o más aminoácidos, unidos por un enlace peptídico. Los péptidos pueden comprender varios aminoácidos, por ejemplo, 10, 20, 50 o 100, pero dentro del contexto de la presente invención, los péptidos no se limitan a estos números, sino que también incluyen péptidos más grandes, tales como polipéptidos y proteínas. Sin embargo, se prefieren péptidos más pequeños, según se analiza a continuación.

30 La expresión "una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido" es conocida por los expertos en la técnica. Una "sustitución" significa, dentro del contexto de la invención, el reemplazo de un aminoácido (por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29) por otro. El término "delección" significa la eliminación de un aminoácido (por ejemplo, de la secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29). El término "inserción" significa la introducción de un aminoácido en cualquier posición dentro de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en cualquiera de las secuencias de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29).

35 Dentro del contexto de la presente invención, en el caso de una sustitución, una delección o una inserción, como máximo 3, preferiblemente como máximo 2, más preferiblemente como máximo 1 aminoácido está sustituido, delecionado y/o insertado. Puede realizarse cualquier sustitución, delección o inserción dentro del contexto de la presente invención, con la condición de que el péptido obtenido muestre actividad de cierre de heridas, según puede determinarse como se describe en los ejemplos (mediante la comparación con un control).

La expresión "regeneración de tejidos" es conocida por los expertos en la técnica, y se refiere a la reparación, la sustitución, la recuperación funcional y, en último término, la regeneración de tejidos dañados, en un cuerpo vivo (que incluye la piel) o fuera del cuerpo.

45 En la presente divulgación, el péptido según la descripción puede emplearse, por tanto, en un medicamento que puede aplicarse a un cuerpo vivo, por ejemplo, un ser humano o un animal, pero también puede utilizarse fuera del cuerpo para regenerar tejido, por ejemplo, para la preparación de injertos de piel y similares. Después de haber sido desarrollados, estos tejidos se transplantan a pacientes para iniciar el proceso de reparación y rejuvenecimiento.

50 Sin embargo, el péptido se emplea preferiblemente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de

un cuerpo vivo, para la regeneración de tejidos, para el tratamiento de la piel o los ojos o, preferiblemente, para el tratamiento de una herida.

El término "piel" es conocido por los expertos en la técnica y, dentro del contexto de la presente invención, tiene su significado normal.

5 El término "herida" es conocido por los expertos en la técnica, y se refiere a tejidos dañados. Una herida es un tipo de traumatismo físico en el que la integridad de la piel o del tejido se altera como resultado, concretamente, de una fuerza externa, un estado de mala salud, el envejecimiento, la exposición a la luz solar, al calor o a una reacción química, o es el resultado de daños por procesos fisiológicos internos. Si la capa externa de un tejido está dañada, la herida se considera una herida abierta.

10 El cierre de heridas es el proceso de regenerar las capas de células de recubrimiento de un tejido. La estimulación del cierre de heridas significa crear un efecto positivo en la regeneración de las capas de células de recubrimiento. El efecto positivo puede ser una aceleración del proceso o una disminución del área dañada de la herida.

Los ejemplos no limitantes de heridas son:

15 - una herida de quemadura, que es la lesión que resulta de la exposición al calor, electricidad, radiación (por ejemplo, quemaduras solares y cirugía con láser), o producto químicos cáusticos,

- úlceras,

20 - heridas en la diabetes mellitus, que generalmente son lesiones en los pies debido al entumecimiento provocado por daños en nervios (neuropatía diabética) y un menor flujo sanguíneo hacia las piernas y los pies. La lesión más grave es una úlcera en el pie. Las úlceras en pies diabéticas tienen un riesgo muy alto de ser infectadas, y a veces no se pueden curar. Los úlceras en pies que no se han curado son una causa frecuente de amputación en personas con diabetes,

- heridas de decúbito, es decir, lesiones provocadas por una presión no mitigada sobre cualquier parte del cuerpo, en especial de porciones sobre áreas óseas o cartilaginosas,

- heridas debidas a una fuerza externa que daña al tejido,

25 - heridas en la piel debido al envejecimiento o al entorno. Esto incluye, por ejemplo, grietas, piel seca, aspereza de la piel y similares.

El efecto positivo puede ser una aceleración del proceso o una disminución del área dañada de la herida.

Los ejemplos no limitantes de heridas son:

30 - una herida de quemadura, que es la lesión que resulta de la exposición al calor, electricidad, radiación (por ejemplo, quemaduras solares y cirugía con láser), o producto químicos cáusticos,

- úlceras,

35 - heridas en la diabetes mellitus, que generalmente son lesiones en los pies debido al entumecimiento provocado por daños en nervios (neuropatía diabética) y un menor flujo sanguíneo hacia las piernas y los pies. La lesión más grave es una úlcera en el pie. Las úlceras en pies diabéticas tienen un riesgo muy alto de ser infectadas, y a veces no se pueden curar. Los úlceras en pies que no se han curado son una causa frecuente de amputación en personas con diabetes,

- heridas de decúbito, es decir, lesiones provocadas por una presión no mitigada sobre cualquier parte del cuerpo, en especial de porciones sobre áreas óseas o cartilaginosas,

- heridas debidas a una fuerza externa que daña al tejido,

40 - heridas en la piel debido al envejecimiento o al entorno. Esto incluye, por ejemplo, grietas, piel seca, aspereza de la piel y similares.

45 Durante la investigación se descubrió, de modo sorprendente, que cuando se aplican péptidos que comprenden al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 6, preferiblemente al menos 7, y lo más preferiblemente al menos 8 aminoácidos presentes de modo adyacente en la histatina 1, 2 y/o 3; y/o al menos una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos de al menos 6, preferiblemente al menos 7, y lo más preferiblemente al menos 8 aminoácidos presentes de modo

adyacente en la histatina 1, 2 y/o 3, a experimentos para determinar el cierre de heridas (proliferación/regeneración de tejido, reparación de la piel), se observa un cierre eficaz de la herida (reparación de la piel, regeneración) (véanse los ejemplos).

5 Por tanto, estos péptidos que comprenden estas secuencias de aminoácidos y que demuestran un cierre eficaz de heridas, tal como puede determinarse según se describe en los procedimientos, son muy útiles para la preparación de un medicamento para la regeneración de tejidos y/o para el tratamiento de la piel y/o para el tratamiento de una herida.

10 Aunque no se pretende quedar ligado a teoría alguna, se cree que un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la invención interacciona con diversas células implicada en el proceso de cicatrización de la piel o de heridas, probablemente interaccionado con receptores presentes sobre dichas células. Debido a estas especies de oxígeno, su modo de acción es diferente del mostrado por los fármacos de azol y polieno convencionales.

15 En efecto, la posibilidad de utilizar histatinas para tratar infecciones fúngicas de la cavidad oral se está buscando activamente por medio de las propiedades antifúngicas de las preparaciones de histatina tópicas y se están evaluando dentaduras acrílicas impregnadas con histatina. Los estudios clínicos iniciales son alentadores, y han demostrado la seguridad y la eficacia de las preparaciones de histatina para bloquear la adherencia de la levadura *Candida albicans* a dentaduras acrílicas, lo cual retrasa la formación de la placa y reduce la gravedad de la gingivitis (publicado por Kevin Kavanagh, Susan Dowd, Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 56, n.º 3, pp. 285 (2004)).

20 De modo interesante, se ha encontrado que los péptidos y/o las secuencias de aminoácidos según la descripción, que incluyen histatina 1, histatina 2 e histatina 3, muestran unos efectos muy ventajosos con respecto a la regeneración de tejidos, la reparación de la piel y/o el cierre de heridas. En fuerte contraste, y de forma completamente inesperada, la histatina 5 no muestra ningún efecto con respecto a la regeneración de tejidos y/o el cierre de heridas (véanse los ejemplos). Por tanto, la histatina 5 no se incluye en los péptidos y/o aminoácidos según la presente descripción.

25 Por tanto, es evidente que la actividad descubierta en la presente no es atribuible, por ejemplo, a la actividad antifúngica descrita de las histatinas, en general, contra, por ejemplo, *Candida albicans*, puesto que, en primer lugar, *Candida albicans* no estaba presente en los procedimientos para determinar el efecto de las histatinas sobre la regeneración de tejidos y/o el cierre de heridas, en segundo lugar, porque no existe relación entre la actividad antifúngica de los péptidos y la actividad con respecto a la regeneración de tejidos y/o cierre de heridas, y en tercer lugar, la histatina 5, que es el péptido más activo contra *Candida albicans*, no presenta actividad de regeneración de tejidos y/o cierre de heridas (véanse los ejemplos incluidos en la presente memoria).

30 Por tanto, los péptidos divulgados, por ejemplo, en el documento JP06287146, que incluyen la histatina 5, son claramente diferentes de los péptidos según la presente descripción, tanto en estructura como en los mecanismos mediante los cuales puedan ser pertinentes con respecto a la regeneración de tejidos, la reparación de la piel y/o el cierre de heridas. En particular, en el caso de que del péptido según la descripción comprenda una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:3, se prefiere que la condición sea que este péptido no sea un péptido según se describe específicamente en el documento JP06287146.

35 Sin embargo, estos péptidos pueden combinarse, de modo ventajoso, con los péptidos según la presente descripción.

40 Se proporciona el uso de un péptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 6, preferiblemente al menos 7, y lo más preferiblemente al menos 8 aminoácidos presentes de modo adyacente en la histatina 1, 2 y/o 3, en el que dicha secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3, o al menos una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una deleción y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3.

