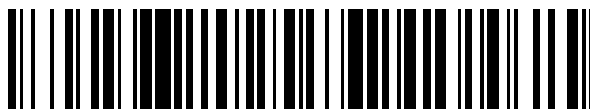


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 363**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08	(2006.01) A61K 38/17	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)	
C07K 5/10	(2006.01)	
C07K 7/06	(2006.01)	
C07K 7/08	(2006.01)	
C07K 14/47	(2006.01)	
A61K 38/07	(2006.01)	
A61L 31/08	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
C07K 14/705	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2005** **E 10185398 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016** **EP 2377546**

54 Título: **Composiciones y métodos para promover la cicatrización de heridas y la regeneración tisular**

30 Prioridad:

21.12.2004 US 638366 P
15.04.2005 US 671796 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2017

73 Titular/es:

**MUSC FOUNDATION FOR RESEARCH
DEVELOPMENT (100.0%)
261 Calhoun Street Suite 305 P.O. Box 250194
Charleston, SC 29425, US**

72 Inventor/es:

**GOURDIE, ROBERT;
GHATNEKAR, GAUTAM y
JOURDAN, JANE**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 620 363 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

Composiciones y métodos para promover la cicatrización de heridas y la regeneración tisular

5 Antecedentes de la invención

Un niño normal sabe que si un lagarto escinco pierde la cola al final le crecerá otra. Además, los niños y mayores que tienen el hábito de estudiar tales cosas entienden bien que muchos animales inferiores son capaces de regenerar estructuras bastante complejas, incluyendo extremidades completas y órganos tras una lesión. Por ejemplo, a los peces les puede volver a crecer un corazón después de que una parte significativa del viejo corazón del pez se haya cortado (Poss *et al.*, 2002). Esto es un resultado sorprendente cuando se reflexiona sobre lo esencial que es el corazón en la supervivencia minuto a minuto de la mayoría de los animales.

Sin embargo, la regeneración de tejido, extremidades y órganos tras lesión en personas no es tan sencilla como en los peces. Mientras que los tejidos humanos dañados por heridas mecánicas, procesos de enfermedad y otras causas son capaces de cicatrizar, la función y estructura de tejido complejo raras veces, por no decir nunca se restauran completamente. En su lugar, la recuperación de casi todos los tejidos de una lesión en humanos y otros vertebrados superiores está dominada por la formación de tejido cicatricial. El ejemplo más familiar de esto son las cicatrices decoloradas y fibróticas que persisten tras la cicatrización de un raspón o corte en la piel. Menos apreciada es la formación de tejido cicatricial glial tras lesión en el cerebro o la médula espinal, que es uno de los principales obstáculos para la restauración de la función neuronal tras el daño al sistema nervioso central (Silver y Miller JH, 2004). Actualmente no existen medios de tratamiento o prevención de tal formación de cicatrices y de promoción de la regeneración de la función y estructura de tejido complejo tras lesión.

25 Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y opcionalmente una secuencia o transportador de internalización celular para su uso en un método de tratamiento, en el que el polipéptido se recubre sobre un implante médico o material de tratamiento de heridas, según la reivindicación 1 adjunta. Se proporcionan realizaciones preferidas de la presente invención según las reivindicaciones dependientes.

Breve resumen de la invención

También se divulga un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos carboxilo terminal de una conexina alfa (también denominado en el presente documento polipéptido de conexina alfa carboxilo terminal (ACT)), o una variante conservativa del mismo.

También se divulga en el presente documento un método de promoción de la cicatrización de heridas tras lesión tisular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una o más de las composiciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las ventajas adicionales del método y las composiciones divulgadas se establecerán en parte en la descripción que sigue, y en parte se entenderán de la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica del método y las composiciones divulgadas. Las diversas ventajas del método y las composiciones divulgadas se realizarán y lograrán mediante los elementos y las combinaciones particularmente señaladas en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son sólo a modo de ejemplo y explicativas y no son restrictivas de la invención tal como se reivindica.

50 Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos ilustran varias realizaciones del método y las composiciones divulgadas y junto con la descripción, sirven para explicar los principios del método y las composiciones divulgadas.

La figura 1 muestra que un polipéptido de conexina alfa carboxilo terminal (ACT) aumenta el grado de formación de uniones comunicantes Cx43 en miocitos neonatales cultivados. Los miocitos de corazones de ratas neonatas se hicieron crecer hasta formar una monocapa casi confluyente sobre una placa de tejido tisular según protocolos convencionales. Posteriormente se permitió que los cultivos se cultivaran durante 5 días más en medio de cultivo que comprende (a) péptido ACT 1 30 μ M (SEQ ID NO: 2), (b) péptido de control no activo 30 μ M (SEQ ID NO: 55) o (c) solución salina tamponada con fosfato (PBS) que no contiene péptido ACT o control. El medio de cultivo con péptidos o control de vehículo añadidos se cambió cada 24 horas durante el experimento. (a) indica que el péptido ACT aumentó enormemente el grado de formación de uniones comunicantes Cx43 (puntos y líneas indicados mediante puntas de flechas) entre los miocitos en relación con las condiciones de control (b) y (c). Este aumento en la formación de uniones comunicantes Cx43 en respuesta al péptido ACT es compartido por varios tipos de células que expresan Cx43.

La figura 2 muestra que el péptido ACT inhibe la proliferación y migración de fibroblastos transformados (células NIH-3T3) lesionados por un arañazo. Se trató previamente una monocapa de NIH-3T3 con péptido ACT 1 (SEQ ID NO: 2) durante 24 h, y se “lesionó por arañazo” con una punta de pipeta de p200. Se permitió posteriormente que la “lesión por arañazo” “cicatrizara” durante 24 horas en presencia de (a, b) péptido ACT 1 30 μ M (SEQ ID NO: 2), (c, d) péptido de control no activo 30 μ M (SEQ ID NO: 55) o (e, f) disolución de control de vehículo que no contiene péptido ACT o péptido de control. La “lesión por arañazo” de las células tratadas con péptido ACT permanece relativamente sin cicatrizar tras 24 horas (a), repoblando algunas células (flecha grande) el área dentro de los bordes de la “lesión por arañazo” inicial (es decir, dentro del área marcada mediante las puntas de flecha negras pequeñas). Por el contrario, en las condiciones de control en (c) y (e), grandes números de células (flecha grandes) han repoblado la zona dentro de la “lesión por arañazo” inicial. La repoblación de la “lesión por arañazo” se produce en parte por medio de migración de las células transformadas que se arrastran a la zona de la “lesión por arañazo”. Las figuras (b), (d) y (f) muestran el inmunomarcaje del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) de células en la “lesión por arañazo” o en el borde de la lesión. Las células tratadas con péptido ACT (b) muestran sólo baja luminosidad lo que concuerda con el fondo y ausencia de proliferación. Sólo en las dos condiciones de control mostradas en (d) y (f), se observan células en proliferación marcadas de manera brillante (flechas blancas). Esto indica que el péptido ACT también ha reducido la proliferación de las células transformadas.

La figura 3 muestra la cuantificación de la inhibición de la migración mediante péptidos ACT tras lesión en un modelo celular experimental. Los fibroblastos NIH-3T3 se “lesionaron por arañazo” y se sometieron a la presencia continua de péptido ACT 1 30 μ M (SEQ ID NO: 2) durante 24 horas o las condiciones de control tal como se explican de manera resumida en la figura 2. La figura (a) muestra el borde de la lesión de células de control tratadas con péptido no activo y péptido ACT al final del periodo de 24 horas. Las células se han marcado con faloidina fluorescente para ayudar a la visualización. Las células tratadas con péptido ACT muestran bajos niveles de repoblación del área de lesión por arañazo (flechas de doble cabeza blancas). La figura (b) muestra un gráfico de barras del % de área de células que repueblan la lesión por arañazo tras 24 horas. La reducción de células en el área de lesión en presencia de péptido ACT es drástica, con una $p < 0,000001$.

La figura 4 muestra que la expresión de un polinucleótido que codifica para péptido ACT operativamente unido a un promotor en la célula epitelial WB-F344 inhibe la migración tras lesión por arañazo en un modelo celular experimental. Las células WB-F344 son una línea celular epitelial de rata transformada derivada mediante tratamiento de células del hígado de rata aisladas con un agente que provoca cáncer (Tsao *et al.*, 1984; Hayashi *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2001). Se transfectaron las células WB-F344 con un constructo de plásmido de expresión de ADNc y se seleccionó con antibióticos usando protocolos convencionales para generar líneas celulares que expresan de manera estable un polinucleótido que codifica para el péptido ACT (SEQ ID NO: 6) operativamente unido a una secuencia de promotor o un polinucleótido de proteína fluorescente verde (GFP) operativamente unido a una secuencia de promotor como control. El polinucleótido que codifica para el péptido ACT también codificó para GFP. Como tal, la expresión del péptido ACT podía someterse a ensayo mediante óptica de fluorescencia de GFP convencional en un microscopio óptico. (a) y (b) muestran imágenes de alto aumento de fluorescencia de GFP en líneas celulares de WB-F344 que expresan GFP más la secuencia de péptido ACT de extremo carboxilo terminal (a) o GFP solo (b). Las monocapas casi confluentes de las líneas celulares de WB-F344 se “lesionaron por arañazo” y se permitió que “cicatizaran” durante 24 horas. De manera similar a los casos de control de las células NIH-3T3 tratadas con vehículo o péptido de control no activo, la línea celular epitelial de control que expresa GFP repobló la lesión por arañazo (d). Sin embargo, en la línea celular epitelial que expresó de manera estable el polinucleótido que codifica para el péptido ACT operativamente unido a una secuencia de promotor, se inhibió la repoblación de la lesión por arañazo (c).

La figura 5 muestra que el péptido ACT reduce la inflamación, mejora la cicatrización y reduce la formación de cicatrices tras la lesión cutánea incisional en un ratón neonato. Se desensibilizaron crías de ratón neonatos usando hipotermia. Se realizó una lesión cutánea incisional de 4 mm de largo usando un bisturí a través del grosor completo de la piel (descendiendo hasta el nivel del músculo subyacente) en la línea dorsal media entre los omóplatos. Entonces se aplicaron a las lesiones incisionales 30 μ l de una disolución de gel plurónico (F-127) al 20% que contenía o bien nada (control) o bien péptido ACT 1 disuelto (SEQ ID NO: 2) a una concentración de 60 μ M. Posteriormente se aplicó gel de control o que contenía péptido ACT 24 horas tras la aplicación inicial. No se realizó aplicación adicional de gel de control y que contenía péptido ACT tras la segunda aplicación. A las 48 horas la lesión tratada con péptido ACT (a) está significativamente más cerrada, menos inflamada, menos hinchada (se observan crestas en el borde de la herida), y generalmente más cicatrizada en apariencia que la lesión de control que no recibió péptido ACT (b). Estas diferencias en la inflamación, hinchazón y cicatrizado entre el control y lesión tratada con péptido ACT y control persistían en los puntos de tiempo de 72 (c, d) y 96 (e, f) horas. A los 7 días, la herida con péptido ACT (g), tenía un aspecto más suave y menos cicatrizado que la lesión tratada con péptido de control (h). Obsérvese que las imágenes de la misma lesión sobre el mismo animal se muestran en puntos de tiempo diferentes durante el transcurso de tiempo de la cicatrización.

La figura 6 muestra que el péptido ACT reduce la inflamación, mejora la cicatrización y reduce la formación de cicatrices tras una lesión cutánea excisional grande en ratones adultos. Los ratones adultos anestesiados tenían lesiones cutáneas excisionales circulares de 8 mm de ancho realizadas mediante unas tijeras quirúrgicas finas

descendiendo hasta el músculo subyacente en la línea dorsal media entre los omóplatos (es decir, tal como se muestra en (a) y (b)). Se delimitó el límite de la lesión mediante un corte de molde circular de 8 mm de ancho en una lámina de plástico. Entonces se aplicaron a las lesiones excisionales 100 μ l de una disolución de gel plurónico al 30% que contenía o bien nada (control) o bien péptido ACT 1 disuelto (SEQ ID NO: 2) a una concentración de 100 μ M. Posteriormente se aplicó gel de control o que contenía péptido ACT 24 horas tras la aplicación inicial. No se realizaron aplicaciones adicionales de gel de control o que contenía péptido ACT tras la segunda aplicación. La lesión excisional grande tratada con péptido ACT (a, c e, g, i) se cerró más rápidamente, estaba menos inflamada en apariencia, cicatrizó más rápido y con menos cicatrices que la lesión de control que no recibió péptido ACT (b, d, f, h, j) a lo largo del transcurso de tiempo de 14 días. De hecho, la lesión de control a los 14 días todavía muestra una costra parcial que indica que la cicatrización aguda de la lesión fue incompleta (j). Obsérvese que las imágenes de la misma lesión sobre el mismo animal se muestran en puntos de tiempo diferentes durante el transcurso de tiempo de la cicatrización.

La figura 7 muestra que el péptido ACT reduce la densidad de células inflamatorias tras la lesión cutánea excisional en ratones adultos. Se tomaron biopsias cutáneas del sitio de la herida completa de algunos de los ratones 24 horas tras la lesión excisional en el experimento descrito en la figura 6. Las figuras (a) y (b) muestran vistas de estudio de bajo aumento de secciones transversales de cerca del centro de la herida de lesiones tratadas con control y péptido ACT respectivamente. El borde de la herida (marcado mediante flechas pequeñas), rodeado de piel de aspecto histológico normal, puede observarse en ambos casos. Se coloca un rectángulo negro sobre las imágenes en (a) y (b) en el borde de la herida a mano izquierda. Las estructuras histológicas dentro de estos dos rectángulos se muestran a más aumentos en (c) y (d) para tejidos tratados con control y péptido ACT, respectivamente. De mayor interés es un tejido de "tipo collar" de material fibroso alineado (con flecha) que se proyecta desde las partes basales de la lesión a o hacia la superficie exterior y borde de la herida de la lesión. El sustrato fibroso alineado tiene el aspecto de estar mucho más organizado en la lesión de control (d) que en la lesión tratada con péptido ACT (c). Además, existe una densidad considerablemente más baja de células inflamatorias que tachonan el sustrato fibroso en el tejido tratado con péptido ACT. Esto se confirma en (e) y (f) donde las regiones de sección histológica dentro de los rectángulos negros mostradas en (c) y (d) se muestran respectivamente a más aumentos. Las células inflamatorias que tachonan el sustrato fibroso alineado incluyen mastocitos, neutrófilos y macrófagos. Estas células inflamatorias aparecen a una densidad muy superior en la lesión de control que en la lesión tratada con péptido ACT.

La figura 8 muestra que el péptido ACT promueve la cicatrización, reduce la formación de cicatrices y promueve la regeneración de la estructura de tejido compleja tras la lesión cutánea excisional en ratones adultos. Al final del periodo de 14 días en el experimento descrito en la figura 6, se tomaron biopsias cutáneas de la lesión excisional completa y se tiñeron histoquímicamente con H&E las secciones histológicas de esas muestras cutáneas. Las figuras (a) y (b) muestran vistas de estudio de bajo aumento de secciones transversales de cerca del centro de la lesión de péptido ACT y control respectivamente. El borde de la herida (marcado mediante flechas pequeñas), rodeado de piel de aspecto histológico normal, puede observarse en ambos casos. Se coloca un rectángulo negro sobre las imágenes en (a) y (b) cerca del centro de cada lesión. Las estructuras histológicas dentro de estos dos rectángulos se muestran a más aumentos en (c) y (d) para los tejidos de péptido ACT y control respectivamente. Es evidente que el tejido dentro del locus de la lesión tratada con péptido ACT tiene considerablemente más complejidad. En la superficie externa de la herida tratada con ACT, existe una capa continua de células epiteliales que indican que la reepitelización de la superficie lesionada es completa, mientras que el epitelio es todavía relativamente delgado cerca del centro de la herida (c). La regeneración de folículos pilosos ya puede observarse diferenciándose de novo a partir de células madre en el nuevo epitelio que recubre la lesión cicatrizada (c, flechas pequeñas). En comparación, la reepitelización de la superficie de la lesión es incompleta y no hay ningún signo de regeneración de folículos pilosos en el epitelio de la lesión de control (d). Bajo el epitelio reformado de la piel lesionada tratada con péptido ACT, se observa una restauración considerable de la complejidad estructural normal, con estructuras glandulares, tejidos fibroso y conjuntivo, tejidos vasculares, miocitos y adipocitos en conjunto (a, c). Como con los folículos pilosos, esta complejidad tisular se regeneró mediante la diferenciación de células madre. Por el contrario, en la lesión de control el tejido de la herida está dominado completamente por un tapón uniforme y grande de tejido cicatricial fibroso (b, d), sin otra complejidad de estructura de tejido evidenciado particularmente dentro de este tejido cicatricial.

La figura 9 muestra que los péptidos ACT reducen la inflamación, mejoran la cicatrización y reducen la formación de cicatrices tras la lesión cutánea excisional en ratones adultos. Los ratones adultos anestesiados tenían 2 heridas cutáneas excisionales pequeñas (5 mm de diámetro) realizadas mediante unas tijeras quirúrgicas finas sobre el cuello y (parte superior) de la espalda. Los límites de las lesiones se delimitaron mediante un corte de molde circular de 5 mm de ancho en una lámina de plástico. Entonces se aplicaron a las lesiones excisionales 50-60 μ l de una disolución de gel plurónico al 20% que contenía o bien nada (control) o bien uno de los péptidos ACT (ACT 2-SEQ ID NO: 1, ACT 1-SEQ ID NO: 2, ACT 3-SEQ ID NO: 3, ACT 4-SEQ ID NO: 4, ACT 5-SEQ ID NO: 5) disuelto en concentraciones de 100 μ M. Posteriormente se aplicó gel de control o que contenía péptido ACT 24 horas tras la aplicación inicial. No se realizaron aplicaciones adicionales de gel de control y que contenía péptido ACT tras la segunda aplicación. Puede observarse en el caso de péptidos ACT 1 (e-h), ACT 2 (i-1), ACT 3 (m-p) y ACT 5 (u-x) que las lesiones excisionales se cerraron más rápidamente, estaban significativamente menos inflamadas en apariencia, cicatrizaron más rápido y con menos cicatrices que la lesión de control que no recibió péptido ACT (a-d)

a lo largo del transcurso de tiempo de 240 horas (10 días). El péptido ACT 4 (q-t) también mostró una mejora modesta en la cicatrización con respecto al control durante el transcurso de tiempo, aunque menor que otros péptidos. Obsérvese que la misma herida sobre el mismo animal se muestra en puntos de tiempo diferentes durante el transcurso de tiempo de la cicatrización.

La figura 10 muestra que el péptido ACT reduce el número y la densidad de astrocitos que forman cicatriz glial tras la lesión de penetración cerebral en una rata adulta. (b) y (c) muestran vistas de estudio de bajo aumento de secciones del tejido cerebral (corteza) que rodea a implantes de membrana de fibra hueca (MFH) llenos con péptido ACT (100 μ M) más gel de vehículo (b) o gel de vehículo de colágeno solo como control (c). En el tejido de control (c), se observa una alta densidad de astrocitos positivos para GFAP inmunomarcados cerca del sitio de la lesión producida por la MFH. La densidad de estas células parece disminuir ligeramente de manera distal de la lesión. Por el contrario, se observa una densidad mucho más baja de astrocitos positivos para GFAP adyacentes a la MFH llena de péptido ACT (b). De hecho, los niveles de células positivas GFAP no difieren de los observados en un tejido cerebral sin daño normal. Se muestran las regiones de tejido dentro de los rectángulos blancos en las figuras (b) y (c) a más aumentos en (d) y (e) respectivamente. En la lesión cerebral tratada mediante péptido ACT (d), puede observarse que los astrocitos positivos para GFAP no sólo son menos numerosos, sino que también son más pequeños que los observados en la lesión de control (e).

La figura 11 muestra que el péptido ACT promueve el mantenimiento neuronal y la regeneración neuronal tras la lesión de penetración cerebral en una rata adulta. (a) y (b) muestran vistas de estudio de bajo aumento de secciones del tejido cerebral (corteza) que rodea a implantes de MFH (el límite de implante o lesión se muestra mediante flechas) llenos de gel de vehículo de colágeno de control o péptido ACT más gel de vehículo 1 semana tras la lesión de penetración cerebral. En el tejido de control (b), se observan una alta densidad de astrocitos positivos para GFAP inmunomarcados y una baja densidad de neuronas inmunoetiquetadas con NeuN cerca del sitio de la lesión producida por la MFH. La densidad de estas células parece disminuir y aumentar, respectivamente, distalmente de la MFH. Por el contrario, se observaron una densidad mucho más baja de astrocitos positivos para GFAP y un número superior de neuronas inmunoetiquetadas con NeuN proximales (así como distales) a la MFH llena de péptido ACT (a). Las áreas en (a) y (b) proximales a las MFH se muestran en vistas de alto aumento en (c) y (b), respectivamente. De nuevo, se observa en el tejido de control (d) un aumento notable en la densidad de astrocitos positivos para GFAP y una densidad reducida de neuronas positivas para NeuN en comparación con el tejido tratado con péptido ACT (c). Se observa un patrón complementario cerca de la MFH que contiene péptido ACT, predominando neuronas positivas para NeuN con respecto a astrocitos (c). De manera interesante, la vista de alto aumento mostrada en (c) revela una alta frecuencia de neuronas en el procedimiento de fisión en relación con el control (d).

Descripción detallada de la invención

El método y las composiciones divulgadas pueden entenderse más fácilmente por referencia a la descripción detallada siguiente de realizaciones particulares y los ejemplos incluidos en la misma y a las figuras y su descripción anterior y siguiente. En el presente documento se divulga un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos carboxilo terminal de una conexina alfa (también denominado en el presente documento polipéptido de conexina alfa terminal (ACT)), o una variante conservativa del mismo. En un aspecto, tras la lesión tisular, el polipéptido ACT divulgado reduce la inflamación, promueve la cicatrización, reduce la formación de cicatrices, aumenta la resistencia a la tracción y promueve la regeneración de tejido complejo. En otro aspecto, el polipéptido divulgado aumenta el grado de agregados de canal de unión comunicante formados a partir de conexinas.

Debe entenderse que las composiciones y métodos divulgados no se limitan a métodos de síntesis específicos, técnicas analíticas específicas, o a reactivos particulares a menos que se especifique otra cosa y, como tales, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir sólo realizaciones particulares y no pretende ser limitativa.

Se divulgan materiales, composiciones y componentes que pueden usarse para, pueden usarse conjuntamente con, pueden usarse en la preparación de, o son productos del método y las composiciones divulgadas. Estos y otros materiales se divulgan en el presente documento, y se entiende que cuando se divulgan combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, aunque pueda no divulgarse específicamente la referencia específica de cada una de las diversas combinaciones y permutaciones individuales y colectivas de estos compuestos, se contemplan cada una de ellas y se describen específicamente en el presente documento. Por ejemplo, si se divulga un vector y se comenta y se comentan varios componentes de vector incluyendo los promotores, se contemplan específicamente cada uno de ellos y cada combinación y permutación de promotores y otros componentes de vector y las modificaciones que son posibles a menos que se indique específicamente lo contrario. Por tanto, si se divulgan una clase de moléculas A, B y C así como una clase de moléculas D, E y F y se divulga un ejemplo de una molécula de combinación, A-D, entonces aunque no se mencione cada una de ellas individualmente, cada una de ellas se contempla individual y colectivamente. Por tanto, en este ejemplo, se contemplan cada una de las combinaciones A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F específicamente y deben considerarse divulgadas a partir de la divulgación de A, B y C; D, E y F; y la combinación de los ejemplos A-D. Del mismo modo, también se contempla y se divulga específicamente cualquier subconjunto o combinación de los

5 mismos. Por tanto, por ejemplo, los subgrupos de A-E, B-F y C-E se contemplan y deben considerarse divulgados específicamente a partir de la divulgación de A, B y C; D, E y F; y la combinación de los ejemplos A-D. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta solicitud incluyendo, pero sin limitarse a, las etapas en los métodos de producción y uso de las composiciones divulgadas. Por tanto, se entiende que si existe una variedad de etapas adicionales que puedan realizarse, cada una de esas etapas adicionales puede realizarse con cualquier realización específica o combinación de realizaciones de los métodos divulgados, y que cada combinación de este tipo se contempla y debe considerarse divulgada específicamente.

10 En el presente documento, se divulgan una variedad de secuencias y éstas y otras pueden encontrarse en Genbank en www.pubmed.gov. Los expertos en la técnica entienden cómo resolver diferencias y discrepancias de secuencias y cómo ajustar las composiciones y los métodos en relación con una secuencia particular con respecto a otras secuencias relacionadas. Pueden diseñarse cebadores y/o las sondas para cualquier secuencia dada la información divulgada en el presente documento y conocida en la técnica.

15 El polipéptido divulgado en el presente documento puede ser cualquier péptido que comprenda los aminoácidos más carboxilo terminales de una conexina alfa, en el que el polipéptido no comprende la proteína conexina alfa de longitud completa. Por tanto, en un aspecto, el polipéptido divulgado no comprende el dominio N-terminal citoplasmático de la conexina alfa. En otro aspecto, el polipéptido divulgado no comprende los dos dominios extracelulares de la conexina alfa. En otro aspecto, el polipéptido divulgado no comprende los cuatro dominios de transmembrana de la conexina alfa. En otro aspecto, el polipéptido divulgado no comprende el dominio de bucle citoplasmático de la conexina alfa. En otro aspecto, el polipéptido divulgado no comprende la parte de la secuencia del dominio carboxilo terminal citoplasmático de la conexina alfa proximal al cuarto dominio de transmembrana. Hay un residuo de prolina o glicina conservado en las conexinas alfas situado de manera constante algunos de 17 a 30 aminoácidos desde el aminoácido de carboxilo terminal (tabla 2). Por ejemplo, para Cx43 humana, un residuo de prolina en el aminoácido 363 se sitúa 19 aminoácidos por detrás de la isoleucina más carboxilo terminal. En otro ejemplo, para Cx43 de pollo, un residuo de prolina en el aminoácido 362 se sitúa 18 aminoácidos por detrás de la isoleucina más carboxilo terminal. En otro ejemplo, para Cx45 humana un residuo de glicina en el aminoácido 377 se sitúa 19 aminoácidos por detrás de la isoleucina más carboxilo terminal. En otro ejemplo, para Cx33 de rata, un residuo de prolina en el aminoácido 258 se sitúa 28 aminoácidos por detrás de la metionina más carboxilo terminal. Por tanto, en otro aspecto, el polipéptido divulgado no comprende aminoácidos proximales a dicho residuo de prolina o glicina conservado de la conexina alfa. Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender los 4 a 30 aminoácidos más c-terminales de la conexina alfa, incluyendo los 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 aminoácidos más c-terminales de la conexina alfa. El polipéptido según la invención consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y opcionalmente una secuencia o transportador de internalización celular. SEQ ID NO: 2 corresponde a los 9 aminoácidos más c-terminales de Cx43 humana.

Los aminoácidos más carboxilo terminales de una conexina alfa en los péptidos divulgados pueden estar flanqueados por aminoácidos de conexina distinta de alfa o conexina distinta de péptido ACT. Se proporcionan ejemplos de los aminoácidos de conexina no alfa y conexina no ACT de flaqueo en el presente documento. Un ejemplo de aminoácidos de conexina no ACT son los 20 a 120 aminoácidos carboxilo terminales de Cx43 humana (SEQ ID NO: 72). Otro ejemplo serían los 20 a 120 aminoácidos carboxilo terminales de Cx43 de pollo (SEQ ID NO: 73). Otro ejemplo serían los 20 a 120 aminoácidos carboxilo terminales de Cx45 humana (SEQ ID NO: 74). Otro ejemplo serían los 20 a 120 aminoácidos carboxilo terminales de Cx45 de pollo (SEQ ID NO: 75). Otro ejemplo sería los 20 a 120 aminoácidos carboxilo terminales de Cx37 humana (SEQ ID NO: 76). Otro ejemplo serían los 20 a 120 aminoácidos carboxilo terminales de Cx33 de rata (SEQ ID NO: 77).

Un ejemplo de una conexina no alfa es la secuencia de 239 aminoácidos de proteína fluorescente verde potenciada (ACT1 se muestra fusionada funcionalmente a GFP en la figura 4; SEQ ID NO: 78). En otro aspecto, dado que ACT1 se muestra que es funcional cuando se fusiona al extremo carboxilo terminal de la secuencia de 239 aminoácidos de GFP (por ejemplo, figura 4), se espera que los péptidos ACT conserven la función cuando están flanqueados por polipéptidos distintos de conexina de hasta al menos 239 aminoácidos. De hecho, siempre que la secuencia de ACT se mantenga como el extremo carboxilo terminal libre de un polipéptido dado, y el péptido ACT pueda acceder a sus dianas. Por tanto, los polipéptidos que exceden de 239 aminoácidos además del péptido ACT pueden funcionar para reducir la inflamación, promover la cicatrización, aumentar la resistencia a la tracción, reducir la formación de cicatrices y promover la regeneración tisular tras la lesión.

Las conexinas son las proteínas de subunidad del canal de unión comunicante que son responsables de la comunicación intercelular (Goodenough y Paul, 2003). Basándose en los patrones de conservación de la secuencia de nucleótidos, los genes que codifican para proteínas conexina se dividen en dos familias denominadas genes de conexina alfa y beta. Las secuencias de aminoácidos más carboxilo terminales de conexinas alfa se caracterizan por características distintivas y conservadas múltiples (véase la tabla 2). Esta conservación de la organización concuerda con la capacidad de los péptidos ACT de formar estructuras tridimensionales distintivas, interactuar con múltiples proteínas asociadas, mediar en interacciones con lípidos y membranas, interactuar con ácidos nucleicos incluyendo ADN, canales de membrana de tránsito y/o bloqueo y proporcionar motivos de consenso para escisión proteolítica, reticulación de proteínas, ribosilación de ADP, glicosilación y fosforilación. Por tanto, el polipéptido

divulgado interacciona con un dominio de una proteína que normalmente media en la unión de dicha proteína al extremo carboxilo terminal de una conexina alfa. Por ejemplo, la proteína sobreexpresada de nefroblastoma (NOV) interacciona con un dominio c-terminal de Cx43 (Fu *et al.*, J Biol Chem. 2004 279(35):36943-50). Se considera que éstas y otras proteínas interaccionan con el extremo carboxilo terminal de conexinas alfa e interaccionan adicionalmente con otras proteínas formando un complejo macromolecular. Por tanto, el polipéptido divulgado puede inhibir el funcionamiento de una máquina molecular, tal como, por ejemplo, la implicada en la regulación de la agregación de los canales de unión comunicante de Cx43.

