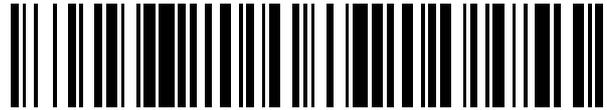


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 332**

51 Int. Cl.:

A61K 35/748 (2015.01)

C07K 14/195 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006 E 06773984 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 1895973**

54 Título: **Extractos purificados de algas verde azuladas y método de uso**

30 Prioridad:

24.06.2005 US 693808 P
19.07.2005 US 700882 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2015

73 Titular/es:

DESERT LAKE TECHNOLOGIES (100.0%)
P.O. Box 489
Klamath Falls, OR 97601, US

72 Inventor/es:

DRAPEAU, CHRISTIAN y
JENSEN, GITTE S.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 546 332 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

Extractos purificados de algas verde azuladas y método de uso

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U.S. No. 60/693, 808, presentada en junio 24, 2005, y la Solicitud Provisional U.S. No. 60/700,882, presentada en julio 19, 2005.

Campo

Esta solicitud se relaciona con una forma seca de un extracto acuoso de algas verde azuladas, tal como un extracto acuoso de algas que incluyen un ligando de selectina.

Antecedentes

10 Las células madre son células pluripotentes derivadas de tejido somático capaz de diferenciarse en células más especializadas. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas se pueden diferenciar en muchos diferentes tipos de células sanguíneas, incluyendo las células sanguíneas rojas, las plaquetas, y los leucocitos.

15 Las células madre hematopoyéticas juegan un papel en el continuo reaprovisionamiento fisiológico durante toda la vida de las células sanguíneas. Las células madre se convierten en células específicas de tejido tanto células de linaje hematopoyético como no hematopoyético. Recientemente, se ha encontrado que las células madre se diferencian en una variedad de tipos de célula específicas de tejido tales como miocitos, hepatocitos, osteocitos, células gliales, y neuronas. Por ejemplo, se ha mostrado que las células madre cruzan la barrera hematoencefálica (Williams and Hickey, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 202: 221-245, 1995) y se diferencian en neuronas (Mezey, Science 290: 1779- 82, 2000). Así, es posible que las células madre se pudieran utilizar para tratar la enfermedad de Parkinson (Polli, Haematologica 85: 1009-10,2000), la enfermedad de Alzheimer (Mattson, Exp. Gerontol. 35: 489-502, 2000), y daño cerebral traumático (Magavi, Nature 405: 892-3, 895, 2000). Las células madre también han mostrado diferenciarse en fibroblastos o células similares a fibroblastos, y a colágeno expreso (Periera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 1142-7, 1998), así, es posible que las células madre se puedan utilizar para tratar osteogénesis imperfecta y fracturas de hueso. Peterson et al., (Science 284: 1168-70, 1999) también han mostrado que las células del hígado pueden surgir de células madre. Así, las células madre se pueden utilizar para tratar una variedad de patologías del hígado, incluyendo, pero no estando limitado a cirrosis. La médula ósea derivada de las células madre ha demostrado migrar al sitio del infarto del miocardio y formar miocardio (Orlic, Nature 410: 701-5, 2000). Así, se puede utilizar las células madre para tratar infarto del miocardio.

25 En razón a que las células madre son capaces de diferenciarse en una amplia variedad de tipos de célula, ellas juegan un papel importante en la curación y los procesos regenerativos de varios tejidos y órganos (ver Koc et al., Bone Marrow Transplant, 27 (3): 235-39, 2001). Los ligandos de selectina estimulan la liberación de las células madre provenientes de la médula ósea (Frenette et al., Blood 96: 2460-68. 2000).

30 Muchos estudios sugieren que la movilización, migración y diferenciación de las células madre de la medula ósea en tejido objetivo constituyen un fenómeno natural de curación en el cuerpo humano (Spencer et al., Thorax 60(1): 60-2, 2005; Ishikawa et al., FASEB J. 18(15): 1958-60, 2004; Mattsson et al., Transplantation 15; 78(1): 154-7, 2004; Thiele et al., Transplantation 77(12): 1902-5, 2004; Cogle et al., The Lancet 363(9419): 1432-7, 2004; Deb et al., Circulation 107(9): 1247-9, 2003. Korbling et al., N Engl J Med 346(10): 738-46, 2002; Adams et al., Blood 102(10) : 3845-7, 2002 ; Krause et al., Cell 105(3) : 369-77 2001). Las células madres movilizadas siguen los gradientes de concentración de las citocinas liberadas por tejidos dañados y migran por sí mismas a tejidos que siguen tales gradientes. De hecho, la movilización de las células madres de la médula ósea inducidas por inyección de citocinas ha mostrado que aceleran la curación del tejido cardíaco después de un infarto agudo de miocardio. Por lo tanto, disparar simplemente la movilización de las células madre de la médula ósea con un consumible efectivo y seguro puede mejorar este proceso fisiológico natural y suministrar una terapia potencial para varias patologías. Así