45 Se proporciona el uso de un péptido que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 6, preferiblemente al menos 7, y lo más preferiblemente al menos 8 aminoácidos presentes de modo adyacente en la histatina 1, 2 y/o 3, en el que dicha secuencia de aminoácidos es según la SEQ ID NO:2, o al menos una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una deleción y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:2.

Durante la investigación, en un intento de establecer los requisitos mínimos de los aminoácidos presentes de modo

adyacente (que significa uno al lado del otro en la secuencia) en la histatina 1, 2 y/o 3, se descubrió, de modo sorprendente, que cuando un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:3 y/o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:3, se aplica a experimentos para determinar el cierre de heridas (proliferación/regeneración de tejidos, reparación de la piel), se observa un cierre eficaz de la herida (reparación de la piel, regeneración) (véanse los ejemplos).

En otras palabras, los péptidos según la descripción, que comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:3 (o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:3), pueden mostrar una actividad eficaz con respecto al cierre de heridas (reparación de la piel, regeneración de tejido/proliferación celular) mediante un mecanismo que es independiente del conocido factor de cierre de heridas EGF. Por tanto, el tratamiento de dichas heridas o daños en el tejido ahora puede mejorarse aún más mediante el suministro de un mecanismo alternativo (o adicional) que puede utilizarse.

Por tanto, también se divulga el receptor con el que los péptidos según la descripción, que tienen una secuencia de aminoácidos según la descripción, interactúan y, con ello, inducen la cicatrización de heridas, el uso de dicho receptor para la detección de compuestos que pueden ser útiles en la regeneración de tejido, en particular para el tratamiento de la piel o heridas, y el uso de dichos compuestos en medicamentos y similares para la regeneración de tejidos, preferiblemente para el tratamiento de una herida o el tratamiento de la piel.

Se proporciona el uso de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos según SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:29, y preferiblemente dicha sustitución, delección y/o inserción no está en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:3.

Durante los experimentos realizados por los inventores, se observó que, además de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:29 muestran unos efectos beneficiosos con respecto a la regeneración de tejidos, el cierre de heridas y/o el tratamiento de la piel.

Como puede observarse en los ejemplos, los péptidos o las secuencias de aminoácidos se han modificado por la eliminación de 2, 4, 6, 8, 12, etc. aminoácidos en comparación, por ejemplo, con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 (histatina 2). Además, todas estas secuencias muestran efectos beneficiosos en los ensayos realizados. Así, los expertos en la técnica apreciarán que, además de las secuencias de aminoácidos según SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:29, además, también los aminoácidos en los que se han eliminado 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 etc. aminoácidos en comparación con SEQ ID NO:5, por ejemplo, mediante la eliminación del tripéptido RKF, el pentapéptido RKFHE, etc. del N-terminal de SEQ ID NO:5, o mediante la eliminación del tripéptido YDN, o el pentapéptido YLYDN, etc. del C-terminal de SEQ ID NO:5, se incluyen también como aminoácidos que pueden estar incluidos (o que forman) los péptidos según la descripción. Obviamente, la eliminación de aminoácidos también puede realizarse en ambos N-terminal y C-terminal, con la condición de que el péptido remanente muestre actividad con respecto al cierre de heridas, por ejemplo, según se determina en los ejemplos.

El péptido según la descripción comprende o preferiblemente consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 o sus partes o fragmentos, y que muestra actividad de cierre de heridas.

El péptido según SEQ ID NO:4 también se conoce como histatina 1; el péptido según SEQ ID NO:5 también se conoce como histatina 2; el péptido según SEQ ID NO:6 también se conoce como histatina 3.

Tal como se apreciará, y basándose en la presente descripción, los expertos en la técnica serán capaces, sin más habilidades inventivas, de determinar la actividad de cierre de heridas de fragmentos o partes de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y/o SEQ ID NO:6, por ejemplo, según se describe en detalle en los ejemplos. Se entenderá que dichas partes o fragmentos son parte de la presente descripción. Preferiblemente, dichas partes o fragmentos se derivan de la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:5.

Tal como entenderán los expertos en la técnica, los aminoácidos y el péptido que comprende dichas secuencias de aminoácidos, según se describen en la presente invención, incluyen aquellos en que al menos un grupo funcional (en particular el grupo amino y carboxílico) están protegidos con un grupo protector. Puesto que el péptido según

la invención se va a aplicar a un tejido, la piel o una herida, resulta beneficioso, para que sea resistente frente a la degradación, emplear una forma protegida del péptido. La forma de protección obviamente debe ser una forma biológicamente compatible y debe ser compatible con el uso cosmético o en el campo de los productos farmacéuticos. Pueden considerarse muchas formas biológicamente compatibles de protección, que son muy conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, la acilación o la acetilación del amino-terminal, la ciclación o la amidación o la esterificación del carboxi-terminal. Así, la invención también se refiere al uso tal como se definió previamente, y que se caracteriza por el hecho de que el péptido está en forma protegida.

Los péptidos, objetos de esta patente, pueden obtenerse mediante la síntesis química tradicional (por ejemplo, según se describe en los ejemplos, o en fase sólida o en fase líquida homogénea), o mediante síntesis enzimática (Kullman *et al.*, J. Biol. Chem., 1980, 225, 8234) a partir de aminoácidos constitutivos o a partir de sus derivados. Los péptidos relacionados con la invención también pueden obtenerse mediante fermentación de una cepa de bacterias, modificadas o no modificadas, mediante ingeniería genética para producir péptidos con la secuencia previamente indicada y sus fragmentos.

Además, se proporcionan nucleótidos (ADN, ADNc, ARN, etc.) que codifican un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la invención, y su uso para proporcionar los péptidos según la invención.

En otra realización, el péptido comprende o consiste en al menos 8, mas preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 20, y lo más preferiblemente al menos 27 aminoácidos.

Se ha descubierto que si el péptido según la invención comprende o consiste en al menos 8, mas preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 20, y lo más preferiblemente al menos 27 aminoácidos, se proporciona un péptido que muestra una buena actividad con respecto a la regeneración de tejido y piel.

Tal como entenderán los expertos en la técnica, los aminoácidos y los péptidos que comprenden dichas secuencias de aminoácidos, según se describen en la presente invención, incluyen aquellos en los que al menos un grupo funcional (en particular el grupo amino y carboxílico) están protegidos con un grupo protector. Puesto que el péptido según la invención se va a aplicar a un tejido, la piel o una herida, resulta beneficioso, para que sea resistente frente a la degradación, emplear una forma protegida del péptido. La forma de protección obviamente debe ser una forma biológicamente compatible y debe ser compatible con el uso cosmético o en el campo de los productos farmacéuticos. Pueden considerarse muchas formas biológicamente compatibles de protección, que son muy conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, la acilación o la acetilación del amino-terminal, la ciclación o la amidación o la esterificación del carboxi-terminal. Así, la invención también se refiere al uso tal como se definió previamente, y que se caracteriza por el hecho de que el péptido está en forma protegida.

Los péptidos, objetos de esta patente, pueden obtenerse mediante la síntesis química tradicional (por ejemplo, según se describe en los ejemplos, o en fase sólida o en fase líquida homogénea), o mediante síntesis enzimática (Kullman *et al.*, J. Biol. Chem., 1980, 225, 8234) a partir de aminoácidos constitutivos o a partir de sus derivados. Los péptidos relacionados con la invención también pueden obtenerse mediante fermentación de una cepa de bacterias, modificadas o no modificadas, mediante ingeniería genética para producir péptidos con la secuencia previamente indicada y sus fragmentos.

Además, se proporcionan nucleótidos (ADN, ADNc, ARN, etc.) que codifican un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la invención, y su uso para proporcionar los péptidos según la invención.

En otra realización, el péptido comprende o consiste en al menos 8, mas preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 20, y lo más preferiblemente al menos 27 aminoácidos.

Se ha descubierto que si el péptido según la invención comprende o consiste en al menos 8, mas preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 20, y lo más preferiblemente al menos 27 aminoácidos, se proporciona un péptido que muestra una buena actividad con respecto a la regeneración de tejidos, el tratamiento de la piel y/o el cierre de heridas.

Se cree que, además de, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29, los aminoácidos adicionales contribuyen de forma positiva a la interacción del péptido con las células implicadas o presentes en la regeneración de tejidos, la reparación de la piel y/o el cierre de heridas.

Por tanto, los expertos en la técnica entenderán que cualquier cantidad de aminoácidos adicionales (junto a las secuencias de aminoácidos según la invención) puede estar presente en el péptido según la invención, con la condición de que sustancialmente no influya de forma negativa en la actividad del péptido para cerrar una herida,

por ejemplo, según se determina en los procedimientos descritos en los ejemplos.

En otra realización preferida, se indica que el péptido que se proporciona para su uso en la presente invención comprende 8-40 aminoácidos, más preferiblemente 12-39 aminoácidos, y aún más preferiblemente 27-38 aminoácidos.

5 Tal como se ha analizado anteriormente, se ha descubierto que, en particular, los péptidos que comprenden 8-40 aminoácidos, más preferiblemente 12-39 aminoácidos, y aún más preferiblemente 27-38 aminoácidos, son particularmente eficaces en la regeneración de tejidos, en el tratamiento de la piel y, en particular, en el cierre de heridas, según se describe en los ejemplos.