Tal como se usa en el presente documento, “inhibir,” “que inhibe” e “inhibición” significan disminuir una actividad, respuesta, estado, enfermedad u otro parámetro biológico. Esto puede incluir, pero no se limita a, la pérdida completa de actividad, respuesta, estado o enfermedad. Esto también puede incluir, por ejemplo, una reducción del 10% en la actividad, respuesta, estado o enfermedad en comparación con el nivel nativo o de control. Por tanto, la reducción puede ser un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%, o cualquier cantidad de reducción intermedia en comparación con niveles nativos o de control.

La secuencia de ACT del polipéptido divulgado puede ser de cualquier conexina alfa. Por tanto, el componente de conexina alfa del polipéptido divulgado puede ser de una conexina alfa humana, murina, bovina, de monotrema, marsupial, de primate, de roedor, cetácea, de mamífero, aviar, de reptil, de anfibio, piscícola, de cordado, protocordado u otra.

Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender un ACT de una conexina seleccionada del grupo que consiste en conexina 47 de ratón, conexina 47 humana, conexina 46.6 humana, conexina 46.6 de vaca, conexina 30.2 de ratón, conexina 30.2 de rata, conexina 31.9 humana, conexina 31.9 de perro, conexina 44 de oveja, conexina 44 de vaca, conexina 33 de rata, conexina 33 de ratón, conexina 36 humana, conexina 36 de ratón, conexina 36 de rata, conexina 36 de perro, conexina 36 de pollo, conexina 36 de pez cebra, conexina 35 morona, conexina 35 morona, conexina 35 de *Cynops*, conexina 36 de *Tetraodon*, conexina 37 humana, conexina 37 de chimpancé, conexina 37 de perro, conexina 37 de *Cricetulus*, conexina 37 de ratón, conexina 37 de *Mesocricetus*, conexina 37 de rata, conexina 39 de ratón, conexina 39 de rata, conexina 40.1 humana, conexina 38 de *Xenopus*, conexina 39.9 de pez cebra, conexina 40 humana, conexina 40 de chimpancé, conexina 40 de perro, conexina 40 de vaca, conexina 40 de ratón, conexina 40 de rata, conexina 40 de *Cricetulus*, conexina 40 de pollo, conexina 43 humana, conexina 43 de *Cercopithecus*, conexina 43 de *Oryctolagus*, conexina 43 de *Spermophilus*, conexina 43 de *Cricetulus*, conexina 43 de *Phodopus*, conexina 43 de rata, conexina 43 de *Sus*, conexina 43 de *Mesocricetus*, conexina 43 de ratón, conexina 43 de *Cavia*, conexina 43 de vaca, conexina 43 de *Erinaceus*, conexina 43 de pollo, conexina 43 de *Xenopus*, conexina 43 de *Oryctolagus*, conexina 43 de *Cyprinus*, conexina 43 de pez cebra, conexina 43 de *Danio aequipinnatus*, conexina 43.4 de pez cebra, conexina 44.2 de pez cebra, conexina 44.1 de pez cebra, conexina 45 humana, conexina 45 de chimpancé, conexina 45 de perro, conexina 45 de ratón, conexina 45 de vaca, conexina 45 de rata, conexina 45 de pollo, conexina 45 de *Tetraodon*, conexina 45 de pollo, conexina 46 humana, conexina 46 de chimpancé, conexina 46 de ratón, conexina 46 de perro, conexina 46 de rata, conexina 46 de *Mesocricetus*, conexina 46 de *Cricetulus*, conexina 56 de pollo, conexina 39.9 de pez cebra, conexina 49 de vaca, conexina 50 humana, conexina 50 de chimpancé, conexina 50 de rata, conexina 50 de ratón, conexina 50 de perro, conexina 49 de oveja, conexina 50 de *Mesocricetus*, conexina 50 de *Cricetulus*, conexina 50 de pollo, conexina 59 humana, u otra conexina alfa. Las secuencias de aminoácidos para las conexinas alfa se conocen en la técnica e incluyen las identificadas en la tabla 1 mediante el número de registro.

Tabla 1: Conexinas alfa

Proteína	N.º de registro	Proteína	N.º de registro
Conexina 47 de ratón	NP_536702	Conexina 43 de <i>Phodopus</i>	AAR33085
Conexina 47 humana	AAH89439	Conexina 43 de rata	AAH81842
Conexina 46.6 humana	AAB94511	Conexina 43 de <i>Sus</i>	AAR33087
Conexina 46.6 de vaca	XP_582393	Conexina 43 de <i>Mesocricetus</i>	AAO61857
Conexina 30.2 de ratón	NP_848711	Conexina 43 de ratón	AAH55375
Conexina 30.2 de rata	XP_343966	Conexina 43 de <i>Cavia</i>	AAU06305
Conexina 31.9 humana	AAM18801	Conexina 43 de vaca	NP_776493
Conexina 31.9 de perro	XP_548134	Conexina 43 <i>Erinaceus</i>	AAR33083
Conexina 44 de oveja	AAD56220	Conexina 43 de pollo	AAA53027
Conexina 44 de vaca	I46053	Conexina 43 de <i>Xenopus</i>	NP_988856
Conexina 33 de rata	P28233	Conexina 43 de <i>Oryctolagus</i>	AAS89649
Conexina 33 de ratón	AAR28037	Conexina 43 de <i>Cyprinus</i>	AAG17938
Conexina 36 humana	Q9UKL4	Conexina 43 de pez cebra	CAH69066
Conexina 36 de ratón	NP_034420	Conexina 43 de <i>Danio aequipinnatus</i>	AAC19098
Conexina 36 de rata	NP_062154	Conexina 43.4 de pez cebra	NP_571144
Conexina 36 de perro	XP_544602	Conexina 44.2 de pez cebra	AAH45279
Conexina 36 de pollo	NP_989913	Conexina 44.1 de pez cebra	NP_5718,84
Conexina 36 de pez cebra	NP_919401	Conexina 45 humana	I38430

Conexina 35 morona	AAC31884	Conexina 45 de chimpancé	XP_511557
Conexina 35 morona	AAC31885	Conexina 45 de perro	XP_548059
Conexina 35 de <i>Cynops</i>	BAC22077	Conexina 45 de ratón	AAH71230
Conexina 36 de <i>Tetraodon</i>	CAG06428	Conexina 45 de vaca	XP_588395
Conexina 37 humana	I55593	Conexina 45 de rata	AAN17802
Conexina 37 de chimpancé	XP_524658	Conexina 45 de pollo	NP_990834
Conexina 37 de perro	XP_539602	Conexina 45 de <i>Tetraodon</i>	CAF93782
Conexina 37 de <i>Cricetulus</i>	AAR98615	Conexina 45.6 de pollo	I50219
Conexina 37 de ratón	AAH56613	Conexina 46 humana	NP_068773
Conexina 37 de <i>Mesocricetus</i>	AAS83433	Conexina 46 de chimpancé	XP_522616
Conexina 37 de rata	AAH86576	Conexina 46 de ratón	NP_058671
Conexina 39 de ratón	NP_694726	Conexina 46 de perro	XP_543178
Conexina 39 de rata	AAN17801	Conexina 46 de rata	NP_077352
Conexina 40.1 humana	NP_699199	Conexina 46 de <i>Mesocricetus</i>	AAS83437
Conexina 38 de <i>Xenopus</i>	AAH73347	Conexina 46 de <i>Cricetulus</i>	AAS77618
Conexina 39.9 de pez cebra	NP_997991	Conexina 56 de pollo	A45338
Conexina 40 humana	NP_859054	Conexina 39.9 de pez cebra	NP_997991
Conexina 40 de chimpancé	XP_513754	Conexina 49 de vaca	XP_602360
Conexina 40 de perro	XP_540273	Conexina 50 humana	P48165
Conexina 40 de vaca	XP_5587676	Conexina 50 chimpancé	XP_524857
Conexina 40 de ratón	AAH53054	Conexina 50 de rata	NP_703195
Conexina 40 de rata	AAH70935	Conexina 50 de ratón	AAG59880
Conexina 40 de <i>Cricetulus</i>	AAP37454	Conexina 50 de perro	XP_540274
Conexina 40 de pollo	NP_990835	Conexina 49 de oveja	AAF01367
Conexina 43 humana	P17302	Conexina 50 de <i>Mesocricetus</i>	AAS83438
Conexina 43 de <i>Cercopithecus</i>	AAR33082	Conexina 50 de <i>Cricetulus</i>	AAR98618
Conexina 43 de <i>Oryctolagus</i>	AAR33084	Conexina 50 de pollo	BAA05381
Conexina 43 de <i>Spermophilus</i>	AAR33086	Conexina 59 humana	AAG09406
Conexina 43 de <i>Cricetulus</i>	AAO61858		

Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 90 o ID NO: 91 o variantes conservativas o fragmentos de las mismas.

La secuencia de 20-30 aminoácidos más carboxilo terminal de conexinas alfa se caracteriza por una organización distintiva y conservada. Esta organización distintiva y conservada incluiría un motivo de unión de PDZ de tipo II (Φ -x- Φ ; en la que x = cualquier aminoácido y Φ = un aminoácido hidrófobo; por ejemplo, tabla 2, **en negrita**) y proximal a este motivo, residuos de bisagra de prolina (P) y/o glicina (G); una alta frecuencia de residuos de fosfo-serina (S) y/o fosfo-treonina (T); y una alta frecuencia de aminoácidos arginina (R), lisina (K) cargadas positivamente y de ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) cargados negativamente. Para muchas conexinas alfa, los residuos de P y G se aparecen en motivos agrupados (por ejemplo, tabla 2, *en cursiva*) proximales al motivo de unión de PDZ de tipo II carboxilo terminal. Los fosfoaminoácidos de S y T de la mayoría de las conexinas alfa normalmente también se organizan en motivos agrupados, de tipo repetición (por ejemplo, tabla 2, subrayado). Esta organización es particularmente el caso de Cx43, en la que el 90% de los 20 aminoácidos más carboxilo terminales están compuestos por los últimos siete aminoácidos. En un ejemplo adicional de la alta conservación de la secuencia, la organización del péptido ACT de Cx43 está altamente conservada desde humanos hasta peces (por ejemplo, compárense las secuencias de ACT de Cx43 para humanos y pez cebra en la tabla 2). En otro ejemplo, la organización del péptido ACT de Cx45 está altamente conservada desde humanos hasta aves (por ejemplo, compárense las secuencias de ACT de Cx45 para humanos y pollo en la tabla 2). En otro ejemplo, la organización del péptido ACT de Cx36 está altamente conservada desde primates hasta peces (por ejemplo, compárense las secuencias de Cx36 de ACT para chimpancé y pez cebra en la tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de conexina alfa carboxilo terminal (ACT)

Gen	Secuencia	SEQ ID NO
Cx43 alfa humana	P SSRA SSRA SSR PRP D DLEI	(SEQ ID NO: 1)
Cx43 alfa de pollo	P S RA SSRA SSR PRP D DLEI	(SEQ ID NO: 29)
Cx43 alfa de pollo	P CSRA <u>SSRM SSRA</u> R P D DLDV	(SEQ ID NO: 90)

Cx45 alfa humana	G SNKS TA SSKS GDG KN SVWI	(SEQ ID NO: 30)
Cx45 alfa de pollo	G SNKSS A SSKS GDG KN SVWI	(SEQ ID NO: 31)
Cx46 alfa humana	G RA SKAS RASS GRARP E DLAI	(SEQ ID NO: 32)
Cx46.6 alfa humana	G SASS RD G K TVWI	(SEQ ID NO: 33)
Cx36 alfa chimpancé	P RVSF PNFG R TQ SSD SAYV	(SEQ ID NO: 34)
Cx36 alfa de pollo	P RMSM PNFG R TQ SSD S AYV	(SEQ ID NO: 35)
Cx36 alfa de pez cebra	P RMSM PNFG R TQ SSD S AYV	(SEQ ID NO: 91)
Cx47 alfa humana	P RAGSEK G SASS R DG KT TVWI	(SEQ ID NO: 36)
Cx40 alfa humana	G HRL PHG YHSDKRRL SKASS	(SEQ ID NO: 37)
Cx50 alfa humana	KARSD DLSV P ELTTDDAR P LSRL SKASS	(SEQ ID NO: 38)
Cx59 alfa humana	RARSD DLTV P NHVV SLTN NLI GRRVP T DLQI	(SEQ ID NO: 39)
Cx33 alfa de rata	P S CV SSS A VLTTC SS DQVV	(SEQ ID NO: 40)
Cx44 alfa de oveja	PVG L SS FYM G R SSKA SKSS GG RARAA DLAI	(SEQ ID NO: 41)
Cx26 beta humana	LC ILLIR YCSGK SKKPV	(SEQ ID NO: 42)

Por tanto, en un aspecto, el polipéptido divulgado comprende uno, dos, tres o todos los motivos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 1) un motivo de unión de PDZ de tipo II, 2) residuos de bisagra de prolina (P) y/o glicina (G); 3) residuos de agrupaciones de fosfoserina (S) y/o fosfotreonina (T); y 4) una alta frecuencia de aminoácidos arginina (R) y lisina (K) cargadas positivamente y ácido aspártico (D) y/o ácido glutámico (E) cargados negativamente). En otro aspecto, el polipéptido divulgado comprende un motivo de unión de PDZ de tipo II al extremo carboxilo terminal, residuos de bisagra de prolina (P) y/o glicina (G) proximales al motivo de unión de PDZ, y residuos cargados positivamente (K, R, D, E) proximales a los residuos de bisagra.

Los dominios de PDZ se identificaron originalmente como elementos de secuencia conservados dentro de la proteína de densidad postsináptica PSD95/SAP90, el supresor tumoral dlg-A de *Drosophila* y la proteína ZO-1 de unión estrecha. Aunque se denominaron originalmente motivos GLGF o DHR, ahora se conocen mediante un acrónimo que representa estas tres primeras proteínas que contienen PDZ (PSD95/DLG/ZO-1). Estas secuencias de 80-90 aminoácidos se han identificado ahora en más de 75 proteínas y se expresan característicamente en múltiples copias dentro de una única proteína. Por tanto, en un aspecto, el polipéptido divulgado puede inhibir la unión de una conexina alfa a una proteína que comprende un dominio de PDZ. El dominio de PDZ es un tipo específico de módulo de interacción con proteína que tiene un 'bolsillo' de interacción bien definido estructuralmente que puede llenarse mediante un motivo de unión de PDZ, denominado en el presente documento "motivo de PDZ". Los motivos de PDZ son secuencias de consenso que normalmente se localizan, pero no siempre, en el extremo carboxilo terminal intracelular extremo. Se han clasificado cuatro tipos de motivos de PDZ: tipo I (S/T-x-Φ), tipo II (Φ-x-Φ), tipo III (Ψ-x-Φ) y tipo IV (D-x-V), donde x es cualquier aminoácido, Φ es un residuo hidrófobo (V, I, L, A, G, W, C, M, F) y Ψ es un residuo básico, hidrófilo (H, R, K). (Songyang, Z., et al. 1997. Science 275, 73-77). Por tanto, en un aspecto, el polipéptido divulgado comprende un motivo de unión de PDZ de tipo II.

Se observa que la secuencia de 18 aminoácidos más carboxilo terminal de Cx37 alfa representa una variación excepcional en el tema de péptido ACT. La secuencia de tipo ACT de Cx37 es GQKPPSRPSSSASKKQ*YV (SEQ ID NO: 43). Por tanto, los 4 aminoácidos carboxilo terminales de Cx37 conforman sólo en parte un dominio de unión de PDZ de tipo II. En lugar de un dominio de unión de PDZ de tipo II clásico, Cx37 tiene una Q* neutra en la posición 2 donde se esperaría un aminoácido hidrófobo. Como tal, Cx37 comprende lo que podría denominarse una secuencia de tipo dominio de unión de PDZ de tipo II. No obstante, Cx37 mantiene estrictamente todos los otros aspectos de organización de péptido ACT incluyendo residuos de serina agrupados, residuos de R y K frecuentes y una secuencia rica en P proximal a la secuencia de tipo dominio de unión de PDZ. Dado este nivel global de conservación de la organización de tipo ACT en común con las otras >70 conexinas alfa enumeradas anteriormente, se entiende que el extremo carboxilo terminal de tipo ACT de Cx37 funciona en la capacidad proporcionada.

Por comparación, en la tabla 2 se muestra la conexina beta Cx26. Cx26 no tiene motivo de unión de PDZ de tipo II carboxilo terminal; menos del 30% de los aminoácidos más carboxilo terminales comprenden residuos de S, T, R, D o E; no existen pruebas de motivos proximales a un motivo de unión de PDZ de tipo II o motivo de tipo unión de PDZ que contengan agrupaciones de residuos de bisagra de P y G; y no hay pruebas de motivos agrupados, de tipo repetición de fosfoaminoácidos de serina y treonina. Cx26 tiene tres residuos de lisina (K), agrupados uno tras otro cerca del extremo carboxilo terminal de la secuencia. Sin embargo, no se encontraron conexina alfa estudiadas en las >70 conexinas alfa enumeradas anteriormente que presentaran esta característica de tres dominios de residuos de K repetidos en el extremo carboxilo terminal (Cx26 es una conexina beta, por tanto por definición no tiene un dominio ACT).

Tal como se divulga en el presente documento, las características funcionales únicas de este tramo relativamente corto de aminoácidos abarca papeles inesperados en la reducción de la inflamación, la promoción de la cicatrización, la reducción de la formación de cicatrices, el aumento de la resistencia a la tracción y la promoción de la regeneración de la función y la estructura de tejido complejo tras lesión en tejidos tan diversos como piel y el

cerebro. Por tanto, en un aspecto, el polipéptido divulgado comprende un motivo de unión de PDZ de tipo II (Φ -x- Φ ; en el que x = cualquier aminoácido y Φ = un aminoácido hidrófobo). En otro aspecto, en más del 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% de los aminoácidos del polipéptido ACT divulgado está comprendido uno o más de los residuos de aminoácido prolina (P), glicina (G), fosfoserina (S), fosfotreonina (T), arginina (R), lisina (K), ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E).

Los aminoácidos prolina (P), glicina (G), arginina (R), lisina (K), ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) son determinantes necesarios de la estructura y función proteica. Los residuos de prolina y glicina proporcionan giros estrechos en la estructura tridimensional de las proteínas, permitiendo la generación de conformaciones plegadas del polipéptido requerido para su función. Las secuencias de aminoácidos cargados se localizan a menudo en la superficie de las proteínas plegadas y son necesarias para interacciones químicas mediadas por el polipéptido incluyendo interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-lípido, interacciones enzima-sustrato e interacciones proteína-ácido nucleico. Por tanto, en otro aspecto las regiones ricas en prolina (P) y glicina (G) lisina (K), ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) proximales al motivo de unión de PDZ de tipo II proporcionan propiedades necesarias para las acciones proporcionadas de péptidos ACT. En otro aspecto, el polipéptido divulgado comprende regiones ricas en prolina (P) y glicina (G) lisina (K), ácido aspártico (D) y/o ácido glutámico (E) proximales al motivo de unión de PDZ de tipo II.

La fosforilación es la modificación postraduccional más común de proteínas y es crucial para modular o modificar la estructura y función proteica. Los aspectos de estructura y función proteica modificados por fosforilación incluyen conformación de proteínas, interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-lípido, interacciones proteína-ácido nucleico, activación de canales, tráfico de proteínas y recambio de proteínas. Por tanto, en un aspecto son necesarias las secuencias ricas en fosfoserina (S) y/o fosfotreonina (T) para modificar la función de los péptidos ACT, aumentando o disminuyendo la eficacia de los polipéptidos en sus acciones proporcionadas. En otro aspecto, el polipéptido divulgado comprende secuencias o motivos ricos en serina (S) y/o fosfotreonina (T).

En otro ejemplo, respetando la definición de un péptido ACT, es altamente prometedor, en vista del alto grado de potencial de regeneración de tejido/órgano en animales inferiores tales como peces, que una metionina aparezca cerca del extremo amino terminal de la secuencia de ACT de Cx43 de pez cebra (tabla 2). Además de codificar para metionina, el triplete de pares de bases de metionina es un sitio de inicio de la traducción alternativo. Si se inició la traducción a partir de esta metionina, se produciría la secuencia SSRARPDDLVDV (SEQ ID NO: 90). Este producto de traducción mantiene todas las características conservadas y distintivas de un péptido ACT canónico. Específicamente este péptido comprende un dominio de unión de PDZ de tipo II carboxilo terminal y tiene un dominio enriquecido en residuos de P, R y D proximales al dominio de unión de PDZ. Además, la secuencia comprende un motivo de S agrupado, con potencial para modular la función del péptido ACT en su amino terminal. Esto aumenta la interesante posibilidad de que los animales con alto potencial de regeneración de tejido/órgano tales como los peces puedan traducir secuencias de péptidos ACT directamente.

Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender la secuencia c-terminal de Cx43 humana. Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. El polipéptido puede comprender 9 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de Cx40 humana. Por tanto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

El polipéptido según la invención consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y opcionalmente una secuencia o transportador de internalización celular.

Cuando en el presente documento se hace referencia a proteínas específicas, se contemplan variantes, derivados y fragmentos. Los derivados y variantes de proteínas los conocen bien los expertos en la técnica y pueden implicar modificaciones en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos normalmente se encuentran en una o más de tres clases: variantes de sustitución, de inserción o de delección. Las inserciones incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales así como inserciones de intrasecuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Habitualmente las inserciones serán inserciones más pequeñas que las fusiones amino o carboxilo terminales, por ejemplo, en el orden de uno a cuatro residuos. Las delecciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia proteica. Habitualmente estas variantes se preparan mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica para la proteína, produciendo de ese modo ADN que codifica para la variante, y expresando después el ADN en cultivos de células recombinantes. Se conocen bien técnicas para realizar las mutaciones de sustitución en los sitios predeterminados en el ADN que tiene una secuencia conocida e incluyen, por ejemplo, mutagénesis de cebador M13 y mutagénesis por PCR. Las sustituciones de aminoácidos normalmente son de residuos individuales, pero pueden producirse en varias ubicaciones diferentes a la vez; las inserciones habitualmente serán del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos de aminoácido. Las delecciones o inserciones preferiblemente se realizan en pares adyacentes, es decir, una delección de 2 residuos o una inserción de 2 residuos. Las sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas pueden combinarse para llegar a un constructo final. Las mutaciones no deben colocar la secuencia fuera del marco de lectura y preferiblemente no crearán regiones complementarias que pudieran producir estructura de ARNm secundaria a menos que se desee un cambio de este tipo en la estructura secundaria del ARNm. Las variantes de sustitución son aquellas en las que al menos un residuo

se ha eliminado y un residuo diferente se ha insertado en su lugar. Tales sustituciones se realizan generalmente según la tabla 3 siguiente y se denominan sustituciones conservativas.

Tabla 3: Sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Pro	Gly
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Por ejemplo, los expertos en la técnica conocen el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro que es similar biológica y/o químicamente a una sustitución conservativa. Por ejemplo, una sustitución conservativa sería reemplazar un residuo hidrófobo por otro o un residuo polar por otro. Las sustituciones incluyen las combinaciones mostradas en la tabla 3. Las variaciones sustituidas conservativamente de cada secuencia divulgada explícitamente se incluyen dentro de los polipéptidos divulgados en el presente documento.

Normalmente, las sustituciones conservativas tienen de poco a ningún impacto sobre la actividad biológica de un polipéptido resultante. En un ejemplo particular, una sustitución conservativa es una sustitución de aminoácidos en un péptido que no afecta sustancialmente a la función biológica del péptido. Un péptido puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo 2-10 sustituciones conservativas, 2-5 sustituciones conservativas, 4-9 sustituciones conservativas, tales como 2, 5 ó 10 sustituciones conservativas.

Puede producirse un polipéptido que contiene una o más sustituciones conservativas manipulando la secuencia de nucleótidos que codifica tal polipéptido usando, por ejemplo, procedimientos convencionales tales como mutagénesis dirigida al sitio o PCR. Alternativamente, puede producirse un polipéptido que contiene una o más sustituciones conservativas usando métodos de síntesis de péptidos convencionales. Puede usarse un barrido de alanina para identificar qué residuos de aminoácidos pueden tolerar en una proteína una sustitución de aminoácido. En un ejemplo, la actividad biológica de la proteína no disminuye más del 25%, por ejemplo no más del 20%, por ejemplo no más del 10%, cuando se sustituye uno o más aminoácidos nativos por una alanina u otro aminoácido conservativo (tal como los enumerados a continuación).

Puede encontrarse información adicional sobre sustituciones conservativas en, entre otras ubicaciones, Ben-Bassat *et al.*, (J. Bacteriol. 169:751-7, 1987), O'Regan *et al.*, (Gene 77:237-51, 1989), Sahin-Toth *et al.*, (Protein Sci. 3:240-7, 1994), Hochuli *et al.*, (Bio/Technology 6:1321-5, 1988) y en libros de texto convencionales de genética y biología molecular.

Puede emplearse mutagénesis de sustitución o delección para insertar sitios para N-glicosilación (Asn-X-Thr/Ser) u O-glicosilación (Ser o Thr). También pueden ser deseables delecciones de cisteína u otros residuos lábiles. Las delecciones o sustituciones de sitios de proteólisis potencial, por ejemplo Arg, se consigue por ejemplo deleccionando uno de los residuos básicos o sustituyendo uno por residuos de glutamilo o histidilo.

Determinadas derivatizaciones postraduccionales son el resultado de la acción de células huésped recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos de glutaminilo y asparaginilo se desamidán a menudo postraduccionalmente para dar los correspondientes residuos de glutamilo y asparilo. Alternativamente, estos residuos se desamidán en condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos o-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco páginas 79-86 [1983]), acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, amidación del carboxilo C-terminal.

Se entiende que hay numerosos análogos de aminoácidos y péptidos que pueden incorporarse a las composiciones divulgadas. Por ejemplo, hay numerosos aminoácidos D o aminoácidos que tienen un sustituyente funcional diferente que los aminoácidos mostrados en la tabla 3. Se divulgan los estereoisómeros opuestos de los péptidos que se producen de manera natural, así como los estereoisómeros de análogos de péptidos. Estos aminoácidos pueden incorporarse fácilmente en cadenas de polipéptidos cargando moléculas de ARNt con el aminoácido de elección y modificando por ingeniería genética constructos que utilizan, por ejemplo, codones ámbar, para insertar el aminoácido análogo en una cadena de péptido de una manera específica de sitio (Thorson *et al.*, *Methods in Molec. Biol.* 77:43-73 (1991), Zoller, *Current Opinion in Biotechnology*, 3:348-354 (1992); Ibba, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 13:197-216 (1995), Cahill *et al.*, *TIBS*, 14(10):400-403 (1989); Benner, *TIB Tech*, 12:158-163 (1994); Ibba y Hennecke, *Bio/technology*, 12:678-682 (1994).

Pueden producirse moléculas que se asemejan a polipéptidos, pero que no se conectan por medio de una unión peptídica natural. Por ejemplo, las uniones para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir $\text{CH}_2\text{NH--}$, $\text{--CH}_2\text{S--}$, $\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--}$, --CH=CH-- (cis y trans), $\text{--COCH}_2\text{--}$, $\text{--CH(OH)CH}_2\text{--}$ y $\text{--CHH}_2\text{SO--}$ (estas y otras pueden encontrarse en Spatola, A. F. en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Spatola, A. F., *Vega Data* (marzo de 1983), vol. 1, emisión 3, *Peptide Backbone Modifications* (revisión general); Morley, *Trends Pharm Sci* (1980) páginas 463-468; Hudson, D. *et al.*, *Int J Pept Prot Res* 14:177-185 (1979) ($\text{--CH}_2\text{NH--}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{--}$); Spatola *et al.* *Life Sci* 38:1243-1249 (1986) ($\text{--CH H}_2\text{S--}$); Hann J. *Chem. Soc Perkin Trans. I* 307-314 (1982) (--CH--CH-- , cis y trans); Almquist *et al.* *J. Med. Chem.* 23:1392-1398 (1980) ($\text{--COCH}_2\text{--}$); Jennings-White *et al.* *Tetrahedron Lett* 23:2533 (1982) ($\text{--COCH}_2\text{--}$); Szelke *et al.* solicitud de patente europea, EP 45665 CA (1982): 97:39405 (1982) ($\text{--CH(OH)CH}_2\text{--}$); Holladay *et al.* *Tetrahedron. Lett* 24:4401-4404 (1983) ($\text{--C(OH)CH}_2\text{--}$); y Hruby *Life Sci* 31:189-199 (1982) ($\text{--CH}_2\text{--S--}$). Se entiende que los análogos de péptidos pueden tener más de un átomo entre los átomos unidos, tales como b-alanina, ácido g-aminobutírico y similares.

A menudo los análogos de aminoácidos y análogos de péptidos tienen propiedades potenciadas o deseables, tales como, producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas potenciadas (semivida, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, mayor capacidad de cruzar barreras biológicas (por ejemplo, intestino, vasos sanguíneos, barrera hematoencefálica) y otras.