10 Se cree que, además de, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1-29, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29, los aminoácidos adicionales contribuyen de forma positiva a la interacción del péptido con las células implicadas o presentes en la regeneración de tejidos, la reparación de la piel y/o el cierre de heridas.

15 Aunque, como se mencionó anteriormente, los péptidos pueden comprender más aminoácidos que los descritos en los anteriores intervalos de aminoácidos, se cree, no obstante, que cuando el péptido comprende demasiados aminoácidos, la interacción del péptido según la invención con las células y los receptores puede verse influida negativamente, reduciendo con ello la eficacia del péptido según la invención en la regeneración de tejidos, el tratamiento de la piel y/o el tratamiento de una herida (cierre de la herida). Por tanto, se prefiere que el péptido
20 según la invención comprenda como máximo no más de (aproximadamente) 100 aminoácidos.

Por tanto, los expertos en la técnica entenderán que, para cualquier cantidad de SEQ ID NO:4 con aminoácidos adicionales que se proporcione en forma cíclica, la actividad de dicha forma cíclica del péptido aumenta notablemente en comparación con la forma lineal. En otras palabras, para lograr el mismo efecto de reparación de la piel, efecto de cicatrización de heridas o de cierre de heridas, o el mismo efecto con respecto a la regeneración
25 de tejidos, como puede determinarse, por ejemplo, con los procedimientos descritos en los ejemplos, puede emplearse una concentración (mucho) menor del péptido cíclico según la invención, en comparación con el mismo péptido en forma lineal. Como alternativa, cuando se emplea la misma concentración de una forma lineal de un péptido según la invención de una forma cíclica de un péptido según la invención, puede establecerse una reparación de la piel, un cierre de heridas y una regeneración de tejidos notablemente mayor con el péptido cíclico,
30 en comparación con la forma lineal del mismo péptido (y como, por ejemplo, se ofrece en cualquiera de SEQ ID NO:1-29).

En otras palabras, se proporciona un péptido según la invención en forma cíclica, más en concreto el péptido cíclico comprende una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29.

35 Los expertos en la técnica saben cómo proporcionar un péptido cíclico, y en la técnica se han descrito muchos procedimientos adecuados. Por ejemplo, el documento US6555650 describe un procedimiento para proporcionar análogos cíclicos de histatinas que tienen una homología sustancial con His 5 (el procedimiento para preparar dichas formas cíclicas puede emplearse dentro del contexto de la presente invención).

Además, Goncalves *et al.* (Tetrahedron, 61 (2005), 7789-7795) describen un procedimiento que también puede aplicarse para formar péptidos cíclicos según la presente invención. Brevemente, en este procedimiento se
40 construye un péptido lineal empleando la química de Fmoc convencional y se puede realizar una ciclación sobre una resina después de la desprotección selectiva del grupo C-terminal con hidrazina/DMF.

Se cree que las características mejoradas de estos péptidos cíclicos, en comparación con los péptidos lineales, pueden ser debidas a una mejor estabilidad metabólica, potencia, selectividad por el receptor y/o biodisponibilidad. Por tanto, los expertos en la técnica entenderán que los péptidos cíclicos no se limitan al péptido cíclico mostrado
45 en los ejemplos, sino que incluyen cualquier otro péptido cíclico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29, y preferiblemente dicha sustitución, delección y/o inserción no
50 está en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:3. También se describen Iso péptidos cíclicos que comprenden una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:3, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:3.

Además, tal como se explicó anteriormente, también se incluyen los péptidos cíclicos que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, etc. aminoácidos se han eliminado, en comparación con SEQ ID NO:5, por ejemplo, mediante la eliminación del tripéptido RKF, el pentapéptido RKFHE, etc. del N-terminal de SEQ ID NO:5, o mediante la eliminación del tripéptido YDN, o el pentapéptido YLYDN, etc. del C-terminal de de SEQ ID NO:5, o mediante la eliminación de ambos N-terminal y C-terminal de SEQ ID NO:5. Estas secuencias de aminoácidos pueden estar incluidas en un péptido cíclico según la divulgación.

Por tanto, se proporciona el uso de un péptido cíclico según la descripción, en el que el péptido cíclico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29, y preferiblemente dicha sustitución, delección y/o inserción no está en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:3.

En efecto, se ha encontrado que cuando un péptido cíclico que comprende una secuencia de aminoácidos según la invención se compara con el mismo péptido pero en forma lineal, la concentración del péptido cíclico puede ser 5, incluso 10, incluso 100 veces inferior, en comparación con la forma lineal del mismo péptido (por ejemplo, una forma lineal de la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:5 (histatina 1)).

Por tanto, se proporciona el uso según la invención de un péptido cíclico según la invención, en el que dicho péptido cíclico tiene una actividad relativa de cierre de heridas que es igual a la actividad relativa de cierre de heridas de un péptido lineal según SEQ ID NO:4 (HIS1) a una concentración de 1 μ M (en el procedimiento según los ejemplos), a una concentración de dicho péptido cíclico que es al menos 5, más preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 100 veces menor. En particular, dicha actividad relativa de cierre de heridas se mide según el procedimiento del ejemplo 1.

Cualquier experto en la técnica es capaz de determinar la actividad relativa de cierre de heridas empleando los procedimientos descritos en los ejemplos y, por tanto, puede determinar con facilidad la actividad de cualquier péptido lineal de un péptido cíclico según la invención y comparar los resultados.

El péptido según la descripción puede ser un dímero o un multímero, y cada monómero que forma el dímero o el multímero preferiblemente consiste en (o está formado por) una secuencia de aminoácidos según se describió anteriormente, aún más preferiblemente cada monómero consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29.

Los expertos en la técnica entenderán que el término "dímero" o "multímero", dentro del contexto de la presente invención, pretende indicar, concretamente, una parte diferenciada del péptido según la invención en combinación con otra parte diferenciada, unida directamente por un enlace peptídico o indirectamente a través de una secuencia conectora o un entrecruzador. Las partes pueden estar unidas en forma paralela ($X_1-X_2-X_3-...X_n-Y-X_1-X_2-X_3-...X_n$), o, y por tanto se incluye en la presente invención, en una forma antiparalela ($X_1-X_2-X_3-...X_n-Y-X_n-X_{n-1}-X_{n-2}-...X_1$), en la que X_n indica el resto aminoácido en la posición 1 (comenzando desde el N-terminal), e Y indica el entrecruzamiento entre los dos "monómeros". En otras palabras, un péptido según la invención puede comprender cualquier fusión de al menos dos secuencias de aminoácidos según la invención, y cada secuencia de aminoácidos según la invención forma un "monómero" dentro del contexto de la invención.

También, y además del ejemplo descrito anteriormente, dicho péptido puede comprender aminoácidos adicionales, que preferiblemente son según un aminoácido según la descripción, que forman otro monómero dentro del contexto de la descripción.

Preferiblemente, el péptido es un dímero que comprende dos monómeros idénticos según la descripción y, tal como se describió anteriormente, por ejemplo, ambos monómeros dentro del contexto de la descripción que tienen una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29.

Como entenderán los expertos en la técnica, en la presente invención también se incluyen los péptidos según la invención que están conjugados. Dentro de la presente invención, la "conjugación" debe considerarse como la unión de un péptido según la invención a otro material, en particular a un vehículo, por ejemplo una esfera de poliestireno, BSA, un anticuerpo o un vehículo de transporte similar. Así, en otra realización, se proporciona un péptido según la invención que está conjugado.

Con respecto al aumento observado en la actividad de la forma cíclica de un péptido según la invención, analizada anteriormente, se cree que puede ser debido al menos parcialmente a la restricción de la libertad conformacional de los péptidos lineales por la ciclación. Por tanto, los expertos en la técnica entenderán que también se incluyen péptidos según la invención que han sido restringidos en su libertad conformacional, además de los péptidos cíclicos. Los expertos en la técnica conocen procedimientos que restringen la libertad conformacional de péptidos

según la invención, por ejemplo, un procedimiento en el que dicho péptido ha sido restringido en su libertad conformacional mediante entrecruzamiento o mediante la formación de puentes de azufre-azufre, por ejemplo, mediante la tecnología CLIPS, según describen, por ejemplo, Lesauteur *et al.* (JBC, 270, 6564-6569). Esto se logra mediante la sustitución de restos no críticos por cisteína o mediante la inserción de restos cisteína en posiciones no críticas de la molécula. La posterior ciclación puede realizarse mediante dimerización oxidativa (lavando con oxígeno o agua) o mediante un tratamiento con diyodometano, o mediante la reacción con andamios aromáticos pequeños rápidos, tales como α, α' -dibromo-*m*-xileno α, α' -dibromo-*m*-xileno.

En otra realización preferida, además del péptido según la invención, se emplea también un factor del crecimiento, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF), factor del crecimiento transformante (TGF), factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), en la preparación del medicamento, o en el tratamiento de la piel o una herida.

Tal como se analizó anteriormente, los péptidos según la invención contribuyen a la regeneración de tejidos y/o al cierre de heridas y/o al tratamiento de la piel mediante un mecanismo diferente al de, por ejemplo, EGF. Por tanto, será una ventaja combinar compuestos/fármacos y similares con los péptidos según la invención, y esto contribuye a la regeneración de tejidos y/o al cierre de una herida (tratamiento de la herida) y/o al tratamiento de la piel mediante mecanismos que son, preferiblemente, independientes del mecanismo mediante el cual actúan los péptidos según la invención. Combinando dichos mecanismos diferentes en un tratamiento pueden obtenerse mejores resultados.