Pueden usarse aminoácidos D para generar péptidos más estables, debido a que los aminoácidos D no son reconocidos por peptidasas y demás. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un aminoácido D del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse para generar péptidos más estables. Pueden usarse residuos de cisteína para ciclar o unir dos o más péptidos entre sí. Esto puede ser beneficioso para constreñir los péptidos en conformaciones particulares. (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992).

Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender una variante conservativa del extremo c-terminal de una conexina alfa (ACT). Tal como se muestra en la tabla 4, se proporciona un ejemplo de una única sustitución conservativa dentro de la secuencia SEQ ID NO: 2 en la secuencia SEQ ID NO: 3. Se proporciona un ejemplo de tres sustituciones conservativas dentro de la secuencia SEQ ID NO: 2 en la secuencia SEQ ID NO: 4. Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 de aminoácidos.

Tabla 4. Variantes de polipéptido ACT

Secuencia	SEQ ID NO
RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 2
RPRPDDLEV	SEQ ID NO: 3
RPRPDDVPV	SEQ ID NO: 4
SSRASSRASSRPRPDDLEV	SEQ ID NO: 44
RPKPDDLEI	SEQ ID NO: 45
SSRASSRASSRPKPDDLEI	SEQ ID NO: 46
RPKPDDLDI	SEQ ID NO: 47
SSRASSRASSRPRPDDLDI	SEQ ID NO: 48
SSRASTRASSRPRPDDLEI	SEQ ID NO: 49
RPRPEDLEI	SEQ ID NO: 50
SSRASSRASSRPRPEDLEI	SEQ ID NO: 51
GDGKNSVWV	SEQ ID NO: 52
SKAGSNKSTASSKSGDGKNSVWV	SEQ ID NO: 53
GQKPPSRPSSSASKKLYV	SEQ ID NO: 54

El polipéptido según la invención consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y opcionalmente una secuencia o transportador de internalización celular.

Se entiende que una manera de definir cualquier variante, modificación o derivado de los genes y proteínas

divulgados en el presente documento es a través de la definición de las variantes, la modificación y los derivados en cuanto a la identidad de secuencia (también denominada en el presente documento homología) con secuencias conocidas específicas. Se divulgan específicamente variantes de los ácidos nucleicos y polipéptidos en el presente documento divulgados que tienen al menos el 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia establecida o conocida. Los expertos en la técnica entienden fácilmente cómo determinar la identidad de secuencia de dos proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, la identidad de secuencia puede calcularse tras alinear las dos secuencias de modo que la identidad de secuencia esté en su nivel más alto.

Otra manera de calcular la identidad de secuencia puede realizarse mediante algoritmos publicados. Las alineaciones óptimas de secuencias para su comparación pueden realizarse mediante el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Grupo, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Pueden obtenerse los mismos tipos de identidad de secuencia para ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos divulgados en Zuker, M. Science 244:48-52, 1989, Jaeger *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706-7710, 1989, Jaeger *et al.* Methods Enzymol. 183:281-306, 1989.

Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos el 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento de identidad de secuencia con el extremo c-terminal de una conexina alfa (ACT). Por tanto, en un aspecto, el polipéptido divulgado comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 91. Como un ejemplo, se divulga un polipéptido (SEQ ID NO: 4) que tiene el 66% de identidad de secuencia con el mismo tramo de 9 aminoácidos que se produce en el extremo carboxilo terminal de Cx43 humana (SEQ ID NO: 2).

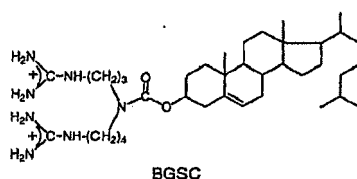
El polipéptido divulgado en el presente documento puede añadirse directamente a una lesión de tejido en un sujeto. Sin embargo, se potencia la eficiencia de localización citoplasmática del polipéptido divulgado mediante un transportador de internalización celular unido químicamente en *cis* o *trans* con el polipéptido. La eficiencia de transportadores de internalización celular se potencia además mediante luz o cotransducción de células con péptido Tat-HA.

Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender una secuencia o transportador de internalización celular. La secuencia de internalización celular puede ser cualquier secuencia de internalización conocida o descubierta recientemente en la técnica, o variantes conservativas de las mismas. Ejemplos no limitativos de secuencias y transportadores de internalización celular incluyen secuencias de Antennapedia, TAT, VIH-Tat, penetratina, Antp-3A (mutante de Antp), buforina II, transportano, MAP (péptido anfipático modelo), K-FGF, Ku70, prión, pVEC, Pep-1, SynBI, Pep-7, HN-1, BGSC (bis-guanidina-espermidina-colesterol y BGTC (bis-guanidina-tren-colesterol) (véase la tabla 5).

Tabla 5: Transportadores de internalización celular

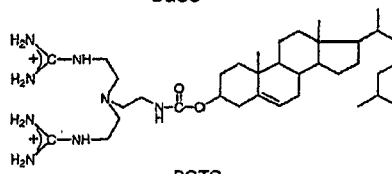
Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
Antp	RQPKIWFPNRRKPWKK	(SEQ ID NO: 7)
VIH-Tat	GRKKRRQRPPQ	(SEQ ID NO: 14)
Penetratina	RQKIWFQNRMMKWK	(SEQ ID NO: 15)
Antp-3a	RQIAIWFQNRMMKWA	(SEQ ID NO: 16)
Tat	RKKRRQRRR	(SEQ ID NO: 17)
Buforina II	TRSSRAGLQFPVGRVHLLRK	(SEQ ID NO: 18)
Transportano	GWTLSAGYLLGKINKAALAALAKKIL	(SEQ ID NO: 19)
Péptido anfipático modelo (MAP)	KLALKLALKALKALKLA	(SEQ ID NO: 20)
K-FGF	AAVALLPAVLLALLAP	(SEQ ID NO: 21)
Ku70	VPMLK-PMLKE	(SEQ ID NO: 22)
Prión	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP	(SEQ ID NO: 23)
pVEC	LLIILRRRIKQAHASK	(SEQ ID NO: 24)
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	(SEQ ID NO: 25)
SynBI	RGGRLSYRRRFSTSTGR	(SEQ ID NO: 26)
Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	(SEQ ID NO: 27)
HN-1	TSPLNIHNGQKL	(SEQ ID NO: 28)

BGSC (bis-guanidina-espermidina-colesterol)



BGSC

BGTC (bis-guanidina-tren-colesterol)



BGTC

Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender además la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 (Bucci, M. *et al.* 2000. Nat. Med. 6, 1362-1367), SEQ ID NO: 15 (Derossi, D., *et al.* 1994. Biol.Chem. 269, 10444-10450), SEQ ID NO: 16 (Fischer, P.M. *et al.* 2000. J. Pept. Res. 55, 163-172), SEQ ID NO: 17 (Frankel, A. D. & Pabo, C. O. 1988. Cell 55,1189-1193; Green, M. & Loewenstein, P. M. 1988. Cell 55, 1179-1188), SEQ ID NO: 18 (Park, C. B., *et al.* 2000. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-8250), SEQ ID NO: 19 (Pooga, M., *et al.* 1998. FASEB J. 12, 67-77), SEQ ID NO: 20 (Oehlke, J. *et al.* 1998. Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-139), SEQ ID NO: 21 (Lin, Y. Z., *et al.* 1995. J. Biol. Chem. 270,14255-14258), SEQ ID NO: 22 (Sawada, M., *et al.* 2003. Nature Cell Biol. 5, 352-357), SEQ ID NO: 23 (Lundberg, P. *et al.* 2002. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90), SEQ ID NO: 24 (Elmqvist, A., *et al.* 2001. Exp. Cell Res. 269, 237-244), SEQ ID NO: 25 (Morris, M. C., *et al.* 2001. Nature Biotechnol. 19, 1173-1176), SEQ ID NO: 26 (Rousselle, C. *et al.* 2000. Mol. Pharmacol. 57,679-686), SEQ ID NO: 27 (Gao, C. *et al.* 2002. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-4065) o SEQ ID NO: 28 (Hong, F. D. & Clayman, G. L. 2000. Cancer Res. 60, 6551-6556). El polipéptido divulgado puede comprender además BGSC (bis-guanidina-espermidina-colesterol) o BGTC (bis-guanidina-tren-colesterol) (Vigneron, J.P. *et al.* 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93, 9682-9686).

Cualquier otra secuencia de internalización conocida ahora o identificada más tarde puede combinarse con un péptido de la invención.

El polipéptido divulgado puede comprender cualquier secuencia de ACT (por ejemplo, cualquiera de los péptidos ACT divulgados en el presente documento) en combinación con cualquiera de las secuencias de internalización celular proporcionadas en el presente documento. En la tabla 6 se proporcionan ejemplos de dichas combinaciones. Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender una secuencia de Antennapedia que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7. Por tanto, el polipéptido divulgado puede comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

Tabla 6: Polipéptidos ACT con secuencias de internalización celular (CIS)

CIS/ACT	Secuencia	SEQ ID NO
Antp/ACT 2	RQPKIWFPNRRKPWKK PSSRASSRASSRPRPDDLEI	SEQ ID NO: 8
Antp/ACT 1	RQPKIWFPNRRKPWKK RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 9
Antp/ACT 3	RQPKIWFPNRRKPWKK RPRPDDLEV	SEQ ID NO: 10
Antp/ACT 4	RQPKIWFPNRRKPWKK RPRPDDVPV	SEQ ID NO: 11
Antp/ACT 5	RQPKIWFPNRRKPWKK KARSDDLVS	SEQ ID NO: 12
VIH-Tat/ACT 1	GRKKRRQRPPQ RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 56
Penetratina/ACT 1	RQIKIWFQNRMMKWKK RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 57
Antp-3A/ACT 1	RQIAIWFQNRMMKWAA RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 58
Tat/ACT 1	RKKRRQRRR RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 59
Buforina II/ACT 1	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 60
Transportano/ACT 1	GWTLSAGILLGKINKALAAALAKKIL RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 61
MAP/ACT 1	KLALKALKALKAAKLK RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 62
K-FGF/ACT 1	AAVALLPAVLLALLAP RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 63
Ku70/ACT 1	VPMLKPMLE RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 64
Prión/ACT 1	MANLGYWLLALFVTMTDVGGLCKKRPKP RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 65
pVEC/ACT 1	LLILRRRIRKQAHASK RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 66
Pep-1/ACT 1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 67
SynB1/ACT 1	RGGRLSYRRRFSTSTGR RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 68
Pep-7/ACT 1	SDLWEMMMVSLACQY RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 69
HN-1/ACT 1	TSPLNIHNGQKL RPRPDDLEI	SEQ ID NO: 70

El polipéptido según la invención consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (péptido ACT1) y

opcionalmente una secuencia o transportador de internalización celular.

También se divulgan ácidos nucleicos aislados que codifican para los polipéptidos divulgados en el presente documento. Los ácidos nucleicos divulgados se componen, por ejemplo, de nucleótidos, análogos de nucleótidos, o sustitutos de nucleótidos. Ejemplos no limitativos de estas y otras moléculas se comentan en el presente documento. Se entiende que, por ejemplo, cuando se expresa un vector en una célula, el ARNm expresado se compondrá normalmente de A, C, G y U.

Por "ácido nucleico aislado" o "ácido nucleico purificado" se entiende ADN que está libre de los genes que, en el genoma que se produce de manera natural del organismo del que se deriva el ADN de la invención, flanquean el gen. El término por tanto incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora a un vector, tal como un plásmido o virus que se replica de manera autónoma; o se incorpora al ADN genómico de un procariota o eucariota (por ejemplo, un transgén); o que existe como molécula separada (por ejemplo, un fragmento de ADNc o genómico o un ADNc producidos mediante PCR, digestión de endonucleasas de restricción, o síntesis *in vitro* o química). También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica para una secuencia de polipéptido adicional. El término "ácido nucleico aislado" también se refiere a ARN, por ejemplo, una molécula de ARNm que se codifica por una molécula de ADN aislada, o que se sintetiza químicamente, o que se separa o está sustancialmente libre de al menos algunos componentes celulares, por ejemplo, otros tipos de moléculas de ARN o moléculas de polipéptido.

Por tanto, se divulga un ácido nucleico aislado que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, o SEQ ID NO:12.

Por tanto, el ácido nucleico divulgado puede comprender la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:88, o SEQ ID NO:89.

El ácido nucleico divulgado en el presente documento puede unirse operativamente a una secuencia de control de expresión. También se divulga un vector que comprende uno o más de los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento, en el que el ácido nucleico se une operativamente a una secuencia de control de expresión. Hay varias composiciones y métodos que pueden usarse para suministrar ácidos nucleicos a células, o bien *in vitro* o bien *in vivo*. Estos métodos y composiciones pueden desglosarse en gran parte en dos clases: sistemas de suministro a base de virus y sistemas de suministro a base de no virus. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden suministrarse a través de varios sistemas de suministro directos tales como, electroporación, lipofección, precipitación de fosfato de calcio, plásmidos, vectores virales, ácidos nucleicos virales, ácidos nucleicos de fago, fagos, cósmidos, o por medio de transferencia de material genético en células o portadores tales como liposomas catiónicos. Los medios apropiados para transfección, incluyendo vectores virales, transfectantes químicos o métodos fisicomecánicos tales como electroporación y difusión directa de ADN, se describen por, por ejemplo, Wolff, J. A., *et al.*, Science, 247, 1465-1468, (1990); y Wolff, J. A. Nature, 352, 815-818, (1991). Tales métodos se conocen bien en la técnica y son fácilmente adaptables para su uso con las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. En determinados casos, se modificarán los métodos para funcionar específicamente con grandes moléculas de ADN. Además, estos métodos pueden usarse para seleccionar como diana determinadas enfermedades y poblaciones celulares usando las características de direccionamiento del portador.

Los vectores de transferencia pueden ser cualquier construcción de nucleótido usada para suministrar genes a células (por ejemplo, un plásmido), o como parte de una estrategia general para suministrar genes, por ejemplo, como parte de adenovirus o retrovirus recombinante (Ram *et al.* Cancer Res. 53:83-88, (1993)).

Tal como se usa en el presente documento, vectores virales o plásmidos son agentes que transportan los ácidos nucleicos divulgados, tales como SEQ ID NO:6, a la célula sin degradación e incluyen un promotor que produce la expresión del gen en las células en las que se suministra. En algunas realizaciones los promotores se derivan de o bien un virus o bien un retrovirus. Vectores virales son, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus vaccinia, virus de la polio, virus del sida, virus trófico neuronal, Sindbis y otros virus de ARN, incluyendo estos virus la estructura principal de VIH. También se divulga cualquier familia viral que comparta las propiedades de estos virus que las hacen adecuadas para su uso como vectores. Los retrovirus incluyen virus de leucemia murina de Maloney, MMLV, y retrovirus que expresan las propiedades deseables de MMLV como vector. Los vectores retrovirales pueden portar una carga útil genética mayor, es decir, un transgén o gen marcador, que otros vectores virales, y por este motivo son vectores comúnmente usados. Sin embargo, no son tan útiles en células que no proliferan. Los vectores adenovirales son relativamente estables y es fácil trabajar con ellos, tienen títulos altos, y pueden suministrarse en formulación de aerosol, y pueden transfectar células que no se dividen. Los vectores virales pox son grandes y tienen varios sitios para insertar genes, son termotables y pueden almacenarse a temperatura ambiente. También se divulga un vector viral que se ha modificado por ingeniería para suprimir la respuesta inmunitaria del organismo huésped, suscitada por los antígenos virales. Los vectores de este tipo pueden portar regiones codificantes para interleucina 8 ó 10.

Los vectores virales pueden tener capacidades de transacción (capacidad de introducir genes) mayores que los métodos químicos o físicos para introducir genes en células. Normalmente, los vectores virales contienen, genes tempranos no estructurales, genes tardíos estructurales, un transcrito de ARN polimerasa III, repeticiones terminales invertidas necesarias para replicación y encapsulación, y promotores para controlar la transcripción y replicación del

genoma viral. Cuando se modifican por ingeniería como vectores, los virus normalmente tienen uno o más de los genes tempranos retirados y se inserta un gen o un casete de gen/promotor en el genoma viral en lugar del ADN viral retirado. Los constructos de este tipo pueden portar hasta aproximadamente 8 kb de material genético foráneo. Las funciones necesarias de los genes tempranos retirados se suministran normalmente mediante líneas celulares que se han modificado por ingeniería para expresar los productos génicos de los genes tempranos en trans.

Un retrovirus es un virus animal que pertenece a la familia de virus de Retroviridae, incluyendo cualquier tipo, subfamilia, género o tropismo. Los vectores retrovirales, en general, se describen por Verma, I.M., *Retroviral vectors for gene transfer*. En *Microbiology-1985*, American Society for Microbiology, págs. 229-232, Washington, (1985).

Ejemplos de métodos para usar vectores retrovirales para terapia génica se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 4.868.116 y 4.980.286; solicitudes PCT de los documentos WO 90/02806 y WO 89/07136; y Mulligan, (*Science* 260:926-932 (1993)).

Un retrovirus es esencialmente un paquete en el que se ha empaquetado carga de ácido nucleico. La carga de ácido nucleico porta consigo una señal de empaquetamiento, que garantiza que las moléculas hija replicadas se empaquetarán de manera eficaz dentro de la cubierta de paquete. Además de la señal de paquete, hay varias moléculas que se necesitan en cis, para la replicación y empaquetamiento del virus replicado. Normalmente un genoma retroviral, contiene los genes gag, pol y env que están implicados en la elaboración de la cubierta de proteína. Son los genes gag, pol, y env los que se reemplazan normalmente por el ADN foráneo que va a transferirse a la célula diana. Los vectores retrovirales contienen normalmente una señal de empaquetamiento para la incorporación en la cubierta de paquete, una secuencia que señala el inicio de la unidad de transcripción de gag, elementos necesarios para transcripción inversa, incluyendo un sitio de unión de cebador para unir el cebador de ARNt de transcripción inversa, secuencias de repeticiones terminales que guían el cambio de las hebras de ARN durante la síntesis de ADN, una secuencia rica en purina de 5' a 3' de LTR que sirve como el sitio de cebado para la síntesis de la segunda hebra de síntesis de ADN, y secuencias específicas cercanas a los extremos de las LTR que facilitan que la inserción del estado de ADN del retrovirus se inserte en el genoma huésped. La retirada de los genes gag, pol, y env permite la inserción de aproximadamente 8 kb de secuencia extraña en el genoma viral, que se transcriba de manera inversa, y que se empaquete tras la replicación en una nueva partícula retroviral. Esta cantidad de ácido nucleico es suficiente para el suministro de uno a muchos genes dependiendo del tamaño de cada transcrito.

Puesto que la maquinaria de replicación y las proteínas de empaquetamiento se han retirado en la mayoría de vectores retrovirales (gag, pol y env), los vectores se generan normalmente colocándolos en una línea celular de empaquetamiento. Una línea celular de empaquetamiento es una línea celular que se ha transfectado o transformado con un retrovirus que contiene la maquinaria de replicación y empaquetamiento, pero carece de cualquier señal de empaquetamiento. Cuando se transfecta el vector que porta el ADN de elección en estas líneas celulares, se replica el vector que contiene el gen de interés y se empaqueta en nuevas partículas retrovirales, mediante la maquinaria proporcionada en cis por la célula auxiliar. Los genomas para la maquinaria no se empaquetan porque carecen de las señales necesarias.

La construcción de adenovirus deficientes en replicación se ha descrito (Berkner *et al.*, *J. Virology* 61:1213-1220 (1987); Massie *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6:2872-2883 (1986); Haj-Ahmad *et al.*, *J. Virology* 57:267-274 (1986); Davidson *et al.*, *J. Virology* 61:1226-1239 (1987); Zhang "Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis" *BioTechniques* 15:868-872 (1993)). El beneficio de usar estos virus como vectores es que están limitados en la medida en que pueden propagarse a otros tipos de células, ya que pueden replicarse dentro de una célula inicial infectada, pero no pueden formar nuevas partículas virales infecciosas. Se ha mostrado que los adenovirus recombinantes logran transferencia de gen de alta eficacia después del suministro *in vivo* directo a epitelio de las vías respiratorias, hepatocitos, endotelio vascular, parénquima CNS y varios otros sitios tisulares (Morsy, *J. Clin. Invest.* 92:1580-1586 (1993); Kirshenbaum, *J. Clin. Invest.* 92:381-387 (1993); Roessler, *J. Clin. Invest.* 92:1085-1092 (1993); Moullier, *Nature Genetics* 4:154-159 (1993); La Salle, *Science* 259:988-990 (1993); Gomez-Foix, *J. Biol. Chem.* 267:25129-25134 (1992); Rich, *Human Gene Therapy* 4:461-476 (1993); Zabner, *Nature Genetics* 6:75-83 (1994); Guzman, *Circulation Research* 73:1201-1207 (1993); Bout, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994); Zabner, *Cell* 75:207-216 (1993); Caillaud, *Eur. J. Neuroscience* 5:1287-1291 (1993); y Ragot, *J. Gen. Virology* 74:501-507 (1993)). Los adenovirus recombinantes logran la transducción del gen uniéndose a receptores de la superficie celular, después de lo cual el virus se interioriza mediante endocitosis mediada por receptor, de la misma manera que de tipo natural o adenovirus deficiente en replicación (Chardonnet y Dales, *Virology* 40:462-477 (1970); Brown y Burlingham, *J. Virology* 12:386-396 (1973); Svensson y Persson, *J. Virology* 55:442-449 (1985); Seth, *et al.*, *J. Virol.* 51:650-655 (1984); Seth, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:1528-1533 (1984); Varga *et al.*, *J. Virology* 65:6061-6070 (1991); Wickham *et al.*, *Cell* 73:309-319 (1993)).

Un vector viral puede ser uno basado en un adenovirus al que se le ha retirado el gen E1, y estos viriones se

generan en una línea celular tal como la línea celular humana 293. En un aspecto, los genes tanto E1 como E3 se retiran del genoma de adenovirus.

Otro tipo de vector viral se basa en un virus adenoasociado (VAA). Este parvovirus defectuoso puede infectar muchos tipos de célula y no es patógeno para humanos. Los vectores de tipo VAA pueden transportar aproximadamente de 4 a 5 kb y se sabe que el VAA de tipo natural se inserta de manera estable en el cromosoma 19. Como ejemplo, este vector puede ser el vector P4.1 C producido por Avigen, San Francisco, CA, que puede contener el gen cinasa timidina del virus de herpes simple, HSV-tk, y/o un gen marcador, tal como el gen que codifica para la proteína fluorescente verde, GFP.

En otro tipo de virus VAA, el VAA contiene un par de repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean al menos un casete que contiene un promotor que dirige la expresión específica de célula unida operativamente a un gen heterólogo. Heterólogo en este contexto se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos o gen que no es nativo con respecto al parvovirus B19 o VAA.

Normalmente las regiones codificantes de VAA y B19 se han delecionado, dando como resultado un vector no citotóxico seguro. Las ITR de VAA, o modificaciones de las mismas, confieren ineffectividad e integración específica para sitio, pero no citotoxicidad, y el promotor dirige la expresión específica para célula. La patente estadounidense nº 6.261.834 incluye material relacionado con el vector VAA.

Los vectores divulgados proporcionan por tanto moléculas de ADN que pueden integrarse en un cromosoma de mamífero sin toxicidad sustancial.

Los genes insertados en viral y retroviral habitualmente contienen promotores, y/o potenciadores para ayudar a controlar la expresión del producto génico deseado. Un promotor es generalmente una secuencia o secuencias de ADN que funcionan cuando están en una ubicación relativamente fija con respecto al sitio de inicio de transcripción. Un promotor contiene elementos de núcleo requeridos para la interacción básica de ARN polimerasa y factores de transcripción, y puede contener elementos en el sentido de 5' y elementos de respuesta.

Los experimentos genéticos moleculares con grandes virus de herpes humano han proporcionado medios por los que pueden clonarse, propagarse y estabilizarse grandes fragmentos de ADN heterólogo en células permisivas para infección con virus de herpes (Sun *et al.*, Nature genetics 8: 33-41, 1994; Cotter y Robertson, Curr Opin Mol Ther 5: 633-644, 1999). Estos grandes virus de ADN (virus de herpes simple (HSV) y virus de Epstein-Barr (EBV), tienen el potencial de suministrar fragmentos de ADN heterólogo humano > 150 kb a células específicas. Los EBV recombinantes pueden mantener grandes piezas de ADN en las células B infectadas como ADN episomal. Clones individuales que portaban insertos genómicos humanos de hasta 330 kb parecían genéticamente estables. El mantenimiento de estos episomas requiere una proteína EBV nuclear específica, EBNA1, expresada constitutivamente durante la infección con EBV. Adicionalmente, estos vectores pueden usarse para transfección, en la que pueden generarse grandes cantidades de proteína transitoriamente *in vitro*. También se están usando sistemas de amplicones de virus del herpes para empaquetar piezas de ADN > 220 kb y para infectar células que puedan mantener de manera estable el ADN como episomas.

Otros sistemas útiles incluyen, por ejemplo, replicación y vectores de virus vaccinia replicantes y no replicantes restringidos al huésped.

Las composiciones divulgadas pueden suministrarse a las células diana en una variedad de modos. Por ejemplo, las composiciones pueden suministrarse a través de electroporación, o a través de lipofección, o a través de precipitación de fosfato de calcio. El mecanismo de suministro elegido dependerá en parte del tipo de célula seleccionada como diana y de si el suministro se produce por ejemplo *in vivo* o *in vitro*.

Por tanto, las composiciones pueden comprender, además de los polipéptidos divulgados, ácidos nucleicos o vectores, por ejemplo, lípidos tales como liposomas, tales como liposomas catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE, DC-colesterol) o liposomas aniónicos. Los liposomas pueden comprender además proteínas para facilitar el direccionamiento a una célula particular, si se desea. La administración de una composición que comprende un compuesto y un liposoma catiónico que puede administrarse a la sangre aferente a un órgano diana o inhalarse en las vías respiratorias hacia células diana de las vías respiratorias. En cuanto a los liposomas, véase, por ejemplo, Brigham *et al.* Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 1:95-100 (1989); Felgner *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:7413-7417 (1987); la patente estadounidense nº 4.897.355. Además, el compuesto puede administrarse como componente de una microcápsula que puede seleccionarse como diana a tipos de célula específicos, tales como macrófagos, o donde se diseña la difusión del compuesto o suministro del compuesto de la microcápsula para una dosificación o tasa específica.

En los métodos descritos anteriormente que incluyen la administración y captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, transfección o transducción génica), el suministro de las composiciones a las células puede ser por medio de una variedad de mecanismos. Como un ejemplo, el suministro puede ser por medio de un liposoma, usando preparaciones de liposomas disponibles comercialmente tales como LIPOFECTIN,

LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados según procedimientos convencionales en la técnica. Además, el ácido nucleico o vector divulgados puede suministrarse *in vivo* mediante electroporación, para lo cual está disponible la tecnología de Genetronics, Inc. (San Diego, CA) así como por medio de una máquina de SONOPORACIÓN (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

Los ácidos nucleicos que se suministran a las células que han de integrarse en el genoma de la célula huésped, contienen normalmente secuencias de integración. Estas secuencias son a menudo secuencias relacionadas con virus, particularmente cuando se usan sistemas a base de virus. Estos sistemas de integración virales pueden incorporarse también a ácidos nucleicos que han de suministrarse usando un sistema de suministro a base de ácido no nucleico, tal como un liposoma, de manera que el ácido nucleico contenido en el sistema de suministro pueda venir integrado en el genoma huésped.

Otras técnicas generales para la integración en el genoma huésped incluyen, por ejemplo, sistemas diseñados para promover la recombinación homóloga con el genoma huésped. Estos sistemas normalmente se basan en el flanqueo de secuencia del ácido nucleico que va a expresarse que tiene suficiente homología con una secuencia diana dentro del genoma de la célula huésped en el que tiene lugar la recombinación entre el vector de ácido nucleico y la diana de ácido nucleico, provocando que el ácido nucleico suministrado se integre en el genoma huésped. Los expertos en la técnica conocen estos sistemas y los métodos necesarios para promover la recombinación homóloga.

Las composiciones pueden suministrarse a las células del sujeto *in vivo* y/o *ex vivo* mediante una variedad de mecanismos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, captación de ADN desnudo, fusión de liposomas, inyección intramuscular de ADN por medio de una pistola génica, endocitosis y similares).

Si se emplean métodos *ex vivo*, pueden retirarse células o tejidos y mantenerse fuera del cuerpo según protocolos convencionales bien conocidos en la técnica. Las composiciones pueden introducirse en las células por medio de cualquier mecanismo de transferencia génica, tal como, por ejemplo, suministro génico mediado por fosfato de calcio, electroporación, microinyección o proteoliposomas. Las células transducidas pueden entonces infundirse (por ejemplo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable) o trasplantarse de nuevo de manera homotópica en el sujeto por métodos convencionales para el tipo de tejido o célula. Se conocen métodos convencionales para el trasplante o infusión de diversas células en un sujeto.

Los ácidos nucleicos que se suministran a las células normalmente contienen sistemas que controlan la expresión. Por ejemplo, los genes insertados en sistemas virales y retrovirales habitualmente contienen promotores, y/o potenciadores para ayudar a controlar la expresión del producto génico deseado. Un promotor es generalmente una secuencia o secuencias de ADN que funcionan cuando están en una ubicación relativamente fija con respecto al sitio de inicio de transcripción. Un promotor contiene elementos de núcleo requeridos para la interacción básica de ARN polimerasa y factores de transcripción, y puede contener elementos en el sentido de 5' y elementos de respuesta.

Los promotores que controlan la transcripción de los vectores en células huésped de mamíferos pueden obtenerse a partir de diversas fuentes, por ejemplo, los genomas de virus tales como: polioma, virus del simio 40 (SV40), adenovirus, retrovirus, virus de hepatitis B, citomegalovirus, o a partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo promotor beta actina. Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen viral de SV40 de replicación (Fiers *et al.*, Nature, 273: 113 (1978)). El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como fragmento de restricción de HindIII E (Greenway, P.J. *et al.*, Gene 18: 355-360 (1982)). Evidentemente, los promotores de la célula huésped o especies relacionadas son también útiles en el presente documento.