Se proporciona el uso según cualquiera de las frases anteriores, en el que el tratamiento de la piel es para el tratamiento o la prevención del envejecimiento, la celulitis, la piel seca, grietas, heridas, o en el que la herida es una herida interna, una herida oral, una herida de la piel, una herida externa, una úlcera y/o una úlcera de decúbito, daños en los ojos, una herida en el ojo, por ejemplo, el conjuntivo. Otros trastornos que se pueden tratar con los péptidos según la descripción incluyen úlceras orales, lesiones aftosas orales, síndrome de la boca ardiente, lengua ardiente, psoriasis, eccema y pérdida de cabello.

Estos tipos de daños y lesiones en la piel son conocidos por los expertos en la técnica. Una herida interna es una herida presente en el cuerpo, por ejemplo, debido a una incisión quirúrgica. Una herida oral es una herida presente en la cavidad oral. Una herida de la piel es una herida presente en la piel. Una herida externa debe entenderse como una herida que es visible y accesible desde fuera del cuerpo. Una úlcera es una lesión sobre la superficie de la piel o de una superficie mucosa. Una úlcera de decúbito es una herida o ulceración provocada por una presión prolongada sobre la piel y los tejidos cuando se mantiene la misma posición durante un periodo largo de tiempo. Un material, en particular, a un vehículo, por ejemplo, una esfera de poliestireno, BSA, un anticuerpo o un vehículo de transporte similar. Así, en otra realización, se proporciona un péptido según la invención que está conjugado.

Con respecto al aumento observado en la actividad de la forma cíclica de un péptido según la invención, analizada anteriormente, se cree que puede ser debido al menos parcialmente a la restricción de la libertad conformacional de los péptidos lineales por la ciclación. Por tanto, los expertos en la técnica entenderán que también se incluyen péptidos según la invención que han sido restringidos en su libertad conformacional, además de los péptidos cíclicos. Los expertos en la técnica conocen procedimientos que restringen la libertad conformacional de péptidos según la invención, por ejemplo, un procedimiento en el que dicho péptido ha sido restringido en su libertad conformacional mediante entrecruzamiento o mediante la formación de puentes de azufre-azufre, por ejemplo, mediante la tecnología CLIPS, según describen, por ejemplo, Lesauteur *et al.* (JBC, 270, 6564-6569). Esto se logra mediante la sustitución de restos no críticos por cisteína o mediante la inserción de restos cisteína en posiciones no críticas de la molécula. La posterior ciclación puede realizarse mediante dimerización oxidativa (lavando con oxígeno o agua) o mediante un tratamiento con diyodometano, o mediante la reacción con andamios aromáticos pequeños rápidos, tales como α, α' -dibromo-*m*-xileno α, α' -dibromo-*m*-xileno.

En otra realización preferida, además del péptido según la invención, se emplea también un factor del crecimiento, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF), factor del crecimiento transformante (TGF), factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), en la preparación del medicamento, o en el tratamiento de la piel o una herida.

Tal como se analizó anteriormente, los péptidos según la invención contribuyen a la regeneración de tejidos y/o al cierre de heridas y/o al tratamiento de la piel mediante un mecanismo diferente al de, por ejemplo, EGF. Por tanto, será una ventaja combinar compuestos/fármacos y similares con los péptidos según la invención, y esto contribuye a la regeneración de tejidos y/o al cierre de una herida (tratamiento de la herida) y/o al tratamiento de la piel mediante mecanismos que son, preferiblemente, independientes del mecanismo mediante el cual actúan los péptidos según la invención. Combinando dichos mecanismos diferentes en un tratamiento pueden obtenerse

mejores resultados.

En otra realización preferida, se proporciona el uso según cualquiera de las frases anteriores, en el que el tratamiento de la piel es para el tratamiento o la prevención del envejecimiento, la celulitis, la piel seca, grietas, heridas, o en el que la herida es una herida interna, una herida oral.

- 5 En una realización preferida, el excipiente es farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de una herida, es decir, no interfiere de forma negativa con el tratamiento de la herida y/o la regeneración del tejido.

Además, la composición según la invención puede comprender también un factor del crecimiento, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF), factor del crecimiento transformante (TGF), factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), por las razones analizadas anteriormente.

Las composiciones según la descripción pueden emplearse de modo adecuado para los tratamientos descritos anteriormente.

- 15 En otra realización preferida, la composición está en forma de una disolución, un ungüento, una pomada, un bálsamo, una tintura, un elixir, una escayola, una venda, un material de vendaje, un vendaje de alginato, una disolución tópica, una infusión, o una disolución de enjuague quirúrgica.

Preferiblemente, la composición comprende el péptido según la invención en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a 500 mg del péptido por mililitro de gramo del medicamento.

- 20 En el caso de que el medicamento/composición esté en una forma acuosa, es decir, una disolución o un ungüento, el pH del medicamento estará entre pH 3,0 y pH 9,0. En otra realización preferida, dicha composición tiene una fuerza iónica de al menos 20 mM, más preferiblemente 50 mM, aún más preferiblemente 100 mM, lo más preferiblemente al menos 120 mM, antes de aplicarla a una herida, tal como se analizó anteriormente.

- 25 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para el tratamiento de la piel o el tratamiento de una herida, que comprende la etapa de aplicar a dicha piel o herida un aminoácido, un péptido o las composiciones según se definen en la presente. Dicho procedimiento es muy útil para el tratamiento de heridas, la piel, o para la regeneración de tejidos, según se describe en la presente. Preferiblemente, el medicamento que comprende el péptido según la invención comprende de aproximadamente 0,0001 a 500 mg de péptido por mililitro de gramo del medicamento. En el caso de que el medicamento esté en una forma acuosa, es decir, una disolución o un ungüento, el pH del medicamento está entre pH 3,0 y pH 9,0.

- 30 En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona el uso de los péptidos según la descripción como tratamiento cosmético (no médico) de la piel. Se ha descubierto que, aunque no exista una necesidad médica para el tratamiento de la piel, la aplicación de un péptido según la descripción, por ejemplo, a la piel envejecida, o a una piel sometida a estrés ambiental (es decir, contaminación del aire), proporciona, de forma ventajosa, una mejora en la estructura y el aspecto de la piel.

- 35 El péptido mencionado anteriormente puede solubilizarse en uno o varios disolventes cosmética o farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol, propanol o isopropanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o cualquier combinación de estos disolventes, o se solubiliza en un vector cosmético o farmacéutico, tales como liposomas o se adsorbe sobre polímeros orgánicos en polvo, soportes minerales, tales como talco y bentonita, y más en general, se solubiliza o se fija sobre cualquier vector cosmética o farmacéuticamente aceptable. Por supuesto, es obvio que el péptido según la invención puede utilizarse por sí solo o en conjunción con al menos otro agente activo, para la preparación de una composición cosmética y/o dermatológica y/o farmacéutica. El péptido según la invención puede emplearse de modo favorable como producto para el cuidado de la piel y agente de tratamiento para la piel. El producto para el cuidado de la piel y el agente de tratamiento se refieren a agentes que, de un modo general, tienen una actividad reparadora y revitalizante que permite, entre otras acciones, que los crecimientos de la piel y/o el cuerpo superficial reaccionen mejor frente a las agresiones a las que puedan ser sometidos.

Se entenderá que el péptido según la invención puede utilizarse solo o en asociación con al menos otro agente activo. En la composición según la invención, el péptido puede ser una mezcla de derivados del péptido y/o puede consistir en derivados de aminoácidos.

- 50 Por tanto, los péptidos según la invención pueden utilizarse de modo adecuado en una preparación cosmética prevista para la aplicación a la piel.

Los expertos en la técnica entenderán que, además de aminoácidos, el péptido puede contener también otros

grupos que se emplean habitualmente, tales como péptidos señal o grupos químicos tales como grupos de protección, como tBoc, marcadores, o incluso pueden estar asociados o incluidos, por ejemplo, en nanopartículas y liposomas, por ejemplo, que porten otro fármaco, por ejemplo, útil para el tratamiento de heridas. Los péptidos que están químicamente modificados, tal como mediante glicosilación, pegilación, acetilación, metilación, ubiquitinación, hidroxilación, palmitoilación y fosforilación, también pueden emplearse, con la condición de que dichas modificaciones no obstaculicen las propiedades de cierre de heridas y/o la regeneración del tejido y/o el tratamiento de la piel.

Se proporciona una secuencia de aminoácidos, un péptido o una composición, según se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones previas, preferiblemente un péptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 3, preferiblemente como máximo en 2, y lo más preferiblemente como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29.

También se proporciona una secuencia de aminoácidos, un péptido o una composición según la descripción, para su uso como medicamento, y en particular se proporciona una secuencia de aminoácidos, un péptido o una composición según la descripción para el tratamiento de la piel, una herida o para la regeneración de tejidos, preferiblemente un péptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29.