El potenciador generalmente se refiere a una secuencia de ADN que funciona a una distancia no fija del sitio de inicio de transcripción y puede estar o bien en 5' (Laimins, L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 993 (1981)) o bien en 3' (Lusky, M.L., *et al.*, Mol. Cell Bio. 3: 1108 (1983)) con respecto a la unidad de transcripción. Además, los potenciadores pueden estar dentro de un intrón (Banerji, J.L. *et al.*, Cell 33: 729 (1983)) así como dentro de la secuencia codificante en sí (Osborne, T.F., *et al.*, Mol. Cell Bio. 4: 1293 (1984)). Están habitualmente entre 10 y 300 bp en longitud, y funcionan en cis. Los potenciadores funcionan para aumentar la transcripción de promotores cercanos. Los potenciadores también contienen a menudo elementos de respuesta que median la regulación de la transcripción. Los promotores pueden contener también elementos de respuesta que median la regulación de la transcripción. Los potenciadores determinan a menudo la regulación de la expresión de un gen. Aunque ahora se conocen muchas secuencias de potenciadores a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina), normalmente se usará un potenciador de un virus de célula eucariota para expresión general. Ejemplos son el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus.

El promotor y/o potenciador puede estar específicamente activado o bien mediante luz o bien mediante eventos

químicos específicos que activa su función. Los sistemas pueden regularse mediante reactivos tales como tetraciclina y dexametasona. También hay modos de potenciar la expresión génica del vector viral mediante exposición a irradiación, tal como irradiación gamma, o fármacos de quimioterapia alquilantes.

5 En determinadas realizaciones la región de promotor y/o potenciador puede actuar como un promotor y/o potenciador constitutivo para maximizar la expresión de la región de la unidad de transcripción que va a transcribirse. En determinados constructos la región de promotor y/o potenciador es activa en todos los tipos de célula eucariota, incluso si sólo se expresa en un tipo particular de célula en un momento particular. Un promotor de este tipo es el promotor CMV (650 bases). Otros promotores de este tipo son los promotores SV40, citomegalovirus
10 (promotor de longitud completa), y vector retroviral LTR.

Se ha mostrado que todos los elementos regulatorios específicos pueden clonarse y usarse para construir vectores de expresión que se expresan de manera selectiva en tipos de célula específicos tales como células de melanoma. Se ha usado el promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para expresar de manera selectiva genes en
15 células de origen glial.

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, hongos, insecto, planta, animal, humano o nucleadas) pueden contener también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción que puede afectar a la expresión de ARNm. Estas regiones se transcriben como segmentos
20 poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica para proteína de factor tisular. Las regiones 3' sin traducir también incluyen sitios de terminación de transcripción. La unidad de transcripción puede contener también una región de poliadenilación. Un beneficio de esta región es que aumenta la probabilidad de que la unidad transcrita se procese y transporte como ARNm. La identificación y el uso de señales de poliadenilación en constructos de expresión está bien establecida. Las señales de poliadenilación homólogas pueden usarse en los
25 constructos transgénicos. En determinadas unidades de transcripción, la región de poliadenilación se deriva de la señal de poliadenilación temprana de SV40 y consiste en aproximadamente 400 bases. Las unidades transcritas pueden contener otras secuencias convencionales solas o en combinación con las secuencias anteriores que mejoran la expresión del, o la estabilidad del, constructo.

30 Los vectores virales pueden incluir secuencia de ácido nucleico que codifica para un producto marcador. Este producto marcador se usa para determinar si el gen se ha suministrado a la célula y una vez suministrado se está expresando. Ejemplo de genes marcadores son el gen de *E. Coli* lacZ, que codifica para β -galactosidasa, y proteína fluorescente verde.

35 En algunas realizaciones el marcador puede ser un marcador seleccionable. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina cinasa, neomicina, análogo de neomicina G418, hidromicina y puromicina. Cuando tales marcadores seleccionables se transfieren con éxito a una célula huésped de mamífero, la célula huésped de mamífero transformada puede sobrevivir si se pone a presión selectiva. Hay dos categorías distintas ampliamente usadas de regímenes selectivos.
40 La primera categoría se basa en el metabolismo de la célula y el uso de una línea celular mutante que carece de la capacidad de crecer independientemente de un medio complementado. Dos ejemplos son: células DHFR de ovario de hámster chino (CHO) y células LTK de ratón. Estas células carecen de la capacidad de crecer sin la adición de nutrientes tales como timidina o hipoxantina. Debido a que estas células carecen de determinados genes necesarios para una ruta de síntesis de nucleótidos completa, no pueden sobrevivir a no ser que se proporcionen los nucleótidos que faltan en medios complementados. Una alternativa a complementar los medios es introducir un gen
45 TK o DHFR intacto en las células que carecen de los genes respectivos, alterando por tanto sus requisitos de crecimiento. Las células individuales que no se transformaron con el gen TK o DHFR no podrán sobrevivir en medios no complementados.

50 La segunda categoría es selección dominante que se refiere a un esquema de selección usado en cualquier tipo de célula y no requiere el uso de una línea celular mutante. Estos esquemas normalmente usan un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que tienen un nuevo gen expresarían una proteína que porta resistencia al fármaco y sobrevivirían a la selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, (Southern P. y Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1:327 (1982)), ácido micofenólico, (Mulligan, RC. y Berg, P. Science 209: 1422 (1980)) o higromicina, (Sugden, B. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5: 410-413 (1985)). Los
55 tres ejemplos emplean genes bacterianos bajo control eucariota para portar resistencia al fármaco apropiado G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico) o higromicina, respectivamente. Otros incluyen el análogo de neomicina G418 y paromicina.

60 También se divulga una célula que comprende uno o más de los vectores divulgados en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, "célula", "línea celular", y "cultivo celular" pueden usarse de manera indistinta y todas las designaciones de este tipo incluyen progenia. La célula divulgada puede ser cualquier célula usada para clonar o propagar los vectores divulgados en el presente documento. Por tanto, la célula puede ser de un cultivo celular primario o línea celular establecida. Puede aplicarse el método a cualquier célula, incluyendo
65 procariota o eucariota, tal como bacteriana, de planta, de animal, y similares. El tipo de célula puede seleccionarse por un experto en la técnica basándose en la elección del vector y uso deseado.

Se divulgan animales no humanos producidos mediante el procedimiento de transfectar una célula dentro del animal con cualquier molécula del ácido nucleico o vectores divulgados en el presente documento. Se divulgan animales no humanos producidos mediante el procedimiento de transfectar una célula dentro del animal con cualquier molécula del ácido nucleico o vectores divulgados en el presente documento, en el que el animal es un mamífero. También se divulgan animales producidos mediante el procedimiento de transfectar una célula dentro del animal con cualquier molécula del ácido nucleico o vectores divulgados en el presente documento, en el que el mamífero es ratón, rata, conejo, vaca, oveja, cerdo o primate.

Se divulga una composición que comprende uno o más de los polipéptidos, ácidos nucleicos, o vectores divulgados en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por tanto, se divulga una composición que comprende una combinación de dos o más de cualquiera de los polipéptidos ACT divulgados en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se divulga una composición que comprende SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:5 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto, junto con el ácido nucleico o vector, sin provocar ningún efecto biológico indeseable ni interaccionar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo se seleccionaría de manera natural para minimizar cualquier degradación del principio activo y minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como sabe bien un experto en la técnica.

La composición divulgada en el presente documento puede comprender además cualquier sustancia conocida o recién descubierta que pueda administrarse a una herida, lesión de tejido, sitio de inflamación o cáncer. Por ejemplo, la composición divulgada puede comprender además una o más clases de antibióticos (por ejemplo aminoglucósidos, cefalosporinas, cloramfenicol, clindamicina, eritromicinas, fluoroquinolonas, macrólidos, azóolidos, metronidazol, penicilinas, tetraciclinas, trimetoprima-sulfametoxazol, vancomicina), esteroides (por ejemplo andranos (por ejemplo testosterona), colestanos (por ejemplo colesterol), ácidos cólicos (por ejemplo ácido cólico), corticosteroides (por ejemplo dexametasona), estranos (por ejemplo estradiol), pregnanos (por ejemplo progesterona), analgésicos narcóticos y no narcóticos (por ejemplo morfina, codeína, heroína, hidromorfona, levorfanol, meperidina, metadona, oxycodona, propoxifeno, fentanilo, metadona, naloxona, buprenorfina, butorfanol, nalbufina, pentazocina), quimioterapia (por ejemplo fármacos anticancerígenos tales como pero sin limitarse a alretamina, asparaginasa, bleomicina, busulfano, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dietilestilbesterol, etinilestradiol, etopósido, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, goserelina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, paclitaxel, pentostatina, pipobromán, plicamicina, prednisona, procabazina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, vinblastina, vincristina), agentes antiinflamatorios (por ejemplo alclofenaco; alclometasona dipropionato; algestona acetona; alfa amilasa; amcinafal; amcinafida; amfenaco sódico; clorhidrato de amiprilosa; anakinra; anilolaco; anitrazafeno; apazona; balsalazida disódica; bendazaco; benoxaprofeno; clorhidrato de bencidamina; bromelaínas; broperamol; budesonida; carprofeno; cicloprofeno; cintazona; cliprofeno; propionato de clobetasol; butirato de clobetasona; clopiraco; propionato de cloticasona; acetato de cormetasona; cortodoxona; decanoato; deflazacort; delatestrilo; depo-testosterona; desonida; desoximetasona; dipropionato de dexametasona; diclofenaco potásico; diclofenaco sódico; diacetato de diflorasona; diflumidona sódica; diflunisal; difluprednato; diftalona; dimetilsulfóxido; drocinonida; endrisona; enlimomab; enolicam sódico; epirizol; etodolaco; etofenamato; felbinaco; fenamol; fenbufeno; fenclofenaco; fencloraco; fendosal; fempipalona; fentiazaco; flazalona; fluazacort; ácido flufenámico; flumizol; acetato de flunisolida; flunixina; flunixina meglumina; fluocortibutilo; acetato de fluorometolona; flucuzona; flurbiprofeno; fluretofeno; propionato de fluticasona; furaprofeno; furobufeno; halcinonida; propionato de halobetasol; acetato de halopredona; ibufenaco; ibuprofeno; ibuprofeno aluminio; ibuprofeno piconol; ilonidap; indometacina; indometacina sódica; indoprofeno; indoxol; intrazol; acetato de isoflupredona; isoxepaco; isoxicam; ketoprofeno; clorhidrato de lofemizol; lomoxicam; etabonato de loteprednol; meclofenamato sódico; ácido meclofenámico; dibutirato de meclorisona; ácido mefenámico; mesalamina; meseclazona; mesterolona; metandrostenolona; metenolona; acetato de metenolona; suleptanato de metilprednisolona; momiflumato; nabumetona; nandrolona; naproxeno; naproxeno sódico; naproxol; nimazona; olsalazina sódica; orgoteína; orpanoxina; oxandrolona; oxaprozina; oxifenbutazona; oximetolona; clorhidrato de paranilina; polisulfato de pentosano sódico; glicerato de fenbutazona sódico; pifrenidona; piroxicam; cinamato de piroxicam; piroxicam olamina; piroprofeno; prednazato; pifrelona; ácido prodólico; provuazona; proxazol; citrato de proxazol; rimexolona; romazarit; salcolex; salnacedina; salsalato; cloruro de sanguinario; seclazona; sermetacina; estanozolol; sudoxicam; sulindaco; suprofen; talmetacina; talniflumato; talosalato; tebufelona; tenidap; tenidap sódico; tenoxicam; tesicam; tesimida; testosterona; combinaciones de testosterona; tetridamina; tiopinaco; tixocortol pivalato; tolmetina; tolmetina sódica; triclónida; triflumidato; zidometacina; zomepiraco sódico), o agentes antihistamínicos (por ejemplo etanolaminas (como difenhidramina carbinoxamina), etilendiamina (como tripelenamina pirilamina), alquilamina (como clorfeniramina, dexclorfeniramina, bromfeniramina, triprolidina), otras antihistaminas como astemizol, loratadina, fexofenadina, brofeniramina, clemastina, acetaminofeno, pseudoefedrina, triprolidina).

Las composiciones pueden administrarse por vía tópica, oral o parenteral. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse por vía extracorpórea, intracraneal, intravaginal, intraanal, subcutánea, intradérmica, intracardiaca, intragástrica, intravenosa, intramuscular, mediante inyección intraperitoneal, transdérmica, intranasal o mediante inhalante. Tal como se usa en el presente documento, "administración intracraneal" significa la administración directa de sustancias al cerebro incluyendo, por ejemplo, intratecal, intracisternal, intraventricular o administración transesfenoidal por medio de catéter o aguja.

La administración parenteral de la composición, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, o bien como suspensiones o disoluciones líquidas, formas sólidas adecuadas para la disolución de la suspensión en líquido previamente a la inyección o bien como emulsiones. Un enfoque revisado más recientemente para administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación sostenida o de liberación lenta de manera que se mantenga una dosificación constante. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 3.610.795.

Tal como se usa en el presente documento, "administración intranasal tópica" significa el suministro de las composiciones en la nariz y conductos nasales a través de uno o ambos orificios nasales y puede comprender la administración mediante un mecanismo de pulverización o mecanismo de gotitas, o a través de aplicación con aerosol del ácido nucleico o vector. La administración de las composiciones mediante inhalante puede ser a través de la nariz o boca por medio de administración mediante un mecanismo de pulverización o gotitas. La administración puede ser directamente a cualquier zona del sistema respiratorio (por ejemplo, pulmones) por medio de intubación.

La cantidad exacta de las composiciones requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, la gravedad del trastorno alérgico que está tratándose, el ácido nucleico o vector particular usado, su modo de administración y similares. Por tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, puede determinarse una cantidad apropiada por un experto habitual en la técnica usando solo experimentación de rutina según las enseñanzas en el presente documento.

Los materiales pueden estar en disolución o suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas, liposomas o células). Estos pueden dirigirse a un tipo de célula particular por medio de anticuerpos, receptores o ligandos de receptores. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Senter, *et al.*, Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., Br. J. Cancer, 60:275-281, (1989); Bagshawe, *et al.*, Br. J. Cancer, 58:700-703, (1988); Senter, *et al.*, Bioconjugate Chem., 4:3-9, (1993); Battelli, *et al.*, Cancer Immunol. Immunother., 35:421-425, (1992); Pietersz y McKenzie, Immunolog. Reviews, 129:57-80, (1992); y Roffler, *et al.*, Biochem. Pharmacol., 42:2062-2065, (1991)). Vehículos tales como liposomas "furtivos" y otros conjugados con anticuerpo (incluyendo direccionamiento de fármacos mediado por lípidos a carcinoma colónico), direccionamiento mediado por receptor de ADN a través de ligandos específicos de célula, direccionamiento a tumor dirigido por linfocito y direccionamiento retroviral terapéutico altamente específico de células de glioma murino *in vivo*. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Hughes *et al.*, Cancer Research, 49:6214-6220, (1989); y Litzinger y Huang, Biochimica et Biophysica Acta, 1104:179-187, (1992)). En general, los receptores están implicados en rutas de endocitosis, o bien constitutivas o bien inducidas por ligando. Estos receptores se agrupan en fosas recubiertas de clatrina, entran en la célula por medio de vesículas recubiertas de clatrina, pasan a través de un endosoma acidificado en el que se clasifican los receptores y entonces o bien se recirculan a la superficie celular, se almacenan de manera intracelular o bien se degradan en lisosomas. Las rutas de internalización cumplen una variedad de funciones, tales como captación de nutrientes, eliminación de proteínas activadas, aclaramiento de macromoléculas, entrada oportunista de virus y toxinas, disociación y degradación de ligandos y regulación del nivel de receptor. Muchos receptores siguen más de una ruta intracelular, dependiendo del tipo de célula, concentración de receptor, tipo de ligando, valencia de ligando y concentración de ligando. Se han revisado mecanismos moleculares y celulares de endocitosis mediada por receptor (Brown y Greene, DNA and Cell Biology 10:6, 399-409 (1991)).

Se describen vehículos adecuados y sus formulaciones en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19^a ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Normalmente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución salina, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. El pH de la disolución puede ser de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8, de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 7.5. Vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Para los expertos en la técnica será evidente que determinados vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y concentración de la composición que está administrándose.

Los expertos en la técnica conocen vehículos farmacéuticos. Estos serían, lo más normalmente, vehículos convencionales para la administración de fármacos a humanos, incluyendo disoluciones tales como agua estéril, solución salina y disoluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones pueden administrarse por vía intramuscular o subcutánea. Otros compuestos se administrarán según procedimientos convencionales usados por los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también uno o más principios activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, y similares.

La composición farmacéutica puede administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico, y de la zona que va a tratarse. La administración puede ser por vía tópica (incluyendo oftálmica, vaginal, rectal, intranasal), por vía oral, mediante inhalación, o por vía parenteral, por ejemplo mediante goteo intravenoso, inyección intramuscular, intraperitoneal o subcutánea.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de nutrientes y fluidos, reponedores de electrolitos (tal como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Las formulaciones para administración tópica pueden incluir ungüentos, lociones, cremas, geles (por ejemplo, gel de poloxámero), gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases oleosas, en polvo o acuosas, espesantes y similares. Las composiciones divulgadas pueden administrarse, por ejemplo, en una microfibra, polímero (por ejemplo, colágeno), nanoesfera, aerosol, loción, crema, material textil, plástico, armazón diseñado por ingeniería de tejidos, material de matriz, comprimido, recipiente implantado, polvo, aceite, resina, vendaje para heridas, perla, microperla, perla de liberación lenta, cápsula, inyectables, goteos intravenosos, dispositivo de bombeo, implantes de silicona o cualquier material diseñado por ingeniería genética.

En un aspecto el vehículo farmacéuticamente aceptable divulgado es un poloxámero. Los poloxámeros, a los que se hace referencia por el nombre comercial Pluronic[®], son tensioactivos no iónicos que forman geles termorreversibles transparentes en agua. Poloxámeros son copolímeros de triple bloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (OPE-OPP-OPE). Las dos cadenas de poli(óxido de etileno) son hidrófilas pero la cadena de polipropileno es hidrófoba. Estas características hidrófobas e hidrófilas predominan cuando se colocan en disoluciones acuosas. Las cadenas de OPE-OPP-OPE adoptan la forma de pequeñas hebras en las que los centros hidrófobos se unirían entre sí para formar micelas. La micela, secuencialmente, tiende a tener características gelificantes porque se unen en grupos para formar sólidos (geles) en los que el agua está solo ligeramente presente cerca de los extremos hidrófilos. Cuando se enfría, se vuelve líquido, pero se endurece cuando se calienta. Esta característica lo hace útil en composiciones farmacéuticas porque puede recogerse con una jeringuilla para medición de la dosis precisa cuando está frío. Cuando se calienta hasta temperatura corporal (cuando se aplica a la piel) se espesa hasta una consistencia perfecta (especialmente cuando se combina con lecitina de soja/palmitato de isopropilo) para facilitar una adhesión y unión apropiadas. Pluronic[®] F127 (F127) se usa ampliamente porque se obtiene fácilmente y por tanto se usa en tales aplicaciones farmacéuticas. F127 tiene una razón de OE:OP:OE de 100:65:100, que en peso tiene un razón de OPE:OPP de 2:1. El gel Pluronic es una disolución acuosa y normalmente contiene el 20-30% de F-127. Por tanto, las composiciones divulgadas pueden administrarse en F127.

Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o disoluciones en medios acuosos o no acuosos, cápsulas, sobres o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsificantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes.

Algunas de las composiciones pueden administrarse posiblemente como una sal de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptable, formada mediante reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico, o mediante reacción con una base inorgánica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialkil y arilaminas y etanolaminas sustituidas.

Dosificaciones eficaces y calendarios para la administración de las composiciones pueden determinarse empíricamente y la elaboración de tales determinaciones está dentro del conocimiento en la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en los que se ven afectados los síntomas del trastorno. La dosificación no debe ser tan grande como para producir efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, estado, sexo y grado de la enfermedad en el paciente, vía de administración, o si se incluyen otros fármacos en el régimen, y puede determinarla un experto en la técnica.

La dosificación puede ajustarla el doctor individual en el caso de cualquier contraindicación. La dosificación puede variar y puede administrarse en una o más administraciones de dosis al día, durante uno o varios días. Puede encontrarse una guía en la bibliografía para dosificaciones apropiadas para clases proporcionadas de productos farmacéuticos. El intervalo de dosificación depende en gran medida de la aplicación de las composiciones en el presente documento, la gravedad del estado y su vía de administración.

Por ejemplo, en aplicaciones como una herramienta de laboratorio para investigación, las composiciones de péptido ACT pueden usarse en dosis tan bajas como el 0,01% p/v. La dosificación puede ser tan baja como el 0,02% p/v y posiblemente tan alta como el 2% p/v en tratamientos de heridas cutáneas por vía tópica. Pueden usarse concentraciones significativamente mayores de las composiciones por sí mismas o en combinación con otros compuestos en aplicaciones como terapia contra el cáncer/tumor o como bolo concentrado temprano inmediatamente tras una lesión de tejido aguda. Por tanto, los límites superiores de los polipéptidos divulgados pueden ser de hasta el 2-5% p/v o v/v si se proporcionan como un bolo inicial suministrado por ejemplo directamente en una masa tumoral. Los límites superiores de dosificación recomendados para vías de administración parenterales por ejemplo intramuscular, intracerebral, intracardiaca e intrarraquídea podrían ser de hasta el 1% p/v o v/v dependiendo de la gravedad de la lesión. Este límite de dosificación superior puede variar según la formulación, dependiendo por ejemplo de cómo se combina(n) el/los polipéptido(s) con otros agentes que promueven su acción o que actúan en colaboración con el/los polipéptido(s).

Para la administración continua de los polipéptidos divulgados, por ejemplo, en combinación con un goteo intravenoso, pueden usarse límites superiores de 0,01 g/kg de peso corporal en transcurso temporales determinados por el médico basándose en mejoras en el estado. En otro ejemplo, los límites superiores de concentración de los ácidos nucleicos divulgados administrados por vía tópica, por ejemplo, en heridas cutáneas serían de 5-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de herida dependiendo por ejemplo de cómo se combina el ácido nucleico con otros agentes que promueven su acción o que actúan en colaboración con los ácidos nucleicos. Esto se repetiría a una frecuencia determinada por el médico basándose en mejoras. En otro ejemplo, los límites superiores de concentración de los ácidos nucleicos divulgados administrados internamente por ejemplo, por vía intramuscular, intracerebral, intracardiaca e intrarraquídea serían de 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de disolución. De nuevo, la frecuencia la determinaría el médico basándose en mejoras.

También se divulga el acondicionamiento previo de un área con los polipéptidos divulgados previamente a la cirugía. La concentración de los polipéptidos puede ser de 10-200 μM mezclados con el 10-30% de gel plurónico o cualquier vehículo de este tipo que permita la penetración del/de los péptido(s) dentro del sitio de interés durante un periodo de al menos 3-6 horas previamente a la cirugía. Este acondicionamiento previo al procedimiento puede mejorar la respuesta de cicatrización posterior a la cirugía, incluyendo una respuesta inflamatoria reducida.

Los vectores virales siguen siendo herramientas altamente experimentales que no obstante muestran un potencial considerable en aplicaciones clínicas. Como tal, se garantiza precaución en el cálculo de regímenes de dosificación esperados para vectores virales y dependerá considerablemente del tipo de vector usado. Por ejemplo, los vectores retrovirales infectan eficazmente a células en división tales como células cancerosas, intercalándose en el genoma de la célula huésped y continuando la expresión de las proteínas codificadas indefinidamente. Las dosificaciones típicas de retrovirus en un entorno de modelo animal están en el intervalo de 10^7 a 10^9 unidades infecciosas por ml. Por el contrario, los adenovirus se seleccionan como diana lo más eficazmente células postmitóticas, pero las células se eliminan rápidamente mediante el sistema inmunitario del huésped o el virus se pierde finalmente si las células infectadas reanudan la proliferación y posteriormente diluyen el ADN episomal viral. De hecho, este transcurso temporal transitorio de la infección puede ser útil para administración a corto plazo de la composición descrita en el presente documento en determinadas situaciones clínicas, por ejemplo en la mejora de una pequeña lesión. En modelos animales, concentraciones de 10^8 - 10^{11} unidades infecciosas por ml de adenovirus son típicas para usos en investigación. Los intervalos de dosificación de vectores basados en datos derivados de modelos animales estarían previstos que se usaran finalmente en entorno(s) clínico(s), a la espera del desarrollo de formulación(es) farmacéuticamente aceptable(s).

Dos aplicaciones tópicas de composiciones de ACT al 0,02% p/v; una aplicada de manera aguda y la segunda aplicada 24 horas después son suficientes para reducir la inflamación, promover la cicatrización, reducir la formación de cicatrices, aumentar la resistencia a la tracción y promover la regeneración tisular. Sin embargo, en un entorno clínico, se recomienda una frecuencia aumentada de hasta 3 aplicaciones al día por vía tópica a una concentración de hasta el 5% hasta que se logre una mejora significativa tal como determina el médico. Para administración interna, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intracerebral, intracardiaca e intrarraquídea, se recomienda una frecuencia aumentada de hasta 3 dosificaciones del 1% p/v o v/v al día hasta mejora significativa tal como determina el médico.

Tras la administración de una composición divulgada, tal como un polipéptido, para promover la cicatrización de heridas, la eficacia de la composición terapéutica puede evaluarse de diversas formas bien conocidas por el médico experto. Por ejemplo, un experto habitual en la técnica entenderá que una composición, tal como un polipéptido, divulgado en el presente documento es eficaz en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto observando que la composición puede reducir la formación de tejido cicatricial, reducir la formación de tejido

fibrótico, mejorar la regeneración tisular o reducir la inflamación en el sujeto tras la lesión tisular. Se conocen en la técnica métodos para medir estos criterios y se comentan en el presente documento.

También se divulgan materiales que comprenden las composiciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores). Por ejemplo, se divulgan materiales usados para tratar heridas, en los que los materiales están recubiertos con un polipéptido ACT. Ejemplos no limitativos de materiales usados para tratar heridas incluyen vendajes, cinta quirúrgica, suturas, grapas o injertos (por ejemplo, injertos de piel).

Por ejemplo, el material (por ejemplo, vendaje, cinta quirúrgica, sutura, grapa, injerto) puede remojar en el polipéptido divulgado a una concentración que oscila entre 10-200 μM . El material puede secarse entonces y sellarse en un recipiente estéril. El material también puede sumergirse en gel plurónico líquido al 10-30% a 4°C que contiene polipéptido a una concentración de 10-200 μM . El material puede entonces llevarse hasta aproximadamente temperatura ambiente de manera que el gel polimerice, dejando un recubrimiento de gel impregnado en polipéptido que rodea el material, que puede sellarse en un recipiente estéril. El polipéptido también puede incorporarse en un sistema de hidrogel reticulable, tal como el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) o poliuretano, que puede entonces diseñarse como materiales para tratar heridas (por ejemplo, vendaje, cinta quirúrgica, sutura, grapa, injerto). Por tanto, se divulgan materiales compuestos de hidrogel-péptido.

También se divulgan implantes médicos recubiertos con el polipéptido divulgado antes de su implantación en un sujeto. Por ejemplo, un problema común en tales cirugías de implante es la formación de una cápsula de contracción alrededor del implante a partir de la formación de tejido cicatricial que conduce a un endurecimiento indebido, contracción y finalmente deformación del tejido de interés. El uso de los presentes polipéptidos en o sobre el implante puede reducir o evitar esta deformación. Ejemplos no limitativos de implantes médicos incluyen: prótesis de extremidades, implantes de mama, implantes de pene, implantes testiculares, ojos artificiales, implantes faciales, articulaciones artificiales, prótesis de válvulas cardíacas, prótesis vasculares, prótesis dentales, prótesis faciales, válvula de disco inclinado, válvula de bola enjaulada, prótesis de oído, prótesis de nariz, marcapasos, implantes cocleares y sustitutos de la piel (por ejemplo, heteroinjerto porcino/piel de cerdo, BIOBRANE, queratinocitos cultivados).

El polipéptido según la invención se recubre sobre un implante médico o material de tratamiento de heridas.

En el presente documento se divulga un método de promoción de la cicatrización de heridas tras la lesión tisular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una o más de las composiciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores) en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además se divulga un método de tratamiento de un sujeto con lesión tisular, que comprende administrar al sujeto una o más de las composiciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

“Promover,” “promoción” y “que promueve” se refieren a un aumento en una actividad, respuesta, estado, enfermedad u otro parámetro biológico. Esto puede incluir pero no se limita al inicio de la actividad, respuesta, estado o enfermedad. Esto puede incluir también, por ejemplo, un aumento del 10% en la actividad, respuesta, estado o enfermedad en comparación con el nivel nativo o de control. Por tanto, el aumento puede ser del 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 100%, o cualquier cantidad de aumento entre medias en comparación con los niveles nativos o de control.

Por “tratar” o “tratamiento” se entiende un método de reducción de los efectos de una enfermedad o estado. Tratamiento puede referirse también a un método de reducción de la causa subyacente de la enfermedad o estado en sí más que solo los síntomas. El tratamiento puede ser cualquier reducción de los niveles nativos y puede ser pero no se limita a la supresión completa de la enfermedad, estado o los síntomas de la enfermedad o estado. Por ejemplo, un método divulgado para promover la cicatrización de heridas se considera un tratamiento si hay una reducción del 10% en uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto con la enfermedad en comparación con niveles nativos en el mismo sujeto o sujetos de control. Por tanto, la reducción puede ser del 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 100%, o cualquier cantidad de reducción entre medias en comparación con niveles nativos o de control.

El polipéptido según la invención es para su uso en un método de tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, “sujeto” incluye, pero no se limita a, animales, plantas, bacterias, virus, parásitos y cualquier otro organismo o entidad que tiene ácido nucleico. El sujeto puede ser un vertebrado, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, primate no humano, vaca, gato, cobaya o roedor), un pez, un pájaro o un reptil o un anfibio. El sujeto puede ser un invertebrado, más específicamente un artrópodo (por ejemplo, insectos y crustáceos). El término no indica una edad o sexo particular. Por tanto, se pretende que se cubran sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, tanto machos como hembras. Un paciente se refiere a un sujeto aquejado con una enfermedad o trastorno. El término “paciente” incluye sujetos humanos y veterinarios.

El método divulgado puede reducir la formación de tejido cicatricial en un sujeto tras la lesión tisular. Por “tejido cicatricial” se entiende el tejido conjuntivo fibroso (fibrótico) que se forma en el sitio de la lesión o enfermedad en cualquier tejido del cuerpo, producido por la sobreproducción de colágeno desorganizado y otras proteínas de tejido conjuntivo, que actúan para reparar la rotura en el tejido. El tejido cicatricial puede reemplazar músculo subyacente y piel lesionados, músculo cardíaco dañado, o áreas enfermas de órganos internos tales como el hígado. Denso y espeso, es habitualmente más pálido que el tejido circundante porque tiene un escaso suministro de sangre, y aunque reemplaza estructuralmente al tejido destruido, no puede realizar las funciones del tejido que falta. Está compuesto de fibras de colágeno, que restringirán a menudo la elasticidad normal en el tejido implicado. El tejido cicatricial puede por tanto limitar el intervalo de movimiento muscular o evitar la circulación apropiada de los fluidos cuando afecta al sistema circulatorio o linfático. El tejido cicatricial glial tras la lesión del cerebro o médula espinal es uno de los principales obstáculos para la restauración de la función neuronal tras el daño al sistema nervioso central. Una reducción en el tejido cicatricial puede evaluarse mediante la población de tipos de célula dentro del sitio lesionado. Por ejemplo, una reducción en el tejido cicatricial glial puede estimarse mediante una razón aumentada de células neuronales con respecto a astrocíticas. Una reducción en la formación de tejido cicatricial puede medirse mediante una medición sencilla de la anchura de la cicatriz o área de tejido cicatricial (Wilgus *et al.*, 2003). Además pueden realizarse evaluaciones histológicas sobre la restauración de la complejidad estructural dentro del tejido cicatrizado en comparación con el tejido normal.

Además de reducir la formación de tejido fibrótico en un sujeto tras la lesión tisular, los métodos y composiciones divulgados pueden usarse también para tratar trastornos asociados con aumentos patológicos en la formación de tejido fibrótico en un sujeto, tal como por ejemplo, psoriasis, mastocitosis sistémica y cutánea, asma, eccema, sinusitis, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, fibrosis pulmonar y fibrosis quística. Una reducción en la formación de tejido fibrótico en un sujeto puede medirse mediante el juicio clínico de un médico que evalúa si ha resultado una recuperación en la estructura y función normales de un tejido y/o órgano dado en un sujeto tras un tratamiento. Como un ejemplo, para la psoriasis un médico evaluaría la piel del sujeto para determinar si ha habido una reducción en las manchas de piel roja levantada cubierta de acumulaciones escamosas blancas. Determinados tipos de psoriasis se caracterizan por una apariencia de grano (psoriasis pustulosa) o de quemadura (eritodérmica). En tales casos, el doctor determinaría si el tratamiento ha dado como resultado la reducción de estos síntomas. En el caso de un tejido u órgano en el que un sujeto en el que un médico juzga que una biopsia está clínicamente disponible y/o es necesaria o en un modelo animal de la enfermedad humana, se prepararían fragmentos de tejido de biopsias y se evaluaría la estructura histológica tisular por un patólogo clínico y/o histopatólogo entrenado para determinar si se ha producido reducción en la fibrosis y restauración de la función y estructura tisular normales. El área de fibrosis con respecto a tejido normal también podría evaluarse cuantitativamente en tales preparaciones histológicas.

El método divulgado puede restaurar las propiedades mecánicas de tejido normal tales como resistencia a la tracción tras lesión tisular en un sujeto. “Resistencia a la tracción” se refiere a la cantidad de tensión o deformación requerida para romper el tejido o herida.

La resistencia a la tracción de las heridas tratadas puede ser el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95, el 100% de la del tejido no lesionado en el plazo de 3 meses después del tratamiento. Por tanto, se divulga un método de restauración de las propiedades mecánicas del tejido, que incluye aumentar la resistencia a la tracción de una lesión cicatrizada para aproximarse o alcanzar la de un tejido no lesionado normal, en un sujeto que comprende administrar al sujeto una o más de las composiciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El tipo de heridas que sería importante con respecto a la resistencia a la tracción/extensibilidad incluiría lesiones en tejidos/estructuras musculoesqueléticas, y la piel que recubre estas estructuras. Por ejemplo, los métodos divulgados pueden mejorar la resistencia a la tracción de articulaciones articulares, hueso, cartílago, tendones o ligamentos. Los métodos divulgados también pueden mejorar la resistencia a la tracción de la piel a menores grados de tensión/deformación, tal como la piel que recubre el codo, la rodilla o el pie. Los problemas más comunes asociados con la cicatrización de lesiones articulares es que la formación excesiva de cicatrices en estas zonas conduce a contracción, y no extensibilidad del área articular cicatrizada. Esto tiene graves consecuencias cosméticas y psicológicas. Las propiedades de los péptidos ayudarán a modular y reducir la formación de tal tejido cicatricial conduciendo a mayor movilidad de la articulación.

El método divulgado puede mejorar la regeneración tisular tras la lesión tisular en un sujeto. Por “regeneración” se entiende la renovación, el crecimiento o la restauración de un cuerpo o una parte corporal, un tejido o una sustancia tras lesión o como un proceso corporal normal. En contraposición a la formación de cicatrices, la regeneración tisular implica la restauración del tejido a su estado fisiológico, funcional y estructural original. Esto también se denomina en el presente documento “complejidad” tisular. La restauración puede ser parcial o completa, lo que significa el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 100% de restauración, o cualquier cantidad de restauración entre medias en comparación con niveles nativos o de control. Como ejemplo, en el caso de una lesión cutánea, la regeneración tisular puede implicar la restauración de folículos pilosos, estructuras glandulares, vasos sanguíneos, músculo o grasa. En el caso de una lesión de cerebro, la regeneración tisular puede implicar el mantenimiento o la restauración de las neuronas. Como ejemplo en el caso de la piel una mejora en la regeneración

tisular puede evaluarse mediante mediciones del volumen de tejido cicatricial fibroso con respecto a piel regenerada normal como una razón. Como otro ejemplo, pueden hacerse recuentos de estructuras de regeneración diferenciadas tales como glándulas cutáneas en regeneración normalizados para el volumen del área de la herida.

En un aspecto, la regeneración tisular implica el reclutamiento y la diferenciación de células madre para reemplazar a las células dañadas. Tal como se usa en el presente documento, una "célula madre" es una célula no diferenciada que se encuentra entre las células diferenciadas en un tejido u órgano, o se introduce desde una fuente externa como por ejemplo células madre embrionarias, células madre de médula ósea de adulto, que pueden autorrenovarse y diferenciarse para producir la mayoría de los tipos de células especializadas del tejido u órgano. Los papeles primarios de las células madre en un organismo vivo son mantener y reparar el tejido en el que se encuentran. Por diferenciación de células madre se entiende el proceso mediante el cual una célula no especializada (por ejemplo, una célula madre) adquiere las características de una célula especializada tal como una célula cutánea, neural, cardíaca, hepática o muscular. Como ejemplo, en el caso de una lesión cutánea, la regeneración tisular puede implicar la diferenciación de células madre presentes en el epitelio para dar folículos pilosos (Alonso y Fuchs, 2003). En el caso de una lesión de cerebro, la regeneración tisular puede implicar la diferenciación de células madre para dar neuronas. El método divulgado puede potenciar la diferenciación de células madre tras la lesión tisular en un sujeto. La diferenciación de células madre potenciada puede medirse proporcionando un medio genético u otro clínicamente aceptable de marcaje de células madre endógenas o injertadas y determinando la frecuencia de diferenciación e incorporación de células madre marcadas en estructuras de tejido normales. Como otro ejemplo, se sabe que determinadas estructuras tales como folículos pilosos van a regenerarse a partir de células madre endógenas tras la lesión tisular. Como tal, los recuentos de folículos pilosos normalizados al área de lesión tisular servirían como evaluación cuantitativa de la diferenciación de células madre potenciada.

El método divulgado puede reducir la inflamación en un sujeto. Por "inflamación", "respuesta inflamatoria" o "respuesta inmunitaria" se entiende la reacción de tejidos vivos a la lesión, infección o irritación caracterizada por enrojecimiento, calor, hinchazón, dolor y pérdida de función, producida como resultado del aumento de flujo de sangre y un flujo de entrada de células inmunitarias y secreciones. La inflamación en la reacción del cuerpo a los microorganismos infecciosos invasores y da como resultado un aumento del flujo de sangre a la zona afectada, la liberación de productos químicos que atraen a los glóbulos blancos, un aumento del flujo de plasma y la llegada de monocitos (o astrocitos en el caso del cerebro) para limpiar los residuos. Cualquier cosa que estimule la respuesta inflamatoria se dice que es inflamatoria. Por tanto, además de reducir la inflamación en un sujeto en respuesta a lesión tisular, las composiciones y los métodos divulgados también pueden usarse para tratar trastornos asociados con aumento patológico en los niveles de células inflamatorias, incluyendo, por ejemplo, asma, eccema, sinusitis, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, mastocitosis sistémica y cutánea, psoriasis y esclerosis múltiple. El tratamiento con el polipéptido divulgado también puede reducir el picor, por ejemplo de la cicatrización de heridas. Generalmente, el picor resulta de la liberación de histamina por los mastocitos. El polipéptido divulgado puede reducir la desgranulación de mastocitos y la liberación de histamina. Por tanto, el polipéptido divulgado puede usarse para tratar estados que implican liberación de histamina, incluyendo, pero sin limitarse a, picor, rascado, irritación de los senos, tos alérgica, ojos rojos, asma y eccema.

Una reducción en la inflamación puede medirse mediante una reducción en la densidad de tipos de células inflamatorias tales como, por ejemplo, monocitos o astrocitos. Una reducción en la inflamación puede medirse mediante una reducción en la densidad de tipos de células inflamatorias tales como, por ejemplo, neutrófilos, mastocitos, basófilos y monocitos. Una reducción en la inflamación puede calcularse mediante una medición *in vivo* de la actividad de neutrófilos (Jones *et al.*, 1994). Además pueden usarse factores como la frecuencia de desgranulación de mastocitos o la medición de los niveles de histamina o niveles de especies reactivas de oxígeno como mediciones de la reducción de la inflamación. El nivel de inflamación también puede medirse indirectamente comprobando los niveles de transcripción de determinados genes mediante qRT-PCR para por ejemplo genes como, interferón-alfa, -beta y -gamma, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 1beta, -2, -4, -5, -6, -8, -12, -18, -23, -27, CD4, CD28, CD80, CD86, MHCII y iNOS. La medición de los niveles de citocinas proinflamatorias en los tejidos y/o fluidos corporales del sujeto incluyendo el plasma puede medir una reducción en la inflamación. Cabe destacar que el mecanismo de acción de péptido ACT puede ser mediante inhibición de la migración de células inflamatorias y/o inhibición de productos químicos proinflamatorios (histamina, especies reactivas de oxígeno) y citocinas proinflamatorias tales como interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral (TNF).

El método divulgado puede inhibir la proliferación de una célula transformada en un sujeto (véase la figura 2). Por célula transformada se entiende una neoplasia, un cáncer o una célula tumoral que se divide y reproduce anómalamente con crecimiento no controlado. Por tanto, la inhibición de la proliferación (es decir, hiperplasia) de dicha célula transformada da como resultado una reducción en el crecimiento y por tanto la malignidad del cáncer. Una lista representativa pero no limitativa de los cánceres para los que pueden usarse las composiciones y los métodos divulgados para su tratamiento son los siguientes: glioma, linfoma, linfoma de células B, linfoma de células T, micosis fungoide, enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer del sistema nervioso, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cánceres de pulmón tales como cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células grandes, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de hígado, melanoma, carcinomas de células escamosas de la boca, la garganta, la laringe y el pulmón, cáncer de

colon, cáncer cervical, carcinoma cervical, cáncer de mama y cáncer epitelial, cáncer renal, cáncer genitourinario, cáncer pulmonar, carcinoma esofágico, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer de intestino grueso, cánceres hematopoyéticos, cáncer testicular, cánceres de colon y rectal, cáncer prostático o cáncer pancreático. Por tanto, el método divulgado puede usarse para tratar cáncer en un sujeto. Por ejemplo, el método divulgado puede usarse para tratar glioma en un sujeto.

Puede medirse una inhibición en la proliferación de células transformadas mediante una variedad de marcadores de proliferación celular y kits para lo mismo por ejemplo inmunotinción con Ki67/MIB-1, timidina tritiada o índices de marcaje de bromodeoxiuridina, fracción de fase S de ADN, expresión de antígeno nuclear de células en proliferación, tiempo de duplicación potencial y análisis de las proteínas asociadas a la región organizadora nucleolar (AgNOR). Puesto que la actividad proliferativa del tumor depende de tanto la proporción de células destinadas al ciclo (fracción de crecimiento) como de la velocidad del ciclo celular, la actividad proliferativa real de un tumor podría medirse bien mediante la ecuación $[PA = Ki67 \text{ o puntuaciones de MIB-1} \times AgNOR]$ (Pich *et al.*, 2004). En otro ejemplo, los histopatólogos son expertos en evaluar secciones de tejido usando índices cualitativos y cuantitativos sencillos de mitosis para determinar la proliferación en poblaciones de células transformadas.

Se han desarrollado diversos modelos de ratón para la investigación del cáncer. Hay modelos de ratón específicos para tipos específicos de cánceres. Por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer gastrointestinal, cáncer genitourinario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hematopoyético, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de glándulas mamarias, melanoma, mieloma, cáncer del sistema nervioso, cáncer oral, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel. Estos modelos están bien descritos y se usan. Los efectos favorables de los polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores divulgados en el presente documento pueden estudiarse en cualquiera de estos modelos. Por ejemplo el modelo de ratón de cáncer de piel puede usarse fácilmente para demostración. Los cánceres pueden cultivarse aplicando el modelo de xenoinjerto de tejidos cancerosos humanos en crecimiento usando el modelo de ratón cosanguíneo homogéneo, libre de patógenos específicos (un ratón desnudo) (Yoo, 2004). Los polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores divulgados en el presente documento pueden administrarse localmente para por ejemplo materiales diseñados por ingeniería genética tales como membranas de fibras huecas (Orlandini y Margaria. 1983; Ming Chu *et al.*, 1998) y microfibras, perlas de liberación lenta, agujas hipodérmicas, catéteres permanentes, que pueden insertarse localmente en el crecimiento canceroso, o administrarse de manera sistémica para alcanzar su diana para por ejemplo infusiones intravenosas, inyección intraperitoneal, por vía intramuscular. Este tratamiento puede administrarse por sí mismo o en combinación con otros compuestos terapéuticos para por ejemplo agentes quimioterápicos.

El método divulgado puede inhibir la metástasis de una célula transformada en un sujeto. Por "metástasis" se entiende la transmisión de células cancerosas desde un sitio original hasta uno o más sitios en otra parte en el cuerpo, habitualmente por medio de los vasos sanguíneos o linfáticos. La metástasis puede descomponerse en una serie de eventos. En primer lugar, la migración de células cancerosas comienza el proceso mediante el cual las células tumorales abandonan el sitio de crecimiento primario, penetrando a menudo en la membrana basal y moviéndose hacia la vasculatura local. La intravasación describe el proceso de entrada de células cancerosas en la vasculatura, y su distribución a sitios distantes. Extravasación se refiere al proceso de salida de células cancerosas desde la vasculatura. Finalmente, la proliferación de células cancerosas en el sitio distante se ve profundamente influenciada por la disponibilidad de factores de crecimiento localizados, influencias de células estromales y el medio de matriz extracelular circundante (el denominado "suelo") así como la disponibilidad de nutrientes y factores proporcionados por la vascularización resultante del tumor en crecimiento. Por tanto, las composiciones y los métodos divulgados pueden inhibir la metástasis de una célula transformada en un sujeto inhibiendo la migración (es decir, migración metastásica) de dicha célula. La tumorigénesis es el resultado de la desorganización del ciclo celular, que conduce a una proliferación celular no controlada. Los mecanismos de procesos celulares específicos que controlan la progresión del ciclo celular y el paso por puntos de control a través de las fases intermitóticas están desregulados. Normalmente, estos eventos están altamente conservados debido a la existencia de mecanismos y moléculas de conservación tales como genes del ciclo celular y sus productos. Una inhibición en la migración metastásica puede medirse mediante los niveles de tales genes del ciclo celular y sus productos como por ejemplo ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), inhibidores de Cdk (CKI) y factores extracelulares (es decir, factores de crecimiento). Están disponibles técnicas revolucionarias que usan citometría láser y software comercial para cuantificar y evaluar procesos del ciclo celular y el crecimiento celular. Las mediciones de fracción de fase S, incluyendo valores de ploidía, usando histogramas y estimación de índices tales como el índice mitótico y los índices de tiempo de duplicación tumoral, proporcionan una información adecuada al médico para evaluar la agresividad del tumor.

Tal como se usa en el presente documento, la lesión en el tejido puede resultar de, por ejemplo, una raspadura, corte, herida de laceración, herida de aplastamiento, herida de compresión, herida de estiramiento, herida de mordedura, raspón, herida de bala, lesión de explosión, perforación corporal, herida de puñalada, herida de quemadura, herida por viento, quemadura solar, quemadura química, herida quirúrgica, intervención quirúrgica, intervención médica, rechazo del huésped tras injerto de célula, tejido u órgano, efecto farmacéutico, efecto secundario farmacéutico, úlcera de decúbito, lesión por radiación, herida cutánea cosmética, proceso de enfermedad (por ejemplo, asma, cáncer), infección, agente infeccioso, proceso de desarrollo, proceso de maduración (por ejemplo, acné), anomalía genética, anomalía del desarrollo, toxina ambiental, alérgeno, lesión en el cuero cabelludo,

lesión facial, lesión en la mandíbula, lesión en el pie, lesión en los dedos del pie, lesión en los dedos de la mano, lesión ósea, lesión en los órganos sexuales, lesión articular, lesión en los órganos excretorios, lesión ocular, lesión corneal, lesión muscular, lesión en el tejido adiposo, lesión pulmonar, lesión en las vías respiratorias, hernia, lesión anal, hemorroides, lesión en el oído, lesión en la retina, lesión cutánea, lesión abdominal, lesión en los brazos, lesión en las piernas, lesión atlética, lesión en la espalda, lesión de nacimiento, lesión de nacimiento prematuro, mordedura tóxica, picadura, lesión en los tendones, lesión en los ligamentos, lesión cardíaca, lesión en las válvulas cardíacas, lesión en el sistema vascular, lesión en el cartilago, lesión en el sistema linfático, traumatismo craneoencefálico, dislocación, perforación esofágica, fistula, lesión en las uñas, cuerpo extraño, fractura, congelación, lesión en las manos, trastorno de estrés térmico, laceración, lesión en el cuello, automutilación, choque, lesión de tejidos blandos traumática, lesión en la médula espinal, lesión espinal, esguince, distensión, lesión en los tendones, lesión en los ligamentos, lesión en el cartilago, lesión torácica, lesión en los dientes, traumatismo, lesión en el sistema nervioso, envejecimiento, aneurisma, accidente cerebrovascular, lesión en el tracto digestivo, infarto o lesión isquémica.

B. Métodos de preparación de las composiciones

Las composiciones divulgadas en el presente documento y las composiciones necesarias para realizar los métodos divulgados pueden prepararse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica para ese compuesto o reactivo particular a menos que se indique específicamente otra cosa.

Por ejemplo, los ácidos nucleicos divulgados pueden prepararse usando métodos de síntesis química convencionales o pueden producirse usando métodos enzimáticos o cualquier otro método conocido. Tales métodos pueden oscilar entre digestión enzimática convencional seguida por aislamiento de fragmentos de nucleótidos (véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) capítulos 5, 6) hasta métodos puramente de síntesis, por ejemplo, el método de fosforamidita de cianoetilo usando un sintetizador de ADN System 1Plus de Milligen o Beckman (por ejemplo, sintetizador automatizado modelo 8700 de Milligen-Bioscience, Burlington, MA o ABI modelo 380B). También se describen métodos de síntesis útiles para preparar oligonucleótidos por Ikuta *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 53:323-356 (1984), (métodos de fosfotriéster y fosfito-triéster), y Narang *et al.*, Methods Enzymol., 65:610-620 (1980), (método de fosfotriéster). Pueden prepararse moléculas de ácido nucleico proteico usando métodos conocidos tales como los descritos por Nielsen *et al.*, Bioconjug. Chem. 5:3-7 (1994).

Un método de producción de los polipéptidos divulgados, tales como SEQ ID NO: 2, es unir dos o más péptidos o polipéptidos entre sí mediante técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, pueden sintetizarse químicamente péptidos o polipéptidos usando equipo de laboratorio disponible actualmente usando química de o bien Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) o bien Boc (terc-butiloxycarbonilo). (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido correspondiente a las proteínas divulgadas, por ejemplo, puede sintetizarse mediante reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, un péptido o polipéptido puede sintetizarse y no escindirse de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un péptido o proteína puede sintetizarse y posteriormente escindirse de la resina, exponiendo de ese modo un grupo terminal que está bloqueado funcionalmente sobre el otro fragmento. Mediante reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos pueden unirse covalentemente por medio de un enlace peptídico en sus extremos carboxilo y amino terminales, respectivamente, para formar una proteína, o fragmento de la misma. (Grant GA (1992) Synthetic Peptides: A User Guide. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky M y Trost B., Ed. (1993) Principles of Peptide Synthesis. Springer-Verlag Inc., NY

Alternativamente, el péptido o polipéptido se sintetiza independientemente *in vivo* tal como se describe en el presente documento. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes pueden unirse para formar un péptido o fragmento del mismo por medio de reacciones de condensación de péptidos similares.

Por ejemplo, la ligación enzimática de segmentos de péptidos clonados o sintéticos permiten que se unan fragmentos de péptidos relativamente cortos para producir fragmentos de péptidos más grandes, polipéptidos o dominios proteicos completos (Abrahmsen L *et al.*, Biochemistry, 30:4151 (1991)). Alternativamente, puede utilizarse ligación química nativa de péptidos sintéticos para construir de manera sintética péptidos o polipéptidos grandes a partir de fragmentos de péptidos más cortos. Este método consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson *et al.* Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science, 266:776-779 (1994)). La primera etapa es la reacción quimiosselectiva de un tioéster de péptido sintético no protegido con otro segmento de péptido no protegido que contiene un residuo de Cys amino-terminal para dar un producto intermedio unido por tioéster como producto covalente inicial. Sin un cambio en las condiciones de reacción, este producto intermedio experimenta reacción intramolecular rápida, espontánea para formar un enlace peptídico nativo en el sitio de ligación (Baggiolini M *et al.* (1992) FEBS Lett. 307:97-101; Clark-Lewis I *et al.*, J.Biol.Chem., 269:16075 (1994); Clark-Lewis I *et al.*, Biochemistry, 30:3128 (1991); Rajarathnam K *et al.*, Biochemistry 33:6623-30 (1994)).

Alternativamente, segmentos de péptidos no protegidos se unen químicamente cuando el enlace formado entre los segmentos de péptidos como resultado de la ligación química es un enlace no natural (no peptídico) (Schmolzer, M *et al.* Science, 256:221 (1992)). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios proteicos así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (deLisle Milton RC *et al.*,

Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, Nueva York, págs. 257-267 (1992)).

Se divulgan procedimientos para preparar las composiciones así como los productos intermedios que conducen a las composiciones. Existe una variedad de métodos que pueden usarse para preparar estas composiciones, tales como métodos químicos de síntesis y métodos de biología molecular convencionales. Se entiende que los métodos de preparación de éstas y las otras composiciones divulgadas se divulgan específicamente. Se divulgan moléculas de ácido nucleico producidas mediante el procedimiento que comprende unir de un modo funcional un ácido nucleico que codifica para un polipéptido divulgado en el presente documento y una secuencia que controla la expresión del ácido nucleico. Se divulgan células producidas mediante el procedimiento de transformación de la célula con cualquiera de los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento. Se divulgan cualquiera de los péptidos divulgados producidos mediante el procedimiento de expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento. Se divulgan animales producidos mediante el procedimiento de transfección de una célula dentro del animal con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento. Se divulgan animales producidos mediante el procedimiento de transfección de una célula dentro del animal con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento, en el que el animal es un mamífero. Además se divulgan animales producidos mediante el procedimiento de transfección de una célula dentro del animal con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento, en el que el mamífero es ratón, rata, conejo, vaca, oveja, cerdo o primate. Además se divulgan animales producidos mediante el procedimiento de añadir al animal cualquiera de las células divulgadas en el presente documento.

C. Kits

Los materiales descritos anteriormente así como otros materiales pueden envasarse juntos en cualquier combinación adecuada como un kit útil para realizar, o ayudar en la realización de, el método divulgado. Es útil si los componentes del kit en un kit dado están diseñados y adaptados para su uso conjunto en el método divulgado. Por ejemplo se divulgan kits para promover la cicatrización de heridas, comprendiendo el kit uno o más de los polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores divulgados en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales kits también pueden incluir geles, vendajes, cintas Millipore, Q-tip medicadas, pulverizaciones, gotas, jarabes, líquidos, tubos o bolsas desechables. Los kits también pueden contener instrucciones para su uso apropiado e información de seguridad del producto o la formulación. Los kits pueden contener información de dosificación basándose en la aplicación y el método de administración tal como determina un médico.

D. Usos

Los métodos y las composiciones divulgados pueden aplicarse a numerosas áreas incluyendo, pero sin limitarse a, herramientas de investigación de laboratorio. Estas formulaciones desempeñan papeles reguladores en varios procesos celulares como por ejemplo proliferación celular, migración celular. Estas formulaciones pueden usarse en el laboratorio en sistemas modelo tanto *in vitro* como *in vivo* para estudiar diversos procesos celulares, regulaciones del ciclo celular, comportamiento celular, respuestas de células, órganos o tejidos a compuestos de prueba, etc. Las formulaciones pueden suministrarse por sí mismas o en combinación con otros compuestos o como parte de un kit, tal como un kit para un ensayo de proliferación celular. El kit puede contener las formulaciones mencionadas en el presente documento por sí mismas o en combinación con otros compuestos. Un kit de este tipo incluiría instrucciones diseñadas para facilitar el experimento. Se divulgan otros usos, evidentes a partir de la divulgación, y/o los entenderán los expertos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Lesión por arañazo *in vitro*

Se hicieron crecer miocitos de corazones de ratas neonatas hasta formar una monocapa casi confluyente sobre una placa de cultivo tisular según protocolos convencionales. Posteriormente se permitió que los cultivos se cultivaran durante 5 días adicionales en medio de cultivo que comprendía péptido ACT 1 30 μ M (SEQ ID NO: 2), péptido de control no activo 30 μ M (SEQ ID NO: 55) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) que no contiene péptido ACT o péptido de control. El péptido de control no activo comprende un polipéptido con un extremo carboxilo terminal en el que la secuencia de péptido ACT se ha invertido. El extremo amino terminal de ACT y péptidos de control están ambos biotinilados, permitiendo la detección (es decir, el ensayo) de los péptidos en el citoplasma celular usando métodos bioquímicos o microscópicos convencionales basados en la alta afinidad de unión de estreptavidina a biotina.

Se cambiaron los medios de cultivo con péptidos o control de vehículo añadidos cada 24 horas durante el experimento. La figura 1a indica que el péptido ACT aumentó enormemente el grado de formación de uniones comunicantes Cx43 entre miocitos en relación con las condiciones de control (figura 1b y 1c). Tal como se muestra en la figura 4, este aumento en formación de uniones comunicantes Cx43 en respuesta a péptido ACT es compartida por varios tipos de células que expresan CX43.

Se hicieron crecer células NIH-3T3 a lo largo de 2-3 días hasta que formaron una monocapa casi confluyente sobre

una placa de cultivo tisular según protocolos convencionales y entonces se trató previamente la monocapa con péptido ACT 1 (SEQ ID NO: 2) durante 24 h, y “se lesionó con araño” con una punta de pipeta de p200. Se permitió posteriormente que la “lesión por araño” se repoblara durante 24 horas en presencia de péptido ACT 1 30 μ M (SEQ ID NO: 2) disuelto en los medios de cultivo (figura 2a, b) o en presencia de dos condiciones de control (figura 2c-f). En la primera condición de control, se permitió que las células “lesionadas con araño” se repoblaran durante 24 horas en presencia de un péptido de control no activo (como en la figura 1) disuelto en los medios de cultivo a una concentración de 30 μ M (figura 2c, d). En la segunda condición de control, se añadió solución salina tamponada con fosfato (PBS) a los medios de cultivo y se permitió que las células “lesionadas con araño” se repoblaran en presencia de esta disolución de control de vehículo que no contiene péptido ACT o péptido de control (figura 2e, f). La “lesión por araño” de células tratadas con péptido ACT permanece relativamente repoblada tras 24 horas (figura 2a), repoblando algunas células (flecha grande) el área dentro de los bordes de la “lesión por araño” inicial (es decir, dentro del área marcada mediante puntas de flecha negras pequeñas). Por el contrario, en las condiciones de control en (figura 2c, e), grandes números de células (flechas grandes) han repoblado el área dentro de la “lesión por araño” inicial. La repoblación de la “lesión por araño” se produce en parte por medio de migración de las células transformadas que se arrastran al área de la “lesión por araño”. Las figuras (figura 2b, d y f) muestran el inmunomarcado de antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) de células en la “lesión por araño” o en el borde de la lesión. Las células tratadas con péptido ACT (figura 2b) muestran sólo baja luminosidad lo que concuerda con el fondo y ausencia de proliferación. Sólo en las dos condiciones de control mostradas en la figuras (figura 2d, f), se observan células en proliferación marcadas de manera brillante (flechas blancas). Esto indica que el péptido ACT también ha reducido la proliferación de las células transformadas en este modelo celular experimental.