Ejemplos

Figuras

La figura 1A ilustra un experimento de cierre de una herida de rasguño *in vitro* típico en el que la saliva parotídea o un péptido según la descripción, después de 16 horas, induce el cierre de la herida de una monocapa epitelial. Se ensayaron diferentes secreciones salivares al 30% (en v/v) en SFM en este modelo, con tampón de saliva como control negativo. La saliva parotídea es la única secreción que produce el cierre de la herida inducido (figura 1 B). Es más, las otras secreciones inhiben el cierre de la herida. La saliva estimulada completa humana consiste principalmente en saliva parotídea. Se estudió el cierre de la herida y las concentraciones de EGF de seis personas diferentes (figura 1 C). Todas las personas menos una mostraron un significativo cierre de la herida inducido. Además, las concentraciones de EGF no se corresponden con el grado de cierre de la herida, lo cual indica que son responsables diferentes factores. Para rebatir completamente el papel de EGF como factor inductor del cierre de heridas en la saliva parotídea humana, se inhibió la activación de su receptor (figura 1 D). Con el receptor bloqueado, la inducción por la saliva parotídea no solo se mantuvo, sino que incluso fue potenciada. Esto indica la responsabilidad de este receptor en el cierre en el control y, así, el fondo en este ensayo, muy probablemente provocado por la producción endógena de ligandos para el receptor de EGF. Por supuesto, EGF, a una concentración de 5 ng/ml, fue capaz de inducir el cierre de la herida con unas velocidades comparables a las de la saliva parotídea (figura 1 D). Sin embargo, la adición de AG1478 abolió el efecto, tal como se esperaba.

La figura 2 afirma el cierre de la herida inducida por la saliva independiente de EGFR de la figura 1, realizando el mismo ensayo con histatina 2. También confirma los estudios previamente mencionados, que demuestran que el cierre de heridas inducido por EGF depende de p38^{MAPK}. Sin embargo, el cierre de la herida inducido por histatina 2 no parece dependiente de p38^{MAPK}, sino de ERK1/2J.

La figura 3 muesetra los resultados de diversos aminoácidos y/o péptidos según la descripción en experimentos de cierre de heridas.

Ejemplos

Ejemplo 1

1. Condiciones experimentales

1.1 Cultivo celular

La línea de células epiteliales bucales humanas TR146 (Rupniak *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., octubre 1985, 75(4):621-635) fue proporcionada amablemente por Cancer Research UK. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco con glucosa 4,5 g/l (Invitrogen), FCS al 10% (HyClone) y penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml, y anfotericina B 250 ng/ml (disolución antimiótica antibiótica, Sigma) a 37 °C, una humedad del 95% y CO2 al 5%. Las células se mantuvieron hasta casi la confluencia y después se trataron brevemente con tripsina-EDTA al 0,25% 1 x (Invitrogen) para desprenderlas, se contaron en un hepatocitómetro y se sembraron en nuevos matraces o placas de múltiples pocillos a la densidad celular requerida de

aproximadamente 1,5 x 10x5 células/pocillo.

1.2 Recolección de la saliva

La saliva se recogió como se ha descrito previamente (Veerman *et al.*, 1996, Eur. J. Oral Sci., 104:346-352). Se recogió saliva estimulada completa humana (WSS) tras mascar un trozo de parafina. La saliva parotídea se recogió con la ayuda de una copa Lashley colocada sobre el conducto de Stenon que conduce a un tubo de polipropileno. El fluido que se acumula en la boca durante la recolección de la secreción parotídea (denominada saliva exparotídea), que está compuesto principalmente de las secreciones combinadas de las glándulas submandibulares y sublinguales, se recogió simultáneamente mediante esputos hacia un recipiente enfriado en hielo. La saliva submandibular (SM) se recogió empleando un dispositivo de recolección fabricado a medida colocado en el suelo de la boca sobre las salidas de los conductos de las glándulas submandibulares. Antes del uso, todas las muestras de saliva se esterilizaron empleando un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm (Whatman). El tampón de saliva se preparó basándose en las propiedades de la saliva parotídea estimulada con pH = 7,3, y consiste en Na₂CO₃ 30 mM, KCl 10 mM, K₂HPO₄ 6 mM, KSCN 3 mM, CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 0,1 mM. La mucina salivar de alto peso molecular MUC5B se aisló mediante ultracentrifugación y cromatografía de filtración en gel, tal como se ha descrito previamente (Veerman *et al.*, 1991, Arch. Oral Biol., 36:923-932).

1.3 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Las concentraciones de EGF en la saliva se midieron mediante ELISA empleando el kit EGF Cytoset™, siguiendo las instrucciones del fabricante (Biosource).

1.4 Experimentos de cicatrización de heridas *in vitro*

Se realizaron ensayos de heridas como se ha descrito previamente (Matthay *et al.*, 1993, J. Cell Sci., 106 (Pt. 3):869-878). Brevemente, se cultivaron células en placas de 12 pocillos hasta la confluencia, y después se les privó de suero durante 24 horas en un medio sin suero de queratinocitos (SFM (Invitrogen)). En cada pocillo se realizó un rasguño en la monocapa empleando una punta estéril. La monocapa herida se lavó con SFM para eliminar los restos celulares, y se aplicaron las siguientes condiciones:

(i) saliva completa y secreciones salivares aplicadas al 30% (en v/v) en SFM. Como control negativo se empleó tampón de saliva al 30% (en v/v);

(ii) rhEGF (Invitrogen) como control positivo;

(iii) fracciones de rp-HPLC que contenían proteínas salivares;

(iv) péptidos sintéticos: los experimentos con proteínas aisladas y péptidos sintéticos se realizaron en SFM completo.

Se determinó la anchura del área herida de modo microscópico inmediatamente después de la creación de la herida y aproximadamente 16 horas después de la creación de la herida. Se calculó el cierre relativo relacionando el cierre con el del control negativo.

Para los estudios de inhibidor, directamente después de la creación de la herida, las células se expusieron a inhibidores de ERK1/2 (U0126, 5 µM, LC Laboratories), EGFR (AG1478, 1 µM, Calbiochem) y p38 MAPK (SB203580, 5 µM, LC Laboratories). Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se analizaron empleando ANOVA de una vía para determinar la significancia con un ensayo post-hoc de LSD adicional. P < 0,05 se consideró significativo.

1.5 Cromatografía HPLC de saliva parotídea e identificación de las proteínas

La saliva parotídea (2 ml) de un donante se sometió a una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) sobre una columna C8 empleando un sistema de RP-HPLC (Jasco). Las fracciones que mostraron propiedades de cierre de heridas se reunieron y se reconstituyeron en 1 ml de agua de calidad HPLC y se sometieron a una cromatografía de RP-HPLC sobre una columna C18. Las fracciones resultantes que inducían el cierre de la herida se analizaron con una espectrometría de masas de atrapamiento de iones con un LCQ Deca XP (Thermo Finnigan).

1.6 Síntesis de los péptidos

Los péptidos sintéticos se sintetizaron empleando una síntesis de péptidos en fase sólida utilizando la química de Fmoc con un sintetizador de péptidos MilliGen 9050 (Milligen-Bioscience), un marcaje con FITC, una purificación y la confirmación de la autenticidad tal como se ha descrito previamente (den Hertog *et al.*, 2005, Biochem. J.,

388:689-695).

1.7 Ensayo de proliferación

Se sembraron aproximadamente 1×10^4 células en placas de 24 pocillos y se incubaron durante la noche. Las células se trataron con Karyomax™ (Invitrogen) durante 6 horas. Después de lavar con SFM, se incubaron durante 24 h y se pulsaron con $1 \mu\text{Ci}$ de [metil-3H]-timidina durante 24 h a 37°C . Después las células se lavaron con PBS enfriado en hielo, metanol al 100% y TCA al 5%. El material insoluble en ácidos se disolvió en NaOH 0,5 M a temperatura ambiente y se contó el nivel de radiactividad empleando un contador de centelleo líquido (Packard). Los valores se convirtieron de cuentas absolutas a un porcentaje del control.

1.8 Microscopía y formación de imágenes

Microscopio: Leica DM IL PLAN 4-40x aumento, 0,5 lente; cámara: Leica DFC320; y software de adquisición: Leica IM500. Las imágenes se cuantificaron empleando Adobe Photoshop CS3. Además, se alteraron los niveles de brillo/contraste de los estudios de colocación con Adobe Photoshop CS3. La histatina marcada con FITC se incubó con las células durante dos horas. Se añadió PI para comprobar la internalización dependiente de la ruptura de las membranas. Se empleó azida 100 mM durante 1 hora. Las células se tripsinizaron como se describió anteriormente. Los estudios de colocación se realizaron empleando un Mitotracker (Invitrogen) y un Lysotracker (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Resultados

2.1 No existe correlación entre las propiedades de cierre de heridas de la saliva y diferentes secreciones salivares frente a tampón de saliva y sus concentraciones de EGF

Puesto que la mayoría de los estudios sobre la cicatrización de heridas emplean saliva procedente de roedores, en principio se afirmó que las secreciones salivares humanas aceleran en efecto el cierre de heridas en el modelo empleado en la presente. Algunos estudios han descubierto sustancias salivares que potencian la migración y la proliferación, mientras que otros estudios han descubierto factores en la saliva que inhiben la unión y la migración, tales como MUC5B. Pero la mayoría de estos estudios emplean proteínas aisladas, lo cual dificulta la interpretación de su contexto.