La figura 3a muestra el borde de la lesión de células de control tratadas con péptido no activo y péptido ACT al final del periodo de 24 horas. Se marcaron las células con faloidina fluorescente para ayudar a la visualización. Las células tratadas con péptido ACT muestran bajos niveles de repoblación del área de lesión por araño (flechas de doble cabeza blancas). La figura 3b muestra un gráfico de barras del % de área de células que repueblan la lesión por araño tras 24 horas. La reducción de células en el área lesionada en presencia de péptido ACT es drástica, con un valor de p de menos de 0,000001.

Las células WB-F344 son una línea celular epitelial de rata transformada derivada mediante tratamiento de células de hígado de rata aisladas con un agente que provoca cáncer (Tsao *et al.*, 1984; Hayashi *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2001). Se transfectaron las células WB-F344 con un constructo de plásmido de expresión de ADNc y se seleccionó con antibióticos usando protocolos convencionales para generar líneas celulares que expresan de manera estable un polinucleótido que codifica para el péptido ACT (SEQ ID NO: 6) operativamente unido a una secuencia de promotor o un polinucleótido de proteína fluorescente verde (GFP) operativamente unido a una secuencia de promotor como control. El polinucleótido que codifica el péptido ACT también codificó GFP. Como tal, la expresión del péptido ACT podía someterse a ensayo mediante óptica de fluorescencia de GFP convencional en un microscopio óptico. Las figuras 4a, b muestran imágenes de alto aumento de fluorescencia de GFP en líneas celulares de WB-F344 que expresan GFP solo (la figura 4a) o GFP más la secuencia de péptido ACT de extremo carboxilo terminal (figura 4a) o GFP solo (figura 4b). Se “lesionaron por araño” monocapas casi confluentes de las líneas celulares de WB-F344 y se permitió que se repoblaran durante 24 horas. De manera similar a los casos de control de las células NIH-3T3 tratadas con vehículo o péptido de control no activo, la línea celular epitelial de control que expresa GFP repobló la lesión por araño (figura 4c). Sin embargo, en la línea celular epitelial que expresó de manera estable el polinucleótido que codifica para el péptido ACT operativamente unido a una secuencia de promotor, se inhibió repoblación de la lesión por araño (figura 4d). Además de las líneas celulares de WB-F344, se han preparado líneas celulares de NIH-3T3 que expresan de manera estable un polinucleótido que codifica para el péptido ACT operativamente unido a un promotor.

Ejemplo 2: Cicatrización de heridas *in vivo*

Se desensibilizaron crías de ratón neonatos usando hipotermia. Se realizó una lesión cutánea incisional de 4 mm de largo se realizó usando un bisturí a través del grosor completo de la piel (descendiendo hasta el nivel del músculo subyacente) en la línea dorsal media entre los omóplatos. Entonces se aplicaron a las lesiones incisionales 30 μ l de una disolución de gel plurónico (F-127) al 20% que contenía o bien nada (control) o bien péptido ACT 1 disuelto (SEQ ID NO: 2) a una concentración de 60 μ M. El gel plurónico tiene propiedades tensioactivas leves que pueden ayudar en la dispersión uniforme del péptido ACT en micelas. De manera más importante, el gel plurónico al 20% permanece líquido a temperaturas por debajo de 15°C, pero se polimeriza a la temperatura corporal (37°C). Esta propiedad del gel plurónico probablemente ayudaba en la liberación controlada del péptido en el tejido en el sitio de la lesión incisional, protegiendo al péptido frente a la descomposición en el entorno rico en proteasas de la herida y también permitiendo que se mantengan concentraciones activas del péptido a lo largo de periodos prolongados. Se aplicó posteriormente el gel de control o que contenía péptido ACT 24 horas tras la aplicación inicial. No se realizó aplicación adicional de gel de control o que contenía péptido ACT tras la segunda aplicación. A las 48 horas puede observarse que la lesión tratada con péptido ACT (figura 5a) está significativamente más cerrada, menos inflamada, menos hinchada (se observan crestas en el borde la herida), y generalmente más cicatrizada en apariencia que la lesión de control que no recibió péptido ACT (figura 5b). Estas diferencias en inflamación, hinchazón y cicatrización entre el control y lesión tratada con péptido ACT y control persistían en los puntos de tiempo de 72 (figura 5c, d) y 96

(figura 5e, f) horas. A los 7 días, la herida con péptido ACT (figura 5g), tenía un aspecto más suave y con menos cicatrices que la lesión tratada con péptido de control (figura 5h). Obsérvese que las imágenes de la misma lesión sobre el mismo animal se muestran en puntos de tiempo diferentes durante el transcurso de tiempo de la cicatrización.

Los ratones adultos anestesiados tenían lesiones cutáneas excisionales circulares de 8 mm de ancho realizadas mediante unas tijeras quirúrgicas finas descendiendo hasta el músculo subyacente en la línea dorsal media entre los omóplatos (figura 6a, b). Se delimitó el límite de la lesión mediante un corte de molde circular de 8 mm de ancho en una lámina de plástico. Entonces se aplicaron a las lesiones excisionales 100 μ l de una disolución de gel plurónico al 30% que contenía o bien nada (control) o bien péptido ACT 1 disuelto (SEQ ID NO: 2) a una concentración de 100 μ M. Se aplicó posteriormente gel de control o que contenía péptido ACT 24 horas tras la aplicación inicial. No se realizaron aplicaciones adicionales de gel de control o que contenía péptido ACT tras la segunda aplicación. La lesión excisional grande tratada con péptido ACT (figura 6a, c, e, g, i) se cerró más rápido, estaba menos inflamada en apariencia, cicatrizó más rápido y con menos cicatrices que la lesión de control que no recibió péptido ACT (figura 6b, d, f, h, j) a lo largo del transcurso de tiempo de 14 días. De hecho, la lesión de control a los 14 días todavía muestra una costra parcial indicando que la cicatrización aguda de la lesión fue incompleta (figura 6j).

Se tomaron biopsias cutáneas del sitio de la herida completa de algunas de las 24 horas tras la lesión excisional. Se fijaron estas muestras cutáneas en paraformaldehído al 2%, se incrustaron en parafina, se cortaron y se tiñeron histoquímicamente con hematoxilina y eosina (H&E) usando protocolos convencionales. Las figuras 7a y 7b muestran vistas de estudio de bajo aumento de secciones transversales de cerca del centro de la herida de lesiones tratadas con ACT y de control, respectivamente. El borde de la herida (marcado mediante las flechas pequeñas), rodeado de piel de aspecto histológico normal, puede observarse en ambos casos. Se coloca un rectángulo negro sobre las imágenes en la figura 7a y 7b en el borde de la herida a mano izquierda. Las estructuras histológicas dentro del rectángulo negro colocado sobre los bordes de la herida a mano izquierda en la figuras 7a y 7b se muestran a más aumentos en la figura 7c y 7d para tejidos tratados con péptido ACT y de control, respectivamente. Es de interés un tejido de "tipo collar" de material fibroso alineado (con flecha) que se proyecta desde las partes basales de la lesión a o hacia la superficie exterior y borde de la herida de la lesión. El material fibroso sirve como un sustrato para la migración de células inflamatorias que se desplazan a la superficie de la lesión (Elder *et al.*, 1997). De manera interesante, el sustrato fibroso alineado tiene el aspecto de estar mucho más organizado en la lesión de control (figura 7d) que en la lesión tratada con péptido ACT (figura c). Además, existe una densidad considerablemente más baja de células inflamatorias que tachonan el sustrato fibroso en el tejido tratado con péptido ACT. Esto se confirma en (figura 7f) y (figura 7e) donde las regiones de sección histológica dentro de los rectángulos negros mostradas en (figura 7d) y (figura 7c) se muestran respectivamente a más aumentos. Las células inflamatorias que tachonan el sustrato fibroso alineado incluyen mastocitos, neutrófilos y macrófagos. Estas células inflamatorias aparecen a una densidad muy superior en la lesión de control que en la lesión tratada con péptido ACT.

Al final del periodo de 14 días, se tomaron biopsias cutáneas de la lesión excisional completa y se tiñeron histoquímicamente con H&E secciones histológicas de esas muestras cutáneas. Las figuras 8a y 8b muestran vistas de estudio de bajo aumento de secciones transversales de cerca del centro de la lesión de péptido ACT y control, respectivamente. El borde de la herida (marcado mediante flechas pequeñas), rodeado de piel de aspecto histológico normal, puede observarse en ambos casos. Se coloca un rectángulo negro sobre las imágenes en las figuras 8a y 8b cerca del centro de cada lesión. Las estructuras histológicas dentro de estos dos rectángulos se muestran a más aumentos en las figuras 8c y 8d los tejidos de péptido ACT y control, respectivamente. Es evidente que el tejido dentro del locus de la lesión tratada con péptido ACT tiene considerablemente más complejidad. En la superficie externa de la herida tratada con ACT, existe una capa continua de células epiteliales que indican que la reepitelización de la superficie lesionada es completa, mientras que el epitelio es aún relativamente delgado cerca del centro de la herida (figura 8c). De manera inusual, ya puede observarse regeneración de folículos pilosos diferenciándose de novo a partir de células madre en el nuevo epitelio que recubre la lesión cicatrizada (figura 8c, flechas pequeñas). En comparación, la reepitelización de la superficie de la lesión es incompleta y no hay ningún signo de regeneración de folículos pilosos en el epitelio de la lesión de control. Bajo el epitelio reformado de la piel lesionada tratada con péptido ACT, se observa una restauración considerable de la complejidad estructural normal, con estructuras glandulares, tejidos fibroso y conjuntivo, tejidos vasculares, miocitos y adipocitos en conjunto (figura 8a, c). Como con los folículos pilosos, esta complejidad tisular se regeneró mediante la diferenciación de células madre. Por el contrario, en la lesión de control el tejido de la herida está dominado completamente por un tapón uniforme y grande de tejido cicatricial fibroso (figura 8b, d), sin otra complejidad de estructura de tejido evidenciado particularmente dentro de este tejido cicatricial.

Los ratones adultos anestesiados tenían 2 heridas cutáneas excisionales pequeñas realizadas mediante unas tijeras quirúrgicas finas sobre el cuello y (parte superior) de la espalda. Se delimitaron los límites de las lesiones mediante un corte de molde circular de 5 mm de ancho en una lámina de plástico. Entonces se aplicaron a las lesiones excisionales 50-60 μ l de una disolución de gel plurónico al 30% que contenía o bien nada (control) o bien uno de los péptidos ACT (ACT 2 - SEQ ID NO: 1, ACT 1 - SEQ ID NO: 2, ACT 3 - SEQ ID NO: 3, ACT 4 - SEQ ID NO: 4, ACT 5 - SEQ ID NO: 5) disuelto en concentraciones de 100 μ M. Se aplicaron posteriormente geles de control que contenían péptido ACT 24 horas tras la aplicación inicial. No se realizaron tras la segunda aplicación aplicaciones adicionales

de gel de control y que contenía péptido ACT. Puede observarse en el caso de péptidos ACT 1 (figura 9e-h), ACT 2 (figura 9i-1), ACT 3 (figura 9m-p) y ACT 5 (figura 9u-x) que las lesiones excisionales se cerraron más rápidamente, estaban menos inflamadas en apariencia, cicatrizaron más rápido y con menos cicatrices que la lesión de control que no recibió péptido ACT (figura 9a-d) a lo largo del transcurso de tiempo de 240 horas (10 días). El péptido ACT 4 (figura 9q-t) también parecía mostrar una mejora modesta en la cicatrización con respecto al control durante el transcurso del tiempo. Obsérvese que la misma herida sobre el mismo animal se muestra en puntos de tiempo diferentes durante el transcurso de la cicatrización.

Se midió el área de herida abierta durante el transcurso del tiempo imagen de NIH según protocolos convencionales en múltiples ratones adultos (~5 ratones por condición de control o tratamiento). Entonces se normalizaron estas mediciones de áreas individuales a (es decir, se dividieron entre) el área promedio medida para las lesiones de control para un punto de tiempo dado, se multiplicaron por 100 para dar un % de herida no cerrada en relación con el control y luego se representaron gráficamente frente al tiempo. Se usó una prueba de la U de Mann-Whitney para evaluar estadísticamente los efectos de péptidos ACT a lo largo del transcurso del tiempo. Los péptidos ACT 1, ACT 2, ACT 3 y ACT 5 mejoraron significativamente las velocidades de cierre de heridas tras la lesión excisional. Estos tratamientos proporcionaron resultados con valores de p significativos. El ACT 1 y ACT 3 proporcionaron de manera cuantificable las mejoras más pronunciadas con respecto al control. También se observó una mejora más modesta, aunque constante, para el péptido ACT 4 con respecto al control.

Se colocaron ratas adultas anestesiadas en un aparato estereotáxico. Se realizó una incisión en la línea media con un bisturí para exponer el cráneo. Se ajustó un taladro estereotáxico 2 mm posterior al bregma y se perforaron 2 orificios con una broca esférica de 1 mm, cada uno a 2,5 mm a la derecha e izquierda del bregma, y 3,5 mm por debajo de la duramadre. Se realizó una lesión cerebral insertando una aguja de calibre 18. Se determinaron las coordenadas a partir del atlas de Paxinos y Watson (1986). Se insertó la membrana de fibra hueca (MFH) en el orificio y se colocaron suturas cutáneas externas para cubrir el corte. Se disolvió el péptido ACT a una concentración de 100 μ M en una disolución de vehículo de colágeno al 2% contenida dentro de la MFH. Estudios de MFH aisladas indicaron que estos constructos diseñados por ingeniería genética eran capaces de ralentizar la liberación de niveles detectables de péptido ACT (tal como se somete a ensayo mediante reacción de biotín-estreptavidina) en disoluciones acuosas durante periodos de al menos 7 días. La astrocitosis reactiva asociada con inflamación y posteriormente con formación de cicatriz glial sigue un transcurso de tiempo bien caracterizado tras la lesión de cerebro en modelos de roedor (Norenberg, 1994; Fawcett y Asher, 1999). Normalmente, la respuesta astrocítica en cerebro de rata es máxima tras una semana, junto con pérdida de neuronas y otros aspectos de la complejidad del tejido cerebral. Posteriormente, con el surgimiento de tejido cicatricial glial, la densidad de astrocitos positivos para GFAP disminuye. Las figuras 10b y 10c muestran vistas de estudio de bajo aumento de secciones del tejido cerebral (corteza) que rodea a implantes de MFH llenos con péptido ACT más gel de vehículo o gel de vehículo de colágeno de control o péptido ACT más gel de vehículo una semana tras la lesión de penetración cerebral. En el tejido de control (figura 10c), se observa una alta densidad de astrocitos positivos para GFAP inmunomarcados cerca del sitio de la lesión producida por la MFH. La densidad de estas células parece disminuir ligeramente de manera distal de la lesión. Por el contrario, se observa una densidad mucho más baja de astrocitos positivos para GFAP adyacentes a la MFH llena de péptido ACT (figura 10b). De hecho, los niveles de células positivas para GFAP no son diferentes de los observados en un tejido cerebral sin dañar normal. Las regiones de tejido dentro de los rectángulos blancos en las figuras 10b y 10c se muestran a más aumentos en las figuras 10d y 10e, respectivamente. En la lesión cerebral tratada mediante péptido ACT (figura 10d) puede observarse que los astrocitos positivos para GFAP no sólo son menos numerosos, sino que también son más pequeños que los observados en la lesión de control (figura 10e).

Las figuras 11a y 11b muestran vistas de estudio de bajo aumento de secciones del tejido cerebral (corteza) que rodea a implantes de MFH (el límite de implante o lesión se muestra mediante flechas) llenos de gel de vehículo de colágeno de control (figura 11b) o péptido ACT más gel de vehículo (figura 11a) 1 semana tras la lesión de penetración cerebral. En el tejido de control (figura 11b), se observan una alta densidad de astrocitos positivos para GFAP inmunomarcados y una baja densidad de neuronas inmunoetiquetadas con NeuN cerca del sitio de la lesión producida por la MFH. La densidad de estas células parece disminuir y aumentar distalmente de la MFH, respectivamente. Por el contrario, se observan una densidad mucho más baja de astrocitos positivos para GFAP y números superiores de neuronas inmunoetiquetadas con NeuN proximalmente (así como distalmente) a la MFH llena de péptido ACT (figura 11a). Las áreas en las figuras 11a y 11b proximales a las MFH se muestran en vistas de alto aumento en las figuras 11c y 11d, respectivamente. De nuevo, en el tejido de control (figura 11d) se observan un aumento notable en la densidad de astrocitos positivos para GFAP y una densidad reducida de neuronas positivas para NeuN en comparación con tejido tratado con péptido ACT (figura 11c). Se observa un patrón complementario cerca de la MFH que contiene péptido ACT, predominando neuronas positivas para NeuN sobre los astrocitos (figura 11c). De manera interesante, la vista de alto aumento mostrada en la figura 11d revela una alta frecuencia de neuronas en el proceso de fisión en relación con el control (figura 11c). Esto sugiere que la alta densidad de neuronas asociadas con tratamiento con péptido ACT puede deberse a la generación de nuevas neuronas. El péptido ACT también puede aumentar la densidad neuronal en parte impidiendo que las neuronas experimenten muerte celular tras la lesión de cerebro.

Ejemplo 3: Tratamiento de lesión de médula espinal aguda

Los sujetos con lesiones de médula espinal agudas representan un grupo gravemente problemático para los que incluso una pequeña recuperación neurológica de la función puede tener una influencia importante sobre su independencia posterior. En un ejemplo, un sujeto con lesión de médula espinal aguda recibe una infusión en bolo de una disolución de péptido ACT a del 0,02% al 0,1% (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) a lo largo de 15 min en el plazo de 8 h directamente en el sitio de lesión de médula espinal aguda, seguido 45 min más tarde por una infusión de disolución de péptido ACT al 0,01% durante de 23 a 48 horas posteriores. En otro ejemplo, se usa péptido ACT para recubrir nanopartículas de liberación lenta cargadas en el plazo de 8 h directamente en el sitio de lesión de médula espinal aguda o bioarmazones diseñados por ingeniería de tejidos diseñados para promover la reconexión neural a través de la zona de lesión de médula espinal aguda. La mejora en la función la evalúa un médico a intervalos (por ejemplo, 6, 12, 26 y 52 semanas) tras el tratamiento mediante pruebas de desenlace neurológico que incluyen evaluaciones diseñadas para medir la actividad motora, la sensibilidad cutánea a los pinchazos y la recuperación de la sensibilidad.

Ejemplo 4: Evaluación cuantitativa del cierre de heridas, la regeneración tisular y la resistencia a la tracción de heridas cutáneas excisionales

Se generaron heridas cutáneas excisionales de 5 mm de diámetro con péptido ACT (n = 12) y control (n = 8) en ratones adultos tal como se describió anteriormente. Entonces se emprendieron evaluaciones cuantitativas de la velocidad de cierre de heridas, recuentos de folículos pilosos regenerados y mediciones de la resistencia a la tracción sobre las heridas cutáneas a puntos de tiempo de hasta 90 días tras el ataque inicial. En relación con las heridas de control, el cierre se potenció significativamente en el plazo de 24 horas del tratamiento con péptido. De manera similar, a los 10 días, cuando la mayoría de las heridas estaban casi acabando de cerrarse, se mantenía todavía una diferencia altamente significativa de manera que las heridas tratadas con péptido ACT eran en promedio el 43% más pequeñas que las heridas de control. A los 10 días las heridas con péptido ACT mostraban un aumento de 3,2 veces significativo en el número de folículos pilosos regenerados por área unitaria de la herida cicatrizada con respecto a las heridas de control.

Se emprendieron estudios de las propiedades mecánicas de heridas excisionales de 5 mm de diámetro cicatrizadas a 1 mes y 3 meses tras la lesión. Para las mediciones de las propiedades mecánicas, se obtuvieron las muestras cutáneas tras sacrificar el animal y se evaluaron usando un instrumento MTS 858 Mini Bionix (MTS Systems Corporation, MN, EE.UU.) equipado con una célula de carga de 5 kg. Durante la medición se extendió la muestra cutánea hasta la rotura a una velocidad de 0,5 mm/s. Se midió la fuerza y extensión a la rotura. Se calcularon tal como sigue la resistencia a la tracción (tensión) y extensión a la rotura (deformación), $\text{tensión (N/mm}^2\text{)} = \text{fuerza a la rotura (N)} / \text{área de sección transversal de la muestra (mm}^2\text{)}$. $\text{Deformación (\%)} = [\text{aumento en la longitud a la rotura (mm)} / \text{longitud original (mm)}] \times 100$. Se normalizaron los cálculos de tensión y deformación para cada muestra cutánea con heridas a una muestra cutánea normal de un área cercana recogida del mismo animal.

1 mes después, la tensión (es decir, la fuerza normalizada) requerida para romper la piel con heridas era similar a la de la piel con heridas control. A los 3 meses, la tensión normalizada para romper la piel con heridas tratada con péptido era en promedio el doble que la de piel con heridas control, aunque la alta varianza dentro del grupo de tratamiento impidió una separación de las medias significativa con respecto al control. Este resultado demuestra que la resistencia a la tracción intrínseca de heridas tratadas con péptido era tan buena o mejor que la de heridas no tratadas. Además, se encontraron mejoras significativas en la extensibilidad de heridas tratadas con péptido. La cantidad de deformación (es decir, extensibilidad) requerida para romper heridas tratadas con péptido mejoró modestamente con respecto a las heridas de control 1 mes después. A los 3 meses, las heridas tratadas con péptido mostraron una mejora más notable, aumentando hasta un 90% casi normal de piel sin heridas. Por el contrario, las heridas de control a los 3 meses permanecían sólo el 60% tan extensibles como la piel normal.

Se entiende que el método y las composiciones divulgadas no se limitan a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir sólo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Debe indicarse que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un polipéptido” incluye una pluralidad de tales polipéptidos, la referencia a “el polipéptido” es una referencia a uno o más polipéptidos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

“Opcional” u “opcionalmente” significa que el acontecimiento, circunstancia o material descrito posteriormente puede producirse o no o estar presente o no, y que la descripción incluye casos en los que el acontecimiento, la circunstancia o el material se produce o está presente y casos en los que no se produce o no está presente.

Los intervalos pueden expresarse en el presente documento como desde “aproximadamente” un valor particular, y/o hasta “aproximadamente” otro valor particular. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, también se contempla específicamente y se considera divulgado el intervalo desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular a

menos que el contexto indique específicamente otra cosa. De manera similar, cuando se expresan valores como aproximaciones, mediante el uso del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización específicamente contemplada que debe considerarse divulgada a menos que el contexto indique específicamente otra cosa. Se entenderá además que los puntos de extremo de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto de extremo, como independientemente del otro punto de extremo a menos que el contexto indique específicamente otra cosa. Finalmente, debe entenderse que todos los valores individuales y subintervalos de valores contenidos dentro de un intervalo divulgado explícitamente se contemplan también específicamente y deben considerarse divulgados a menos que el contexto dicte específicamente otra cosa. Lo anterior se aplica independientemente de si en casos particulares algunas o todas de estas realizaciones se divulgan explícitamente.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenecen el método y las composiciones divulgadas. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas del presente método y las composiciones, los métodos, dispositivos y materiales particularmente útiles son tal como se describe.

Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a tal divulgación en virtud de invención previa. No se hace ninguna admisión de que cualquier referencia constituya técnica anterior. La discusión de referencias establece lo que sus autores afirman, y los solicitantes se reservan el derecho a cuestionar la exactitud y pertinencia de los citados documentos. Se entenderá claramente que, aunque se hace referencia a varias publicaciones en el presente documento, tal referencia no constituye una admisión de que cualquiera de estos documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica.

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, la palabra “comprenden” y variaciones de la palabra, tales como “que comprende” y “comprende”, significa “que incluye pero no se limita a” y no pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, número enteros o etapas.

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas del método y las composiciones descritas en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes se abarquen por las siguientes reivindicaciones.

E. Bibliografía

Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 30 de septiembre de 2003; 100 supl. 1:11830-5, 2003.

Barker RJ, Price RL, Gourdie RG. Increased association of ZO-1 with Connexin43 during remodeling of cardiac gap junctions. *Circ Res*. 22 de febrero; 90(3):317-24 (2002).

Bucci, M. *et al*. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat. Med*. 6, 1362-1367 (2000).

Chien KR. Stem cells: lost in translation. *Nature*. 8 de abril; 428(6983):607-608 (2004).

Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol.* 679-686 (2000).

Elmqvist, A., Lindgren, M., Bartfai, T. & Langel, U. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell Res*. 269, 237-244 (2001).

Elder D., Elenitsas R, Jawaorsky C, & Johnson B. *Lever's histopathology of the skin*. Lippincott-Raven Publishers, (1997).

Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 49:377-391 (1999).

Fischer, P.M. *et al*. Structure-activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin. *J. Pept. Res*. 55, 163-172 (2000).

Frankel, A. D. & Pabo, C. O. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55,1189-1193 (1988).

Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC. CCN3 (NOV) interacts with Connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of Connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem*. 27 de agosto; 279(35):36943-50 (2004).

- Gao, C. *et al.* A cell-penetrating peptide from a novel pVII-pIX phage-displayed random peptide library. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 4057-4065 (2002).
- 5 Giepmans BN. Gap junctions and Connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res.* 1 de mayo; 62(2):233-45 (2004).
Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Abril; 4(4):285-94 (2003).
- 10 Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55, 1179-1188 (1988).
Hayashi T, Matesic DF, Nomata K, Kang KS, Chang CC, Trosko JE. Stimulation of cell proliferation and inhibition of gap junctional intercellular communication by linoleic acid. *Cancer Lett.* 112:103-111 (1997).
- 15 Hayashi T, Nomata K, Chang CC, Ruch RJ, Trosko JE. Cooperative effects of v-myc and c-Ha-ras oncogenes on gap junctional intercellular communication and tumorigenicity in rat liver epithelial cells. *Cancer Lett.* 128:145-154 (1998).
- 20 Hayashi T, Trosko JE, Hamada K. Inhibition of gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells with transforming RNA. *FEBS Lett.* 491:200-206 (2001).
Hong, F. D. & Clayman, G. L. Isolation of a peptide for targeted drug delivery into human head and neck solid tumors. *Cancer Res.* 60, 6551-6556 (2000).
- 25 Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, Nurzynska D, Kasahara H, Zias E, Bonafe M, Nadal-Ginard B, Torella D, Nascimbene A, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res.* 7 de enero; 96(1):127-37 (2005).
- 30 Lin, Y. Z., Yao, S. Y., Veach, R. A., Torgerson, T. R. & Hawiger, J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* 270, 14255-14258 (1995).
- 35 Lundberg, P. *et al.* Cell membrane translocation of the N-terminal (1-28) part of the prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 85-90 (2002).
Matsushita M, Noguchi H, Lu YF, Tomizawa K, Michiue H, Li ST, Hirose K, Bonner-Weir S, Matsui H. Photo-acceleration of protein release from endosome in the protein transduction system. *FEBS Lett.* 13; 572(1-3):221-6. (2004).
- 40 Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. & Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature Biotechnol.* 19, 1173-1176 (2001).
Norenberg MD. Astrocyte responses to CNS injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:213-220 (1994).
- 45 Oehlke, J. *et al.* Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta.* 1414, 127-139 (1998).
Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S. & Kim, S. C. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 8245-8250 (2000).
- 50 Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2^a ed. San Diego, CA: Academic; 1986.
- 55 Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors *Annals of Oncology* 2004 15(9):1319-1329.
Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M. & Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12, 67-77 (1998).
- 60 Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science.* 13 de diciembre; 298(5601):2188-90 (2002).
Rousselle, C. *et al.* New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. *Mol. Pharmacol.* 57(4):679-86 (2000).
- 65 Sawada, M., Hayes, P. & Matsuyama, S. Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-

binding domain of Ku70. *Nature Cell Biol.* 5, 352-357 (2003).

Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* Febrero; 5(2):146-56 (2004).

5 Songyang, Z. *et al.* Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77 (1997).

Tsao MS, Smith JD, Nelson KG, Grisham JW. A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells. *Exp. Cell Res.* 154:38-52 (1984).

10 Vigneron, J.P. *et al.* Guanidinium-cholesterol cationic lipids: Efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 9682-9686 (1998).

15 Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med.* 10(3):310-5. (2004).

Ming Y.W. Chu^a, Milton H. Lipsky^a, Lorin K. Yee^{a,c}, John Epstein^a, Katharine A. Whartenby^a, Scott Freeman^e, Tian M. Chen^a, Edward Chu^{c,d}, Edwin N. Forman^b, Paul Calabresi^a Predictive Sensitivity of Human Cancer Cells *in vivo* Using Semipermeable Polysulfone Fibers *Pharmacology* 1998; 56:318-326.

20 Orlandini GC, Margaria R. Evaluation of the efficiency of a new hollow fiber plasmapheresis filter. *Int J Artif Organs.* Julio de 1983; 6 supl. 1:103-6.

25 Wilgus TA, Vodovotz Y, Vittadini E, Clubbs EA, Oberyshn TM. Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. *Wound Rep Reg* 2003; 11:25-34.

Yoo DS. The dielectric properties of cancerous tissues in a nude mouse xenograft model. *Bioelectromagnetics.* Octubre de 2004; 25(7):492-7.