La figura 1 A ilustra un experimento de cierre de herida de rasguño *in vitro* típico en el que la saliva parotídea, después de 16 horas, induce el cierre de la herida de una monocapa epitelial. Se ensayaron diferentes secreciones salivares, al 30% (en v/v) en SFM, en este modelo con tampón de saliva como control negativo. La saliva parotídea fue la única secreción que mostró un cierre de la herida inducido (figura 1 B).

Después, se estudió el papel de EGF en el cierre de la herida inducido por saliva parotídea. Se estudió el cierre de la herida y las concentraciones de EGF de seis personas diferentes (figura 1 C). Todas las personas menos una mostraron un significativo cierre de la herida inducido, y las concentraciones de EGF no parecen corresponderse con el grado de cierre de la herida, lo cual indica que son responsables diferentes factores. Para rebatir completamente el papel de EGF como factor inductor del cierre de heridas en la saliva parotídea humana, se inhibió la activación de su receptor con AG1478 $1 \mu\text{M}$ (figura 1 D). Con el receptor bloqueado, la inducción por la saliva parotídea no solo se mantuvo, sino que incluso fue potenciada. Esto indica la responsabilidad de este receptor en el cierre en el control y, así, el fondo en este ensayo, muy probablemente provocado por la producción endógena de ligandos para el receptor de EGF. Por supuesto, EGF, a una concentración de 5 ng/ml, fue capaz de inducir el cierre de la herida con unas velocidades comparables a las de la saliva parotídea (figura 1 D). Sin embargo, la adición de AG1478 abolió el efecto, tal como se esperaba.

2.2 Las histatinas son factores de cierre de heridas en la saliva

Después de descartar el EGF como componente principal del cierre de heridas inducido por saliva parotídea, se empleó una RP-HPLC para separar la saliva parotídea y se determinó la actividad de las fracciones reunidas. En primer lugar, se descubrió actividad solo en la 2ª fracción. En esta fracción, la mayor parte de las proteínas presentes en la saliva parotídea, incluyendo la amilasa, está ausente, lo cual fue confirmado mediante una electroforesis gel de SDS-PAGE. La 2ª fracción puede separarse a su vez en dos fracciones, denominadas fracción 4 y 5. Se descubrió que la fracción 5 tenía actividad biológica. La fracción 5 se volvió a separar empleando una columna C18, y consistió en 4 proteínas, que se analizaron con una espectrometría de masas de atrapamiento de iones con un LCQ Deca XP (Thermo Finnigan). Solo se descubrió actividad biológica en el pico denominado 6. Mediante una MS de masas de atrapamiento de iones se descubrió que el pico 6 contenía un producto del gen Htn1. Htn1 es responsable de las histatinas 1 y 2, y Htn2 de las histatinas 3 y 5.

2.3 Potencia del cierre de heridas inducido por histatina, estereoespecificidad de la histatina 2, y actividades

candidadas de las diferentes histatinas

Después se estudió la potencia de las diferentes histatinas en la cicatrización de heridas y sus actividades candidadas. Las histatinas son conocidas por su actividad antimicrobiana. La histatina 5 en general tiene la menor LC_{50} (concentración a la cual 50% de los microorganismos son destruidos), y la actividad destructora se reduce a medida que aumenta la fuerza iónica.

Se ensayaron las histatinas 1, 2, 3, 5 y el enantiómero de la histatina 2 (denominado D-histatina 2) sintetizados sobre el cierre de heridas y las actividad candidadas. Se ensayaron los péptidos en las concentraciones de ensayo de 1, 5, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados demuestran que las concentraciones óptimas fueron, para la histatina 1, 10-30 $\mu\text{g/ml}$, para la histatina 2, 5-10 $\mu\text{g/ml}$, y para la histatina 3, 30-50 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 1). Las histatinas 1, 2 y 3 inducen el cierre de heridas. La D-histatina-2 y la histatina 5 no lo hacen.

La histatina 2 presenta la inducción más potente del cierre de heridas, lo cual no se diferencia significativamente del cierre de heridas inducido por EGF óptimo. Además, es necesaria la menor concentración de histatina 2 para lograr este cierre. De modo interesante, la D-histatina 2 no muestra inducción del cierre de heridas, lo cual indica una activación estereoespecífica al menos parcial de los procesos que inducen el cierre de heridas.

Además, la histatina 5 no muestra cierre de heridas inducido, lo cual implica una necesidad de partes de aminoácidos concretos en el péptido. De modo contradictorio, la actividad candidada en PPB 1 mM no muestra estereoespecificidad de la histatina 2 e indica que las histatinas 3 y 5 son las más potentes, es decir, con menor LC_{50} . Además, en SFM (150 mM), no pudo demostrarse actividad candidada. Además, una fuerza iónica de 50 mM, que está en el intervalo fisiológico de la saliva, demostró ser suficiente para abolir completamente el efecto candidada de las histatinas (los datos no se muestran). En conjunto, los resultados de los experimentos en la tabla 1 demuestran claramente que las características estructurales implicadas en la actividad candidada de la histatina 5 y las propiedades de cicatrización de heridas de las histatina 1, 2 y 3 son completamente diferentes.

2.4 Otras observaciones

En *Candida*, la histatina 5 es internalizada y se asocia con las mitocondrias energizadas. Dada la discrepancia mencionada anteriormente entre *C. albicans* y las células epiteliales, los inventores estaban muy interesados en saber si las histatinas son internalizadas y dónde se acumulan en las células. De acuerdo con sus propiedades de cicatrización de heridas, las histatinas 1, 2 y 3 son internalizadas, y la D-histatina 2 e histatina 5 no lo son (los datos no se muestran). El NaN_3 inhibe la función de la citocromo c oxidasa mediante su unión irreversible al cofactor hemo. Así, un tratamiento con NaN_3 condujo a los inventores a concluir que la internalización es dependiente de la energía. Un tratamiento con tripsina demostró que las proteínas de membrana son fundamentales para la internalización. Esto, además de la estereoespecificidad, indica un proceso mediado por receptores. Se emplearon marcadores específicos de mitocondrias y lisosomas ácidos para aclarar el destino de las histatinas después de ser internalizadas.

ERK1/2 es responsable del cierre de heridas inducido por histatina

Se ha propuesto un mecanismo en el que el cierre de heridas *in vitro* está coordinado por dos cascadas de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La cascada de p38^{MAPK} es responsable de la migración, y la cascada de quinasas regulada por señales extracelulares (ERK1/2) de la proliferación. Además, el bloqueo de una activa a la otra, lo cual indica un entendimiento cruzado. Otro artículo, que afirma este modelo, demuestra que la migración estimulada por el factor del crecimiento epidérmico (EGF) requiere la presencia continua del ligando. Por supuesto, es muy interesante estudiar las vías que se siguen cuando las células son estimuladas con histatinas. La figura 2 afirma el cierre de la herida inducida por la saliva independiente de EGFR de la figura 1, realizando el mismo ensayo con histatina 2. También confirma los estudios previamente mencionados, que demuestran que el cierre de heridas inducido por EGF depende de p38^{MAPK} . Sin embargo, el cierre de la herida inducido por histatina 2 no parece dependiente de p38^{MAPK} , sino de ERK1/2. Estos descubrimientos también sugieren una activación mediada por receptores. Las histatinas son relativamente baratas de producir, y así pueden ser candidatas a convertirse en una sustancia inductora de heridas clínica.

Ejemplo 2: Ensayo de diversos péptidos

Se sintetizaron péptidos según se describió anteriormente, y se ensayaron con el "ensayo de cierre de heridas" (experimentos de cicatrización de heridas *in vitro*) según el ejemplo 1 a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

La figura 3 muestra los péptidos ensayados y los resultados obtenidos. Además de las secuencias de aminoácidos mencionadas, se ensayaron péptidos en los que los primeros cuatro aminoácidos en el N-terminal fueron eliminados (RKFH). Su eliminación no influye en la actividad en el ensayo. Los resultados se compararon con el control. Los resultados demuestran que los aminoácidos según la invención muestran una buena actividad en los

ensayos.

Ejemplo 3: Péptidos cíclicos

Se produjo un péptido cíclico que tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:4, histatina 4, empleando una resina WANG LL disponible en Novabiochem (EMD Biosciences), descrita en detalle en Novabiochem Letter 2/06 (EMD Biosciences Inc. P.O. Box 12087 La Jolla, CA 92039-2087). La ciclación del péptido lineal unido a la resina se realizó según Goncalves *et al.* (Tetrahedron, 61 (2005), 7789-7795). Brevemente, después terminar el ensamblaje del péptido, la resina se trató con hidrazina al 2%/DMF a temperatura ambiente durante 3 min. El tratamiento se repitió dos veces más, y la resina parcialmente protegida se lavó a fondo con DMF. Para la ciclación intramolecular se emplearon 0,3-3 M equiv. de cada uno de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(pirrolidino)fosfonio (PyBOP) y HOBt, en presencia de 6 M equiv. de diisopropiletilamina (DIEA) durante 72 h. El producto obtenido se fraccionó mediante cromatografía de HPLC y se ensayaron las fracciones resultantes.

Después, el péptido cíclico se comparó con el péptido lineal en los experimentos de cicatrización de heridas *in vitro*, según se describe en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 4.