30 **Secuencias**

SEQ ID NO: 1 (ACT 2)

PSSRASSRASSRPRPDDLEI

35 SEQ ID NO: 2 (ACT 1)

RPRPDDLEI

40 SEQ ID NO: 3 (ACT 3)

RPRPDDLEV

45 SEQ ID NO: 4 (ACT 4)

RPRPDDVPV

SEQ ID NO: 5 (ACT 5)

50 KARSDDLVS

SEQ ID NO: 6

aga cct cgg cct gat gac ctg gag att

55 SEQ ID NO: 7 (Antp)

RQPKIWFPNRRKPWKK

60 SEQ ID NO: 8 (Antp/ ACT 2)

RQPKIWFPNRRKPWKKPSSRASSRASSRPRPDDLEI

SEQ ID NO: 9 (Antp/ACT 1)

65 RQPKIWFPNRRKPWKKRPRPDDLEI

SEQ ID NO: 10 (Antp/ACT 3)
 5 RQPKIWFPNRRKPWKKRPRPDDLEV
 SEQ ID NO: 11 (Antp/ACT4)
 RQPKIWFPNRRKPWKKRPRPDDVPV
 10 SEQ ID NO: 12 (Antp/ACT 5)
 RQPKIWFPNRRKPWKKKARSDDLVS
 SEQ ID NO: 13 (codifica para el polipéptido de SEQ ID NO 9)
 15 cgg cag ccc aag atc tgg ttc ccc aac cgg cgg aag ccc tgg aag aag cgg ccc ggc ccg acg acc tgg aga
 tc
 SEQ ID NO: 14 (VIH-Tat)
 20 GRKKRRQRPPQ
 SEQ ID NO: 15 (penetratina)
 RQIKIWFQNRRMKWKK
 25 SEQ ID NO: 16 (Antp-3A)
 RQIAIWFQNRRMKWAA
 30 SEQ ID NO: 17 (Tat)
 RKKRRQRRR
 SEQ ID NO: 18 (buforina II)
 35 TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK
 SEQ ID NO: 19 (transportano)
 40 GWTLSAGILLGKINKALAALAKKIL
 SEQ ID NO: 20 (péptido anfipático modelo)
 KLALKLALKALKAALKLA
 45 SEQ ID NO: 21 (K-FGF)
 AAVALLPAVLLALLAP
 50 SEQ ID NO: 22 (Ku70)
 VPMLK-PMLKE
 SEQ ID NO: 23 (prión)
 55 MANLGWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP
 SEQ ID NO: 24 (pVEC)
 60 LLILRRRIRKQAHAAHSK
 SEQ ID NO: 25 (Pep-1)
 KETWWETWWTEWSQPKKRKV

SEQ ID NO: 26 (SynB1)
 5 RGGRLSYSRRRFSTSTGR
 SEQ ID NO: 27 (Pep-7)
 SDLWEMMMVSLACQY
 10 SEQ ID NO: 28 (HN-1)
 TSPLNIHNGQKL
 SEQ ID NO: 29 (ACT de Cx43 alfa de pollo)
 15 PSRASSRASSRPRPDDLEI
 SEQ ID NO: 30 (Cx45 alfa humana)
 20 GSNKSTASSKSPDPKNSVWI
 SEQ ID NO: 31 (Cx45 alfa de pollo)
 GSNKSSASSKSGDGKNSVWI
 25 SEQ ID: 32 (Cx46 alfa humana)
 GRASKASRASSGRARPEDLAI
 30 SEQ ID: 33 (Cx46.6 alfa humana)
 GSASSRDGKTWWI
 SEQ ID NO: 34 (Cx36 alfa de chimpancé)
 35 PRVSVPNFGRTQSSDSAYV
 SEQ ID NO: 35 (Cx36 alfa de pollo)
 40 PRMSMPNFGRTQSSDSAYV
 SEQ ID NO: 36 (Cx47 alfa humana)
 PRAGSEKGSASSRDGKTTWWI
 45 SEQ ID NO: 37 (Cx40 alfa humana)
 GYHSDKRRLSKASSKARSDDLVS
 50 SEQ ID NO: 38 (Cx50 alfa humana)
 PLSRLSKASSRARSDDLTV
 SEQ ID NO: 39 (Cx59 alfa humana)
 55 PNHVVSLTNNLIGRRVPTDLQI
 SEQ ID NO: 40 (Cx33 alfa de rata)
 60 PSCVSSSAVLTTICSSDQWPVGLSSFYM
 SEQ ID NO: 41 (Cx44 alfa de oveja)
 GRSSKASKSSGGRARAADLAI
 65 SEQ ID NO: 42 (Cx26 beta humana)

LCILLIRYCSGKSKKPV

SEQ ID: 43 (Cx37 alfa humana)

5 G QK PP SRPS SSAS K KQ*YV

SEQ ID 44: (variante de Cx43 conservativa)

10 SSRASSRASSRPRPDDLEV

SEQ ID 45: (variante de Cx43 conservativa)

RPKPDDLEI,

15 SEQ ID 46: (variante de Cx43 conservativa)

SSRASSRASSRPKPDDLEI,

20 SEQ ID 47: (variante de Cx43 conservativa)

RPKPDDLDI

SEQ ID 48: (variante de Cx43 conservativa)

25 SSRASSRASSRPRPDDLDI

SEQ ID 49: (variante de Cx43 conservativa)

30 SSRASTRASSRPRPDDLEI

SEQ ID 50: (variante de Cx43 conservativa)

RPRPEDLEI

35 SEQ ID 51: (variante de Cx43 conservativa)

SSRASSRASSRPRPEDLEI,

40 SEQ ID 52: (variante de Cx45 conservativa)

GDGKNSVWV

SEQ ID 53: (variante de Cx45 conservativa)

45 SKAGSNKSTASSKSGDGKNSWV

SEQ ID 54: (variante de Cx37 conservativa)

50 GQKPPSRPSSSASKKLYV

SEQ ID NO: 55 (péptido de control no activo)

RQPKIWFNRRKPWKIELDDPRPR

55 SEQ ID NO: 56 (VIH-Tat/ACT 1)

GRKKRRQRPPQ RPRPDDLEI

60 SEQ ID NO: 57 (penetratina/ACT 1)

RQIKIWFQNRRMKWKK RPRPDDLEI

SEQ ID NO: 58 (Antp-3A/ACT 1)

65 RQIAIWFQNRRMKWAA RPRPDDLEI

SEQ ID NO: 59 (Tat/ACT 1)
 RKKRRQRRR RPRPDDLEI
 5
 SEQ ID NO: 60 (buforina II/ACT 1)
 TRSSRAGLQFPVGRVHLLRK RPRPDDLEI
 10
 SEQ ID NO: 61 (transportano/ACT 1)
 GWTLNSAGILLGKINKALAALAKKIL RPRPDDLEI
 15
 SEQ ID NO: 62 (MAP/ACT 1)
 KLALKLALKALKAALKLA RPRPDDLEI
 SEQ ID NO: 63 (K-FGF/ACT 1)
 20
 AAVALLPAVLLALLAP RPRPDDLEI
 SEQ ID NO: 64 (Ku70/ACT 1)
 VPMLKPMLKE RPRPDDLEI
 25
 SEQ ID NO: 65 (prión/ACT 1)
 MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP RPRPDDLEI
 30
 SEQ ID NO: 66 (pVEC/ACT 1)
 LLILRRRIRKQAHASK RPRPDDLEI
 SEQ ID NO: 67 (Pep-1/ACT 1)
 35
 KETWWETWWTEWSQPKKKRKV RPRPDDLEI
 SEQ ID NO: 68 (SynB1/ACT 1)
 40
 RGGRLSYSRRRFSTSTGR RPRPDDLEI
 SEQ ID NO: 69 (Pep-7/ACT 1)
 SDLWEMMMVSLACQY RPRPDDLEI
 45
 SEQ ID NO: 70 (HN-1/ACT 1)
 TSPLNIHNGQKL RPRPDDLEI
 50
 SEQ ID NO: 72 (residuos 20 a 120 que flanquean al aminoácido 363 de Cx43 humana)
KGKSDPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFNGCSSPTAPLSPMSPPGYKLVT
GDRNNSSCRNYNKQASEQNWANYSAEQNRMGQAGSTISNSHAQPFDFPDD
NQNSKKLAAGHELQPLAIVD
 SEQ ID NO: 73 (residuos 20 a 120 que flanquean al aminoácido 362 de Cx43 de pollo)
 55
KTDPYSHSGTMSPSKDCGSPKYAYYNGCSSPTAPLSPMSPPGYKLVTGDRNNSSCRNYNKQAS
EQNWANYSAEQNRMGQAGSTISNSHAQPFDFADEHQNTKKLASGHHELQPLTIVDQRP
 SEQ ID NO: 74 (residuos 20 a 120 que flanquean al aminoácido 377 de Cx45 humana)
 60
LGFGTIRDSLNSKRRELEDPGAYNYPFTWNTSPAPPGYNIAPKPDQIQYTELSNAKIAYKQNKANT
AQEQQYGSHEENLPADLEALQREIRMAQERLDLAVQAYSHQNNPHGPREKKAKV

SEQ ID NO: 75 (residuos 20 a 120 que flanquean al aminoácido 375 de Cx45 de pollo)

GFGTIRDTLNNKRKELED SGTYNYPFTWNTPSAPPGYNI AVKPDQM QYTELSNAKMAYKQNKANI
AQEQQYGSNEENIPADLENLQREIKVAQERLDMAIQAYNNQNNPGSSSREKKSKA.

SEQ ID NO: 76 (residuos 20 a 120 que flanquean al aminoácido 313 de Cx37 humana)

PYLVDCFVSRPTEKTIFIFMLVVGLISLVLNLELVHLLCRCLSRGMRARQGQDAPPTQGTSSDPY
TDQVFFYLPVGQGPSSPPCPTYNGLSSSEQNWANLTTEERLASSRPPLFLDPP

SEQ ID NO: 77 (residuos 20 a 120 que flanquean al aminoácido 258 de Cx33 de rata)

CGSKEHGNRKMGRGRLLLTYMASIFFKSVFEVAFLLIQWYLYGFTLSAVYICEQSPCPRVDCFLSR
PTEKTIFILFMLVSMVSVFLNVIELFYVLFKAIKNHLGNEKEEVYCNPVDELQK.

SEQ ID NO: 78 (proteína fluorescente verde potenciada)

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICT
TGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF
FKDDGNYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHN
VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNH
YLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

SEQ ID NO: 79 (ACT 2)

CCCTCCTCCCGGGCCTCCTCCCGGGCCTCCTCCCGGCCCGGCCCGAC GACCTGGAGATC

SEQ ID NO: 80 (ACT1)

CGGCCCGGCCCGACGACCTGGAGATC

SEQ ID NO: 81 (ACT 3)

CGGCCCGGCCCGACGACCTGGAGGTG

SEQ ID NO: 82 (ACT 4)

CGGCCCGGCCCGACGACGTGCCCCGTG

SEQ ID NO: 83 (ACT 5)

AAGGCCCGGTCCGACGACCTGTCCGTG

SEQ ID NO: 84 (Antp)

CGGCAGCCCAAGATCTGGTTCCCCAACCGGCGGAAGCCCTGGAAG AAG

SEQ ID NO: 85 (Antp/ACT 2)

CGGCAGCCCAAGATCTGGTTCCCCAACCGGCGGAAGCCCTGGAAG
AAGCCCTCCTCCCGGGCCTCCTCCCGGGCCTCCTCCCGGCCCGGCCCGGCCCG
GACGACCTGGAGATC

SEQ ID NO: 86 (Antp/ACT 1)

CGGCAGCCCAAGATCTGGTTCCCCAACCGGCGGAAGCCCTGGAAGAAGCGGCCCGGCCCG
GACGACCTGGAGATC

SEQ ID NO: 87 (Antp/ ACT 3)

CGGCAGCCCAAGATCTGGTTCCCCAACCGGCGGAAGCCCTGGAAGAAGCGGCCCCGGCCC
GACGACCTGGAGGTG

SEQ ID NO: 88 (Antp/ ACT 4)

CGGCAGCCCAAGATCTGGTTCCCCAACCGGCGGAAGCCCTGGAAGAAGCGGCCCCGGCCC
GACGACGTGCCCGTG

SEQ ID NO: 89 (Antp/ ACT 5)

CGGCAGCCCAAGATCTGGTTCCCCAACCGGCGGAAGCCCTGGAAGAAGAAGGCCCGGTCC
GACGACCTGTCCGTG

SEQ ID NO: 90 (Cx43 alfa de pez cebra)

PCSRASSRMSSRARPDLDV

SEQ ID NO: 91 (Cx36 alfa de pollo)

PRVSVPNFGRTQSSDSAYV

La presente invención se refiere a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y opcionalmente una secuencia o transportador de internalización celular para su uso en un método de tratamiento, en el que el polipéptido se recubre sobre un implante médico o material de tratamiento de heridas.

También se divulga en el presente documento la siguiente materia:

Divulgación adicional.

1. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos carboxilo terminal de una conexina alfa, o una variante conservativa del mismo, en el que el polipéptido no comprende la proteína conexina alfa de longitud completa.

2. El polipéptido de la realización 1, en el que el polipéptido comprende 4 hasta 30 aminoácidos contiguos del extremo carboxilo terminal de la conexina alfa.

3. El polipéptido de la realización 1, en el que el polipéptido comprende:

(a) un motivo de unión de PDZ de tipo II al extremo carboxilo terminal;

(b) un motivo de bisagra proximal al motivo de unión de PDZ, que comprende residuos de prolina, glicina, o prolina y glicina; y

(c) residuos cargados positivamente (K, R, D, E) proximales a los residuos de bisagra.

4. El polipéptido de la realización 1, en el que la conexina alfa se selecciona de un grupo que consiste en conexina 39, conexina 40.1, conexina 47, conexina 46.6, conexina 30.2, conexina 31.9, conexina 44, conexina 33, conexina 36, conexina 35, conexina 37, conexina 39, conexina 39.9, conexina 40, conexina 42 de pollo, conexina 45.6, conexina 43, conexina 43.4, conexina 44.2, conexina 44.1, humana, conexina 45.6, conexina 46, conexina 56, conexina 49, conexina 50.

5. El polipéptido de la realización 1, en el que tras la lesión tisular el polipéptido reduce la inflamación, promueve la cicatrización, reduce la formación de cicatrices, aumenta la resistencia a la tracción y promueve la regeneración tisular compleja.

6. El polipéptido de la realización 1, en el que el polipéptido inhibe la unión de una proteína complejante de conexina al extremo carboxilo terminal de una conexina alfa, en el que la proteína complejante de conexina es ZO-1 o proteína sobreexpresada de nefroblastoma (NOV).

7. El polipéptido de la realización 4, en el que la conexina alfa es Cx43.

8. El polipéptido de la realización 7, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

9. El polipéptido de la realización 2, en el que el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido conservativa

dentro de los aminoácidos 4 a 30 del extremo carboxilo terminal de la conexina alfa.

10. El polipéptido de la realización 9, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 65% con SEQ ID NO: 1.

11. El polipéptido de la realización 9, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

12. El polipéptido de la realización 4, en el que la conexina alfa es Cx40.

13. El polipéptido de la realización 12, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

14. El polipéptido de la realización 15, que comprende además una secuencia de internalización celular.

15. El polipéptido de la realización 14, en el que la internalización celular comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína seleccionada de un grupo que consiste en Antennapedia, TAT, VIH-Tat, penetratina, Antp-3A (mutante de Antp), buforina II, transportano, MAP (péptido anfipático modelo), K-FGF, Ku70, prión, pVEC, Pep-1, SynB1, Pep-7, HNI, BGSC (bis-guanidinio-espermidina-colesterol) y BGTC (bis-guanidinio-tren-colesterol).

16. El polipéptido de la realización 15, en el que la secuencia de aminoácidos es de Antennapedia y comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

17. El polipéptido de la realización 16, que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

18. Un ácido nucleico aislado que codifica para el polipéptido de la realización 1.

19. El ácido nucleico aislado de la realización 18, en el que el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

20. El ácido nucleico aislado de la realización 19, que comprende la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 6.

21. Un ácido nucleico aislado que codifica para el polipéptido de la realización 15.

22. El ácido nucleico aislado de la realización 21, en el que el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12.

23. El ácido nucleico aislado de la realización 22, que comprende la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 13.

24. El ácido nucleico aislado de la realización 19 ó 22, en el que el ácido nucleico está operativamente unido a una secuencia de control de la expresión.

25. Un vector que comprende el ácido nucleico de la realización 19 ó 22 operativamente unido a una secuencia de control de la expresión.

26. El vector de la realización 25, en el que el vector es un virus.

27. Una célula que comprende el ácido nucleico de la realización 19 ó 22.

28. Una célula que comprende el vector de la realización 25.

29. Un organismo que comprende el ácido nucleico de la realización 19 ó 22.

30. Un organismo que comprende el vector de la realización 25.

31. Una composición que comprende el polipéptido de la realización 1 ó 14 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

32. Una composición que comprende el ácido nucleico de realización 19 ó 22 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

33. Un método de promoción de la cicatrización tras lesión tisular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de la realización 31 ó 32.

34. Un método de reducción de la formación de tejido cicatricial tras lesión tisular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de la realización 31 ó 32.
- 5 35. Un método de promoción de la regeneración tisular tras lesión tisular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de la realización 31 ó 32.
36. Un método de aumento de la resistencia a la tracción tras lesión tisular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de la realización 31 ó 32.
- 10 37. Un método de potenciación de la diferenciación de células madre tras lesión tisular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de la realización 31 ó 32.
- 15 38. Un método de reducción de la inflamación en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de la realización 31 ó 32.
39. Un método de reducción de la formación de tejido fibrótico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de la realización 31 ó 32.
- 20 40. Un método de inhibición de la proliferación de una célula transformada en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de la realización 31 ó 32.
41. Un método de inhibición de la migración metastásica de una célula transformada en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de la realización 31 ó 32.
- 25 42. El método de una cualquiera de las realizaciones 33-37, en el que la lesión tisular resulta de un grupo que consiste en una raspadura, corte, herida de laceración, herida de aplastamiento, herida de compresión, herida de estiramiento, herida de mordedura, raspón, herida de bala, lesión de explosión, perforación corporal, herida de puñalada, herida de quemadura, quemadura por viento, quemadura solar, quemadura química, herida quirúrgica, intervención quirúrgica, intervención médica, rechazo del huésped tras injerto de célula, tejido u órgano, efecto farmacéutico, efecto secundario farmacéutico, úlcera de decúbito, lesión por radiación, herida cutánea cosmética, lesión de órganos internos, proceso de enfermedad (por ejemplo, asma, cáncer), infección, agente infeccioso, proceso de desarrollo, proceso de maduración (por ejemplo, acné), anomalía genética, anomalía del desarrollo, toxina ambiental, alérgeno, lesión en el cuero cabelludo, lesión facial, lesión en la mandíbula, lesión en el pie, lesión en los dedos del pie, lesión en los dedos de la mano, lesión ósea, lesión en los órganos sexuales, lesión articular, lesión en los órganos excretorios, lesión ocular, lesión corneal, lesión muscular, lesión en el tejido adiposo, lesión pulmonar, lesión en las vías respiratorias, hernia, lesión anal, hemorroides, lesión en el oído, lesión en la retina, lesión cutánea, lesión abdominal, lesión en los brazos, lesión en las piernas, lesión atlética, lesión en la espalda, lesión de nacimiento, lesión de nacimiento prematuro, mordedura tóxica, picadura, lesión en los tendones, lesión en los ligamentos, lesión cardíaca, lesión en las válvulas cardíacas, lesión en el sistema vascular, lesión en el cartílago, lesión en el sistema linfático, traumatismo craneoencefálico, dislocación, perforación esofágica, fístula, lesión en las uñas, cuerpo extraño, fractura, congelación, lesión en las manos, trastorno de estrés térmico, laceración, lesión en el cuello, automutilación, choque, lesión de tejidos blandos traumática, lesión en la médula espinal, lesión espinal, esguince, distensión, lesión en los tendones, lesión en los ligamentos, lesión en el cartílago, lesión torácica, lesión en los dientes, traumatismo, lesión en el sistema nervioso, envejecimiento, aneurisma, accidente cerebrovascular, lesión en el tracto digestivo, infarto y lesión isquémica.
- 45

Listado de secuencias

- <110> MUSC Foundation for Research Development
- 5 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA PROMOVER LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS Y LA REGENERACIÓN TISULAR
- <130> 144 610
- 10 <150> Documento US 60/638.366
<151> 21-12-2004
- <150> Documento US 60/671.796
<151> 15-04-2005
- 15 <160> 90
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- 20 <210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético
- <400> 1
Pro Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp
1 5 10 15
Asp Leu Glu Ile
20
- 30 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético
- <400> 2
Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
1 5
- 40 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético
- 50 <400> 3
Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Val
1 5
- <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético
- 60

<400> 4
 Arg Pro Arg Pro Asp Asp Val Pro Val
 1 5

5 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 5
 Lys Ala Arg Ser Asp Asp Leu Ser Val
 1 5

15 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

25 <400> 6
 agacctgggc ctgatgacct ggagatt 27

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

35 <400> 7
 Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

45 <400> 8
 Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 Pro Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp
 20 25 30
 Asp Leu Glu Ile
 35

50 <210> 9
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 9

Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Lys
1 5 10 15
Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
20 25

<210> 10
<211> 25
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

10 <400> 10
Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Lys
1 5 10 15
Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Val
20 25

<210> 11
15 <211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 11
Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Lys
1 5 10 15
Arg Pro Arg Pro Asp Asp Val Pro Val
20 25

25 <210> 12
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 12
Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Lys
1 5 10 15
Lys Ala Arg Ser Asp Asp Leu Ser Val
20 25

35 <210> 13
<211> 74
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 13
cggcagccca agatctggtt cccaaccgg cggaagccct ggaagaagcg gcccggcccg
45 acgacctgga gatc 60
74

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 14
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Pro Pro Gln
 1 5 10

5 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 15
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

15 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

25 <400> 16
 Arg Gln Ile Ala Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Ala Ala
 1 5 10 15

30 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 17
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5

40 <210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 18
 Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
 1 5 10 15
 Arg Leu Leu Arg Lys
 20

50 <210> 19
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = Constructo sintético

<400> 19
 Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 20 25

5 <210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 20
 Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ala

15 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 21
 Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

25 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 22
 Val Pro Met Leu Lys Pro Met Leu Lys Glu
 1 5 10

35 <210> 23
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

45 <400> 23
 Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
 1 5 10 15
 Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro
 20 25

50 <210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 24
 Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
 1 5 10 15
 Ser Lys

5 <210> 25
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 25
 Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Lys Val
 20

15 <210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 26
 Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
 1 5 10 15
 Gly Arg

25 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

35 <400> 27
 Ser Asp Leu Trp Glu Met Met Met Val Ser Leu Ala Cys Gln Tyr
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 12
 <212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

45 <400> 28
 Thr Ser Pro Leu Asn Ile His Asn Gly Gln Lys Leu
 1 5 10

50 <210> 29
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 29
Pro Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp Asp
1 5 10 15
Leu Glu Ile

5 <210> 30
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 30
Gly Ser Asn Lys Ser Thr Ala Ser Ser Lys Ser Pro Asp Pro Lys Asn
1 5 10 15
Ser Val Trp Ile
20

15 <210> 31
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

25 <400> 31
Gly Ser Asn Lys Ser Ser Ala Ser Ser Lys Ser Gly Asp Gly Lys Asn
1 5 10 15
Ser Val Trp Ile
20

30 <210> 32
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 32
Gly Arg Ala Ser Lys Ala Ser Arg Ala Ser Ser Gly Arg Ala Arg Pro
1 5 10 15
Glu Asp Leu Ala Ile
20

40 <210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 33
Gly Ser Ala Ser Ser Arg Asp Gly Lys Thr Val Trp Ile
1 5 10

50 <210> 34
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

5 <400> 34
Pro Arg Val Ser Val Pro Asn Phe Gly Arg Thr Gln Ser Ser Asp Ser
1 5 10 15
Ala Tyr Val

<210> 35
<211> 19
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

15 <400> 35
Pro Arg Met Ser Met Pro Asn Phe Gly Arg Thr Gln Ser Ser Asp Ser
1 5 10 15
Ala Tyr Val

<210> 36
20 <211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 36
Pro Arg Ala Gly Ser Glu Lys Gly Ser Ala Ser Ser Arg Asp Gly Lys
1 5 10 15
Thr Thr Val Trp Ile
20

30 <210> 37
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 37
Gly Tyr His Ser Asp Lys Arg Arg Leu Ser Lys Ala Ser Ser Lys Ala
1 5 10 15
Arg Ser Asp Asp Leu Ser Val
20

40 <210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 38
Pro Leu Ser Arg Leu Ser Lys Ala Ser Ser Arg Ala Arg Ser Asp Asp
1 5 10 15
Leu Thr Val

50 <210> 39

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 39
 Pro Asn His Val Val Ser Leu Thr Asn Asn Leu Ile Gly Arg Arg Val
 1 5 10 15
 Pro Thr Asp Leu Gln Ile
 20

10 <210> 40
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 40
 Pro Ser Cys Val Ser Ser Ser Ala Val Leu Thr Thr Ile Cys Ser Ser
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Val Pro Val Gly Leu Ser Ser Phe Tyr Met
 20 25

20 <210> 41
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

30 <400> 41
 Gly Arg Ser Ser Lys Ala Ser Lys Ser Ser Gly Gly Arg Ala Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala Asp Leu Ala Ile
 20

35 <210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 42
 Leu Cys Tyr Leu Leu Ile Arg Tyr Cys Ser Gly Lys Ser Lys Lys Pro
 1 5 10 15
 Val

45 <210> 43
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 43

Gly Gln Lys Pro Pro Ser Arg Pro Ser Ser Ser Ala Ser Lys Lys Gln
 1 5 10 15
 Tyr Val

<210> 44

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 44

Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp Asp
 1 5 10 15
 Leu Glu Val

<210> 45

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 45

Arg Pro Lys Pro Asp Asp Leu Glu Ile
 1 5

25 <210> 46

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 46

Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Lys Pro Asp Asp
 1 5 10 15
 Leu Glu Ile

35 <210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 47

Arg Pro Lys Pro Asp Asp Leu Asp Ile
 1 5

45 <210> 48

<211> 19

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 48
 Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp Asp
 1 5 10 15
 Leu Asp Ile

 5 <210> 49
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

 <400> 49
 Ser Ser Arg Ala Ser Thr Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp Asp
 1 5 10 15
 Leu Glu Ile

 15 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

 <400> 50
 Arg Pro Arg Pro Glu Asp Leu Glu Ile
 1 5
 25 <210> 51
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

 <400> 51
 Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Glu Asp
 1 5 10 15
 35 Leu Glu Ile

 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

 45 <400> 52
 Gly Asp Gly Lys Asn Ser Val Trp Val
 1 5

 <210> 53
 <211> 23
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético
 55 <400> 53

Ser Lys Ala Gly Ser Asn Lys Ser Thr Ala Ser Ser Lys Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Gly Lys Asn Ser Val Trp Val
 20

<210> 54

<211> 18

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 54

Gly Gln Lys Pro Pro Ser Arg Pro Ser Ser Ser Ala Ser Lys Lys Leu
 1 5 10 15
 Tyr Val

<210> 55

15 <211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 55

Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Ile
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Asp Pro Arg Pro Arg
 20

25 <210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = Constructo sintético

<400> 56

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Pro Pro Gln Arg Pro Arg Pro Asp
 1 5 10 15
 Asp Leu Glu Ile
 20

35

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

45 <400> 57

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
 20 25

<210> 58

<211> 25

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

5 <400> 58
 Arg Gln Ile Ala Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Ala Ala
 1 5 10 15
 Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
 20 25

<210> 59
 <211> 18
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

15 <400> 59
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu
 1 5 10 15
 Glu Ile

<210> 60
 20 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 60
 Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
 1 5 10 15
 Arg Leu Leu Arg Lys Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
 20 25 30

30 <210> 61
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 61
 Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu Arg Pro Arg Pro Asp Asp
 20 25 30
 Leu Glu Ile
 35

40 <210> 62
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 62

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ala Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
 20 25

<210> 63
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 63
 Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15
 Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
 20 25

<210> 64
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 64
 Val Pro Met Leu Lys Pro Met Leu Lys Glu Arg Pro Arg Pro Asp Asp
 1 5 10 15
 Leu Glu Ile

<210> 65
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 65
 Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
 1 5 10 15
 Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Arg Pro Arg Pro
 20 25 30
 Asp Asp Leu Glu Ile
 35

<210> 66
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 66
 Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
 1 5 10 15
 Ser Lys Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
 20 25

<210> 67
 <211> 30

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 67

```
Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1           5           10           15
Lys Lys Arg Lys Val Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
          20           25           30
```

<210> 68

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 68

```
Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
 1           5           10           15
Gly Arg Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
          20           25
```

<210> 69

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 69

```
Ser Asp Leu Trp Glu Met Met Met Val Ser Leu Ala Cys Gln Tyr Arg
 1           5           10           15
Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
          20
```

<210> 70

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 70

```
Thr Ser Pro Leu Asn Ile His Asn Gly Gln Lys Leu Arg Pro Arg Pro
 1           5           10           15
Asp Asp Leu Glu Ile
          20
```

<210> 71

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 71

Lys Gly Lys Ser Asp Pro Tyr His Ala Thr Ser Gly Ala Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Lys Asp Cys Gly Ser Gln Lys Tyr Ala Tyr Phe Asn Gly Cys Ser
 20 25 30
 Ser Pro Thr Ala Pro Leu Ser Pro Met Ser Pro Pro Gly Tyr Lys Leu
 35 40 45
 Val Thr Gly Asp Arg Asn Asn Ser Ser Cys Arg Asn Tyr Asn Lys Gln
 50 55 60
 Ala Ser Glu Gln Asn Trp Ala Asn Tyr Ser Ala Glu Gln Asn Arg Met
 65 70 75 80
 Gly Gln Ala Gly Ser Thr Ile Ser Asn Ser His Ala Gln Pro Phe Asp
 85 90 95
 Phe Pro Asp Asp Asn Gln Asn Ser Lys Lys Leu Ala Ala Gly His Glu
 100 105 110
 Leu Gln Pro Leu Ala Ile Val Asp
 115 120

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 72

Lys Thr Asp Pro Tyr Ser His Ser Gly Thr Met Ser Pro Ser Lys Asp
 1 5 10 15
 Cys Gly Ser Pro Lys Tyr Ala Tyr Tyr Asn Gly Cys Ser Ser Pro Thr
 20 25 30
 Ala Pro Leu Ser Pro Met Ser Pro Pro Gly Tyr Lys Leu Val Thr Gly
 35 40 45
 Asp Arg Asn Asn Ser Ser Cys Arg Asn Tyr Asn Lys Gln Ala Ser Glu
 50 55 60
 Gln Asn Trp Ala Asn Tyr Ser Ala Glu Gln Asn Arg Met Gly Gln Ala
 65 70 75 80
 Gly Ser Thr Ile Ser Asn Ser His Ala Gln Pro Phe Asp Phe Ala Asp
 85 90 95
 Glu His Gln Asn Thr Lys Lys Leu Ala Ser Gly His Glu Leu Gln Pro
 100 105 110
 Leu Thr Ile Val Asp Gln Arg Pro
 115 120

<210> 73

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 73

Leu Gly Phe Gly Thr Ile Arg Asp Ser Leu Asn Ser Lys Arg Arg Glu
 1 5 10 15
 Leu Glu Asp Pro Gly Ala Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr Trp Asn Thr Pro
 20 25 30
 Ser Ala Pro Pro Gly Tyr Asn Ile Ala Val Lys Pro Asp Gln Ile Gln
 35 40 45
 Tyr Thr Glu Leu Ser Asn Ala Lys Ile Ala Tyr Lys Gln Asn Lys Ala
 50 55 60
 Asn Thr Ala Gln Glu Gln Gln Tyr Gly Ser His Glu Glu Asn Leu Pro
 65 70 75 80
 Ala Asp Leu Glu Ala Leu Gln Arg Glu Ile Arg Met Ala Gln Glu Arg
 85 90 95
 Leu Asp Leu Ala Val Gln Ala Tyr Ser His Gln Asn Asn Pro His Gly
 100 105 110
 Pro Arg Glu Lys Lys Ala Lys Val
 115 120

<210> 74

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

10

<400> 74

Gly Phe Gly Thr Ile Arg Asp Thr Leu Asn Asn Lys Arg Lys Glu Leu
 1 5 10 15
 Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr Trp Asn Thr Pro Ser
 20 25 30
 Ala Pro Pro Gly Tyr Asn Ile Ala Val Lys Pro Asp Gln Met Gln Tyr
 35 40 45
 Thr Glu Leu Ser Asn Ala Lys Met Ala Tyr Lys Gln Asn Lys Ala Asn
 50 55 60
 Ile Ala Gln Glu Gln Gln Tyr Gly Ser Asn Glu Glu Asn Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Asp Leu Glu Asn Leu Gln Arg Glu Ile Lys Val Ala Gln Glu Arg Leu
 85 90 95
 Asp Met Ala Ile Gln Ala Tyr Asn Asn Gln Asn Asn Pro Gly Ser Ser
 100 105 110
 Ser Arg Glu Lys Lys Ser Lys Ala
 115 120

<210> 75

15 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 75

Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile
 1 5 10 15
 Phe Ile Ile Phe Met Leu Val Val Gly Leu Ile Ser Leu Val Leu Asn
 20 25 30

Leu Leu Glu Leu Val His Leu Leu Cys Arg Cys Leu Ser Arg Gly Met
 35 40 45
 Arg Ala Arg Gln Gly Gln Asp Ala Pro Pro Thr Gln Gly Thr Ser Ser
 50 55 60
 Asp Pro Tyr Thr Asp Gln Val Phe Phe Tyr Leu Pro Val Gly Gln Gly
 65 70 75 80
 Pro Ser Ser Pro Pro Cys Pro Thr Tyr Asn Gly Leu Ser Ser Ser Glu
 85 90 95
 Gln Asn Trp Ala Asn Leu Thr Thr Glu Glu Arg Leu Ala Ser Ser Arg
 100 105 110
 Pro Pro Leu Phe Leu Asp Pro Pro
 115 120

<210> 76

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

10

<400> 76

Cys Gly Ser Lys Glu His Gly Asn Arg Lys Met Arg Gly Arg Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Thr Tyr Met Ala Ser Ile Phe Phe Lys Ser Val Phe Glu Val Ala
 20 25 30
 Phe Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Leu Tyr Gly Phe Thr Leu Ser Ala Val
 35 40 45
 Tyr Ile Cys Glu Gln Ser Pro Cys Pro His Arg Val Asp Cys Phe Leu
 50 55 60
 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Leu Phe Met Leu Val Val
 65 70 75 80
 Ser Met Val Ser Phe Val Leu Asn Val Ile Glu Leu Phe Tyr Val Leu
 85 90 95
 Phe Lys Ala Ile Lys Asn His Leu Gly Asn Glu Lys Glu Glu Val Tyr
 100 105 110
 Cys Asn Pro Val Glu Leu Gln Lys
 115 120

<210> 77

15 <211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 77

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

ES 2 620 363 T3

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 78

<211> 60

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 78

ccctctccc gggcctctc ccgggcctcc tccggcccc ggcccgcga cctggagatc

60

<210> 79

15 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 79

cgccccggc ccgacgacct ggagatc

27

25 <210> 80

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 80

cgccccggc ccgacgacce ggagggtg

27

35 <210> 81

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

<400> 81

45 cgccccggc ccgacgacgt gcccggtg

27

<210> 82

<211> 27

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

55 <400> 82

	aaggcccggt ccgacgacct gtccgtg	27
	<210> 83	
	<211> 48	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético	
	<400> 83	
	cggcagccca agatctggtt cccaaccgg cggaagccct ggaagaag	48
	<210> 84	
15	<211> 108	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético	
	<400> 84	
	cggcagccca agatctggtt cccaaccgg cggaagccct ggaagaagcc ctctctccgg	60
	gcctctctcc gggcctctc ccggccccgg ccgacgacc tggagatc	108
25	<210> 85	
	<211> 75	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético	
	<400> 85	
	cggcagccca agatctggtt cccaaccgg cggaagccct ggaagaagcg gccccggccc	60
	gacgacctgg agatc	75
35	<210> 86	
	<211> 75	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético	
	<400> 86	
	cggcagccca agatctggtt cccaaccgg cggaagccct ggaagaagcg gccccggccc	60
45	gacgacctgg aggtg	75
	<210> 87	
	<211> 75	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético	
55	<400> 87	
	cggcagccca agatctggtt cccaaccgg cggaagccct ggaagaagcg gccccggccc	60
	gacgacgtgc ccgtg	75
	<210> 88	
	<211> 75	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 620 363 T3

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

5 <400> 88
 cggcagccca agatctggtt ccccaaccgg cggaagccct ggaagaagaa ggcccgggtcc 60
 gacgacctgt ccgtg 75

<210> 89

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

15 <400> 89
 Pro Cys Ser Arg Ala Ser Ser Arg Met Ser Ser Arg Ala Arg Pro Asp
 1 5 10 15
 Asp Leu Asp Val
 20

<210> 90

<211> 19

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencias artificiales; observación = constructo sintético

25 <400> 90
 Pro Arg Val Ser Val Pro Asn Phe Gly Arg Thr Gln Ser Ser Asp Ser
 1 5 10 15
 Ala Tyr Val

30

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y opcionalmente una secuencia o transportador de internalización celular para su uso en un método de tratamiento, en el que el polipéptido se recubre sobre un implante médico o material de tratamiento de heridas.
2. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 está unida en su extremo amino terminal a la secuencia o transportador de internalización celular.
3. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la secuencia o transportador de internalización celular es una secuencia de una proteína seleccionada del grupo que consiste en antenapedia, TAT, VIH-TAT, penetratina, Antp-3A, buforina II, transportano, péptido anfipático modelo (MAP), K-FGF, Ku70, prión, pVEC, Pep-1, SynB2, Pep-7, HN-1, bis-guanidinio-espermidina-colesterol (BGSC) y bis-guanidinio-tren-colesterol (BGTC).
4. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.
5. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el material se selecciona del grupo que consiste en un vendaje, una cinta quirúrgica, una sutura, una grapa y un injerto.
6. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el implante médico se selecciona del grupo que consiste en prótesis de extremidades, implantes de mama, implantes de pene, implantes testiculares, ojos artificiales, implantes faciales, articulaciones artificiales, prótesis de válvulas cardíacas, prótesis vasculares, prótesis dentales, prótesis faciales, válvula de disco inclinado, válvula de bola enjaulada, prótesis de oído, prótesis de nariz, marcapasos, implantes cocleares y sustitutos de la piel.
7. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el material o implante está recubierto con un gel que contiene el polipéptido.
8. El polipéptido para su uso según la reivindicación 7, en el que el gel es un hidrogel.
9. El polipéptido para su uso según la reivindicación 7, en el que el gel comprende entre 10 y 200 μ M del polipéptido.
10. Un polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento de heridas.

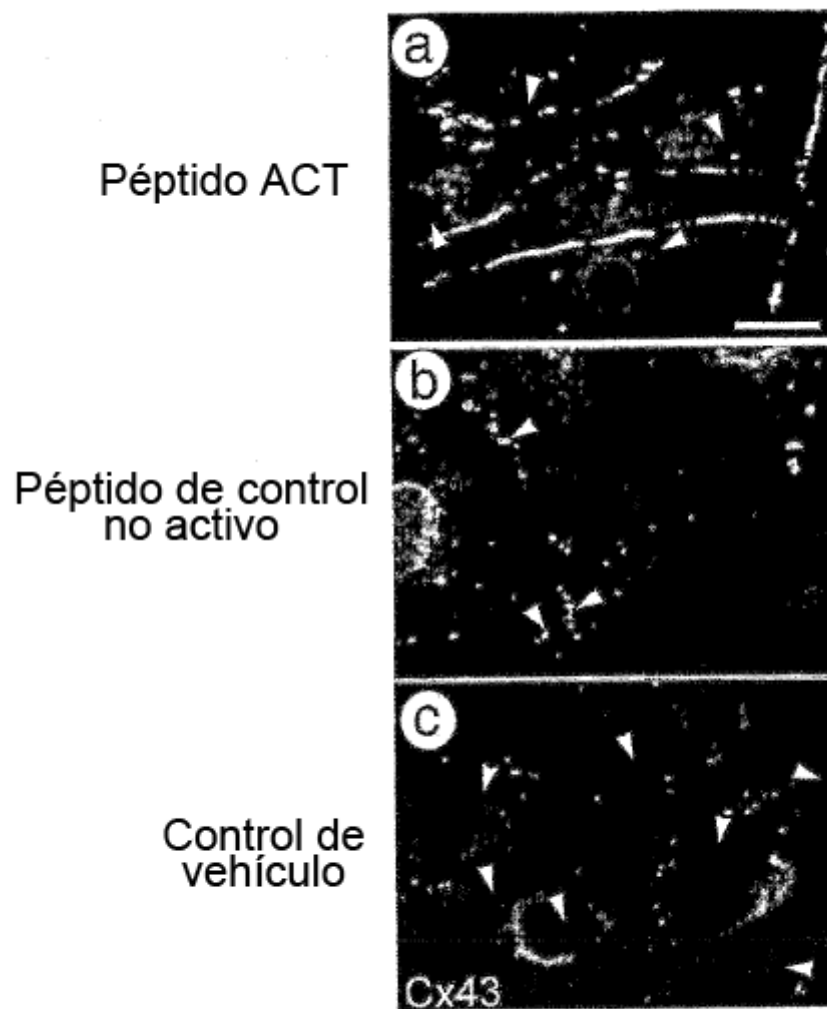


Fig. 1

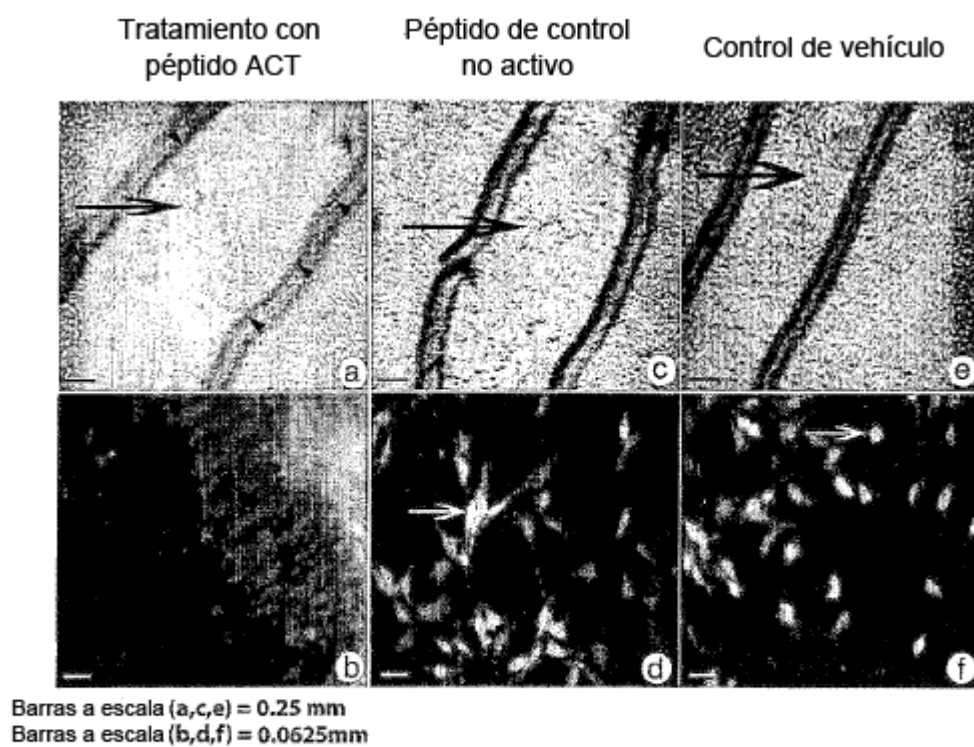


Fig. 2

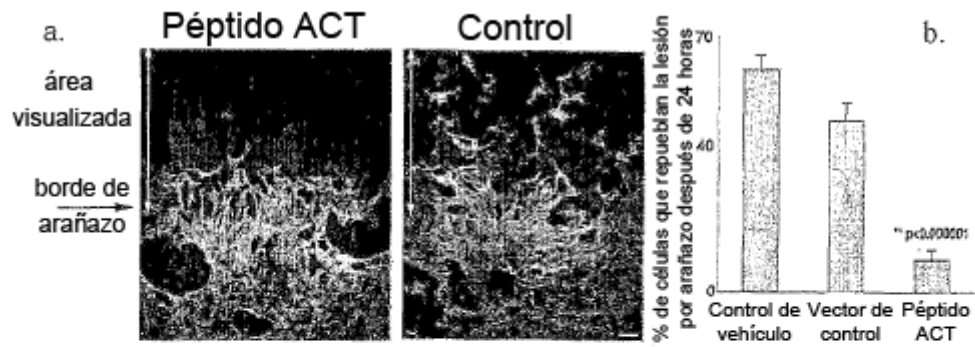


Fig. 3

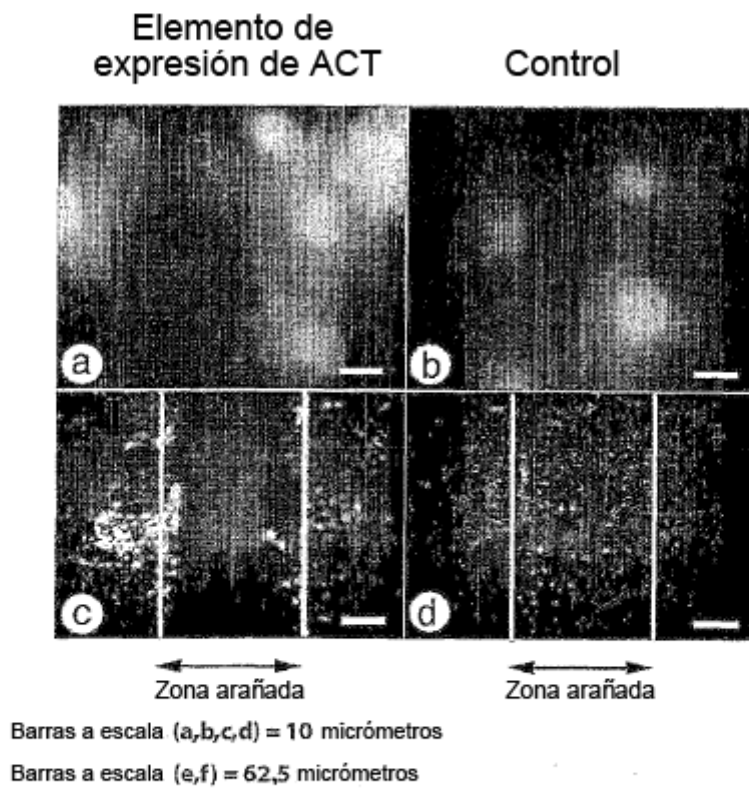


Fig. 4

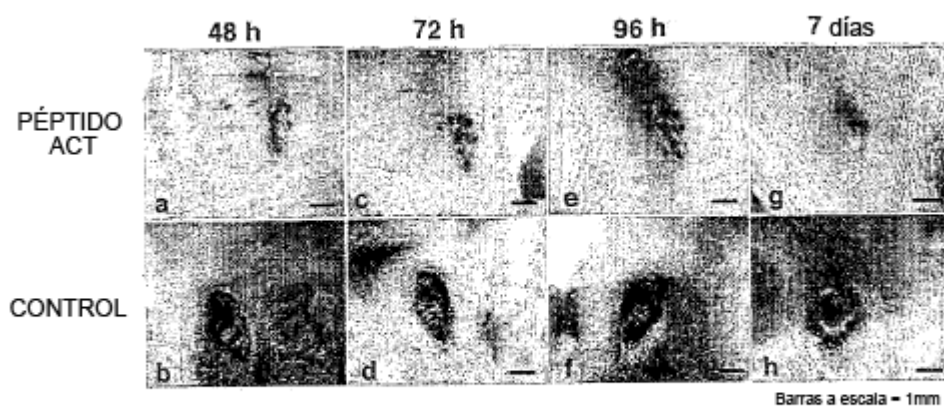


Fig. 5

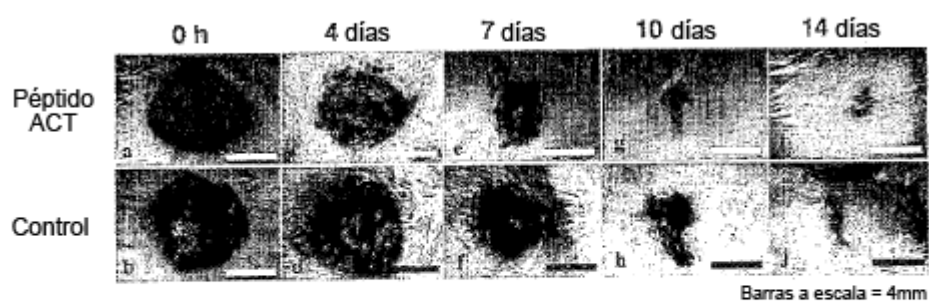


Fig. 6

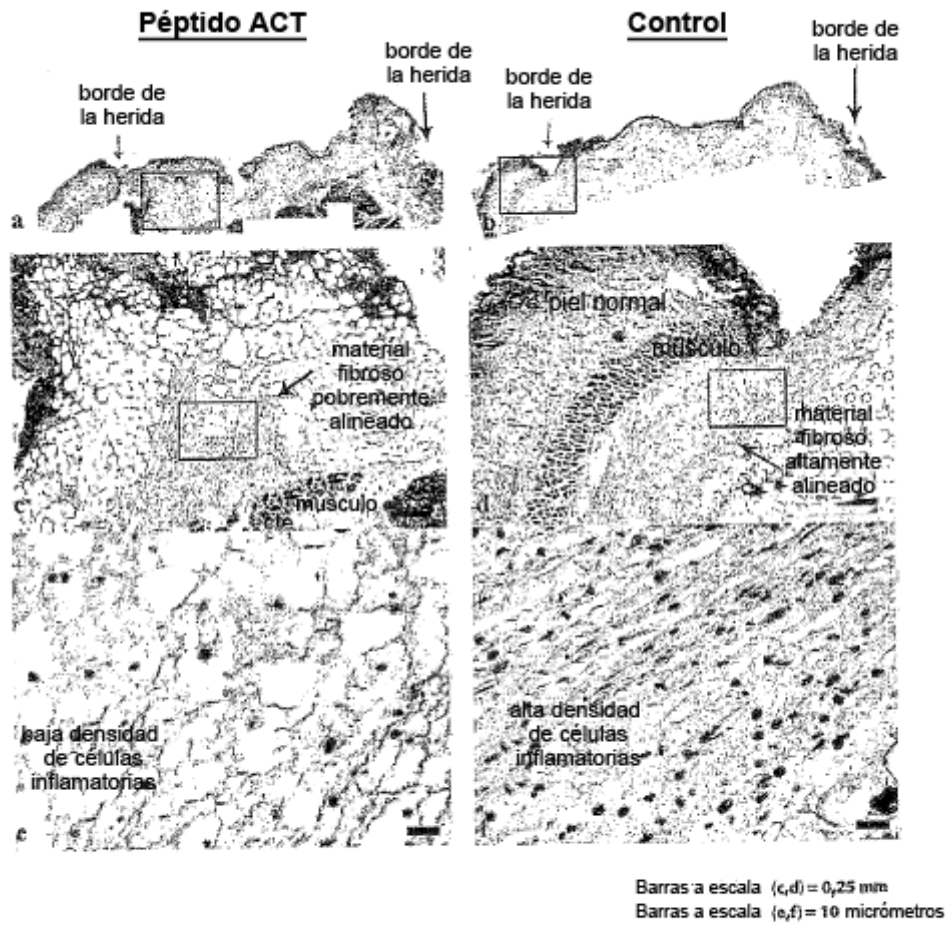


Fig. 7

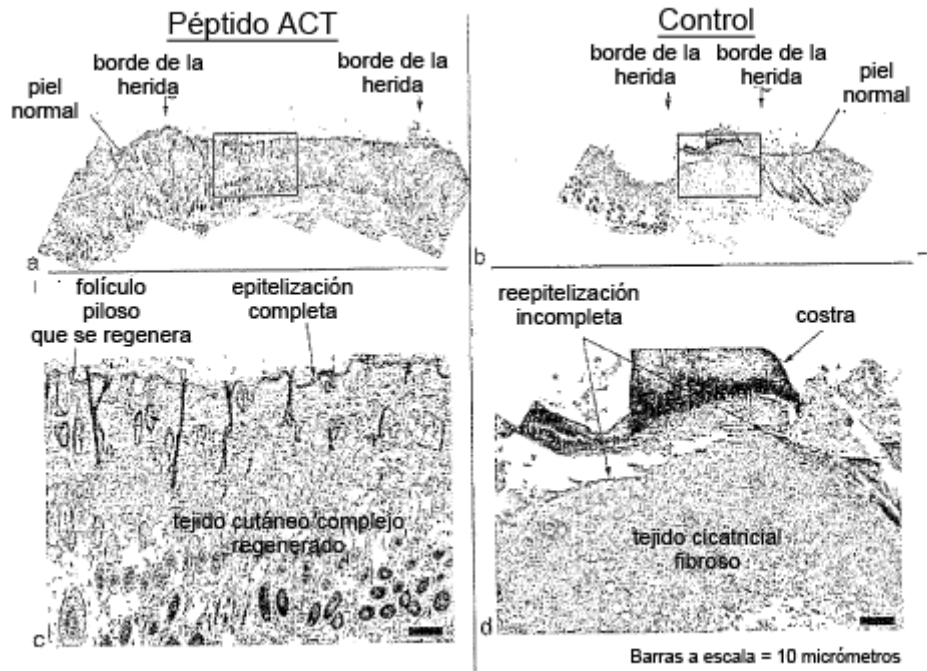


Fig. 8

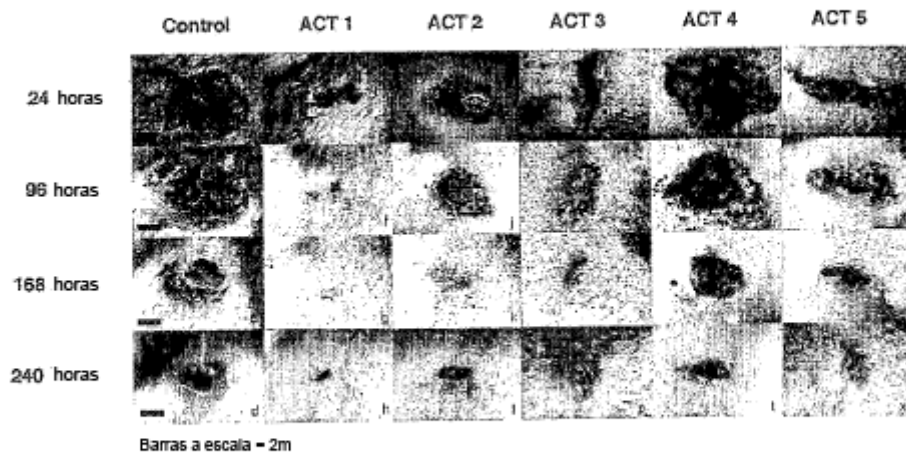
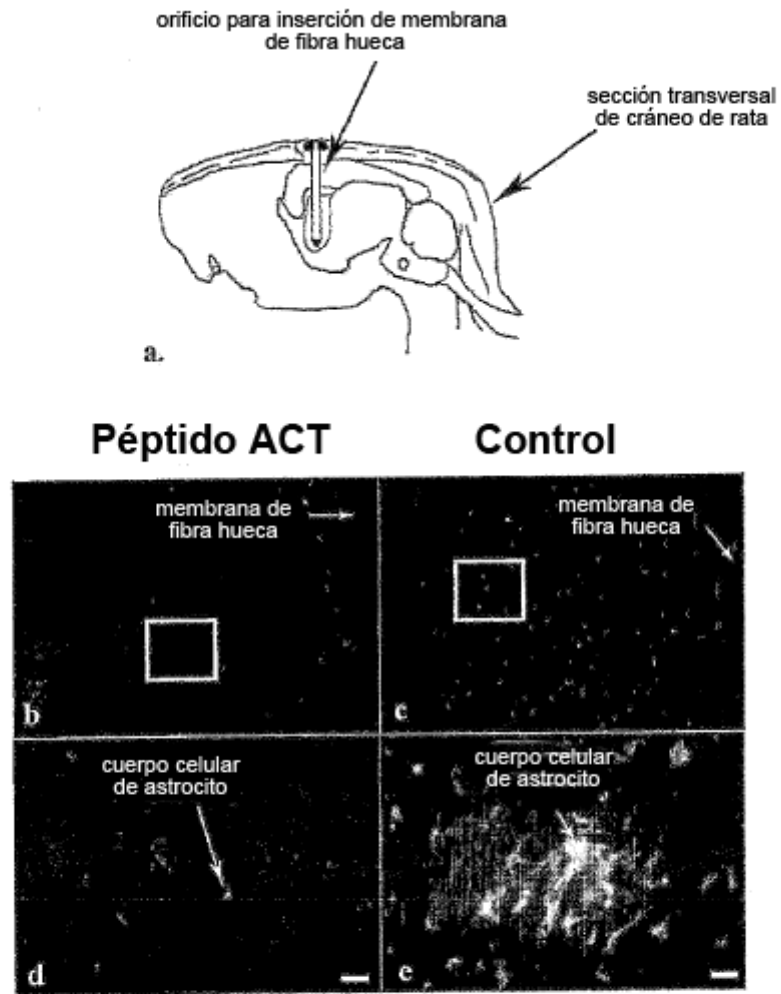


Fig. 9



Verde = marcador de astrocito GFAP, rojo = núcleos
Barras a escala = 10 micrómetros

Fig. 10

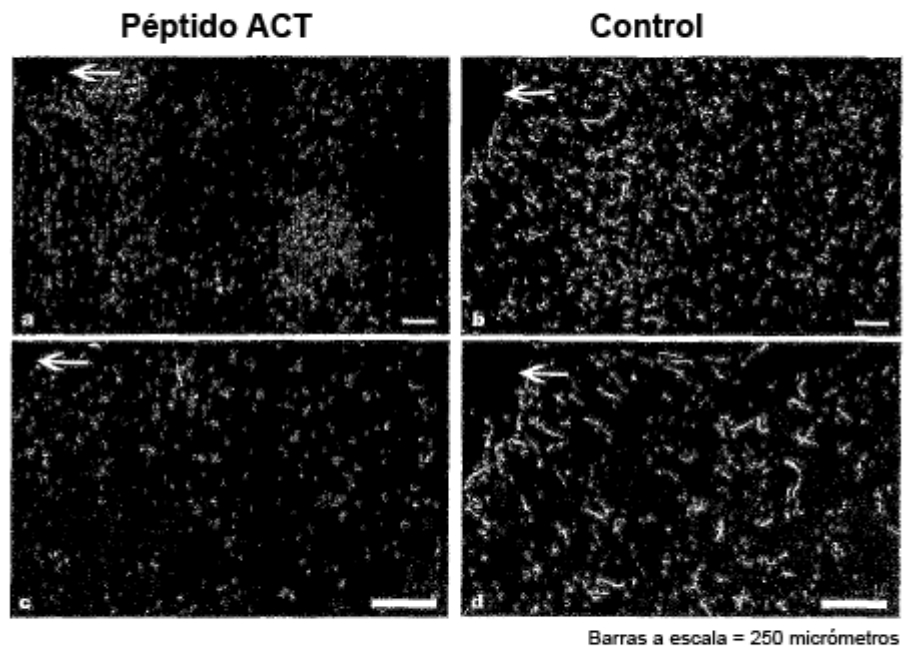


Fig. 11