La figura 4 muestra la actividad relativa de cierre de heridas del péptido cíclico (C-Hst1) o del péptido lineal (Hst1) a diferentes concentraciones de cada uno de los péptidos. Incluso a una concentración de $1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ de CH-HST1, el cierre de la herida relativo sigue siendo de 1,5, mientras que la actividad de cierre de heridas de HST1 disminuye justo hasta por encima de 1 (una actividad relativa de cierre de heridas de 1 es la actividad de cierre de la herida cuando no se añade péptido al ensayo descrito anteriormente). Los resultados claramente demuestran que los péptidos cíclicos según la invención, que tienen una secuencia de aminoácidos según la invención, muestran una actividad notablemente aumentada, en comparación con los péptidos lineales según la invención, incluso cuando la concentración es 5, 10 o incluso 100 veces menor, en comparación con el péptido lineal.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Vereniging voor christelijk hoger onderwijs, wetenschappelijk onderzoek en patientenzorg
 <120> Uso de péptidos para estimular la cicatrización de heridas
 <130> P29167PC00/RRA
 5 <160> 29
 <170> PatentIn version 3.3

 <210> 1
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> desconocido
 <220>
 <223> artificial
 <400> 1
 15
 Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp Asn
 1 5

 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 2

 Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr
 1 5
 25
 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> sintética
 <400> 3

 Glu Lys His His Ser His
 1 5
 35
 <210> 4
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> desconocido
 <220>
 40 <223> artificial
 <400> 4

 Asp Ser His Glu Lys Arg His His Gly Tyr Arg Arg Lys Phe His Glu
 1 5 10 15
 Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Tyr Asp Asn
 35
 45
 <210> 5
 <211> 27

<212> PRT
 <213> desconocido
 <220>
 <223> artificial
 <400> 5

5
 Arg Lys Phe His Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp Asn
 20 25

<210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> desconocido
 <220>
 <223> artificial
 <400> 6

10
 15
 Asp Ser His Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His Glu
 1 5 10 15
 Lys His His Ser His Arg Gly Tyr Arg Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp Asn
 20 25 30

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 7

20
 25
 Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr
 1 5 10 15

ES 2 543 254 T3

5
 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 8

Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp
 1 5 10 15
 Asn

10
 <210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 9

15
 Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp
 1 5 10 15
 Asn

Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Tyr Asp Asn

<210> 10
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 10

His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser Asn
 1 5 10 15
 Tyr Leu Tyr Asp Asn
 20

<210> 11
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 11

Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly
 1 5 10 15
 Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp Asn

<210> 12
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 12

Phe His Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp
 1 5 10 15
 Tyr Gly Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp Asn
 20 25

<210> 13
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 13

Arg Lys Phe His Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 Gly Asp Tyr

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 14

Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 15

Arg Lys Phe His Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 Gly Asp Tyr Gly Ser
 20

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 16

Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly
 1 5 10 15
 Ser

<210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 17

Arg Lys Phe His Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr
 20

<210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 18

Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly
 1 5 10 15
 Ser Asn Tyr

<210> 19
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 19

Arg Lys Phe His Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr Leu Tyr
 20 25

<210> 20
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 20

Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly
 1 5 10 15
 Ser Asn Tyr Leu Tyr
 20

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 21

Arg Lys Phe His Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 22

Glu Lys His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly
 1 5 10

<210> 23
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 23

His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser Asn
 1 5 10 15
 Tyr Leu Tyr

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 24

Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 25

Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
<223> sintética
<400> 26

Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp Asn
1 5 10 15

5

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> sintética
<400> 27

10

Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser Asn Tyr Leu Tyr Asp Asn
1 5 10

15

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> sintética
<400> 28

20

His His Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser
1 5 10 15

25

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> sintética
<400> 29

30

Ser His Arg Glu Phe Pro Phe Tyr Gly Asp Tyr Gly Ser
1 5 10

REIVINDICACIONES

1.- Un péptido para su uso para cerrar una herida, en el que el péptido comprende:

a. al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 6 aminoácidos presentes de modo adyacente en la histatina 2; y/o

5 b. al menos una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 1 aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos de al menos 6 aminoácidos presentes de modo adyacente en la histatina 2.

10 2.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos es seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 1 aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3.

15 3.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos es seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 1 aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

20 4.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de aminoácidos es seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 1 aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:29.

25 5.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.

6.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:7-29.

30 7.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende 8-40 aminoácidos, más preferiblemente 12-39 aminoácidos, aún más preferiblemente 27-38 aminoácidos y/o en el que el péptido es un L-péptido y/o en el que el péptido es un péptido cíclico.

35 8.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según la reivindicación 7, en el que el péptido cíclico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una delección y/o una inserción como máximo en 1 aminoácido en dicha secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29 y/o en el que dicho péptido cíclico tiene una actividad relativa de cierre de heridas que es igual a la actividad relativa de cierre de heridas de un péptido lineal según SEQ ID NO:4 a una concentración de 1 μ M, a una concentración de dicho péptido cíclico que es al menos 5, más preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 100 veces menor.

40 9.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho péptido es un dímero o un multímero, y cada monómero que forma el dímero o el multímero preferiblemente consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, incluso más preferentemente cada monómero que consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:29 y/o en el que dicho péptido está conjugado y/o en el que dicho péptido ha sido sometido a un tratamiento que restringe la libertad conformacional del péptido, preferiblemente en el que dicho péptido ha sido restringido mediante entrecruzamiento.

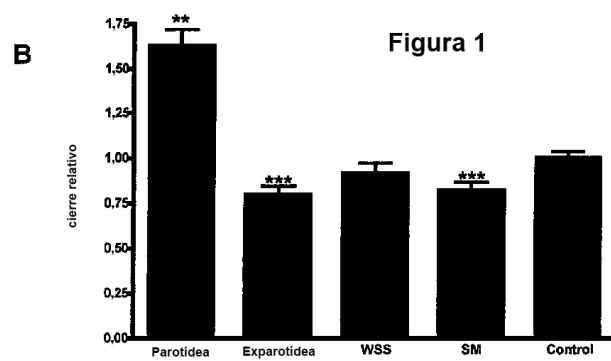
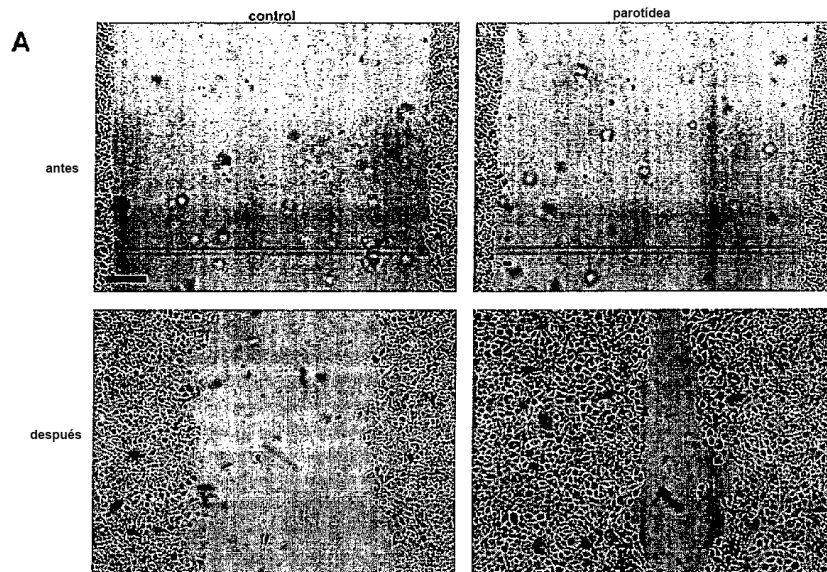
45 10.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se emplea también un factor del crecimiento, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF), factor del crecimiento transformante (TGF), factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), en el cierre de la herida.

50 11.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el

que la herida es seleccionada del grupo que consiste en una herida de la piel, una úlcera de decúbito y/o una herida externa.

- 5 12.- Un péptido para su uso para cerrar una herida según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el péptido está incluido en una composición, **que se caracteriza porque** la composición comprende también al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en el que el excipiente es farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de una herida, y preferiblemente comprende también un factor del crecimiento, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF), factor del crecimiento transformante (TGF), factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), factor del crecimiento epidérmico (EGF), y factor del crecimiento de fibroblastos (FGF).
- 10 13.- Una composición para su uso en el tratamiento de una herida, en la que la composición comprende un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, una deleción y/o una inserción como máximo en 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en la que la composición comprende también al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en la que el excipiente es farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de una herida.

15



C

Persona	Cierre rel. $\pm$ desv. est.	EGF (pg/ml)
I	1,43 $\pm$ 0,12	374
II	1,33 $\pm$ 0,21	852
III	1,30 $\pm$ 0,12	1151
IV	1,20 $\pm$ 0,18	946
V	1,19 $\pm$ 0,13	865
VI	1,16 $\pm$ 0,22	699
Control	1,00 $\pm$ 0,07	0

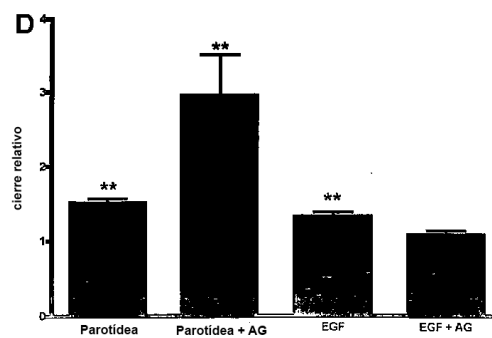


Figura 2

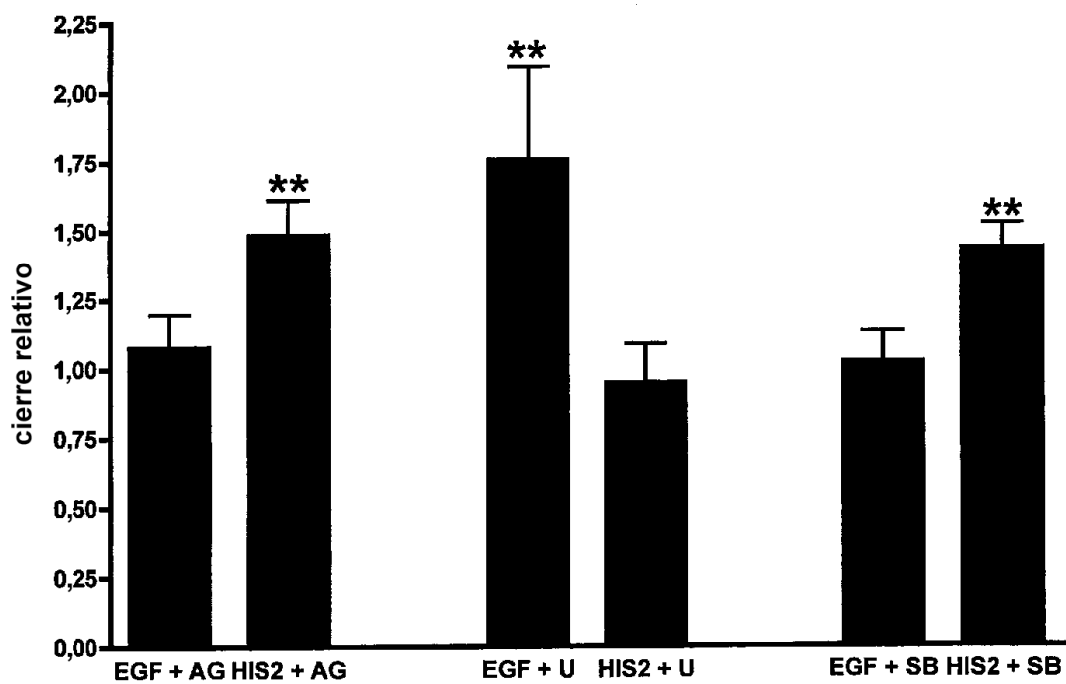


Figura 3

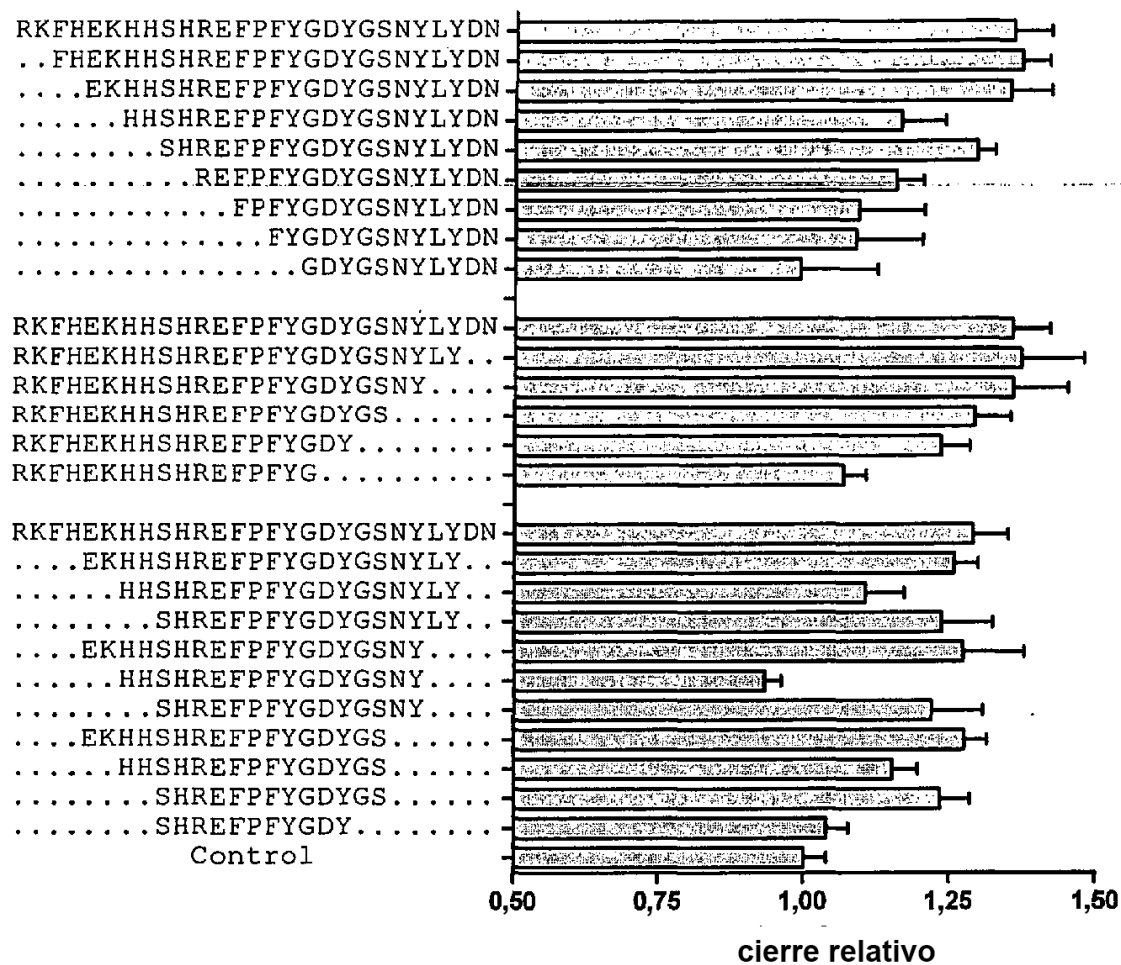


Figura 4

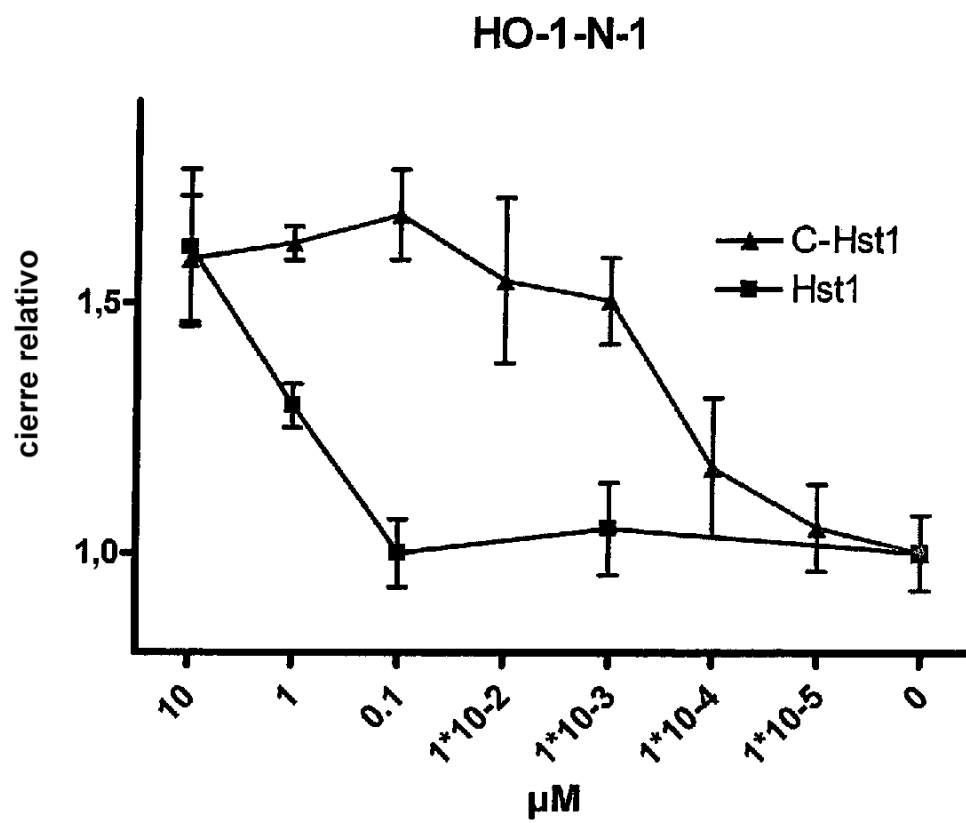


Tabla 1

Péptido	Secuencia	Cierre de la herida cierre rel. $\pm$ DE	Actividad candidacida LC50 $\pm$ DE	
			1mM PPB	SFM
Histatina 1	DSHEKRHHGYRRKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN	$1,22 \pm 0,12^*$	$6,0 \pm 0,3$	>100
Histatina 2	RKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN	$1,36 \pm 0,13^*$	$13,8 \pm 1,9$	>100
D-histatina 2	RKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN	$0,99 \pm 0,14$	$10,7 \pm 1,2$	>100
Histatina 3	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHHSHR.....G.YRSNYLYDN	$1,21 \pm 0,12^*$	$1,1 \pm 0,1$	>100
Histatina 5	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHHSHR.....G.Y	$1,04 \pm 0,11$	$2,3 \pm 0,1$	>100
EGF		$1,41 \pm 0,12^*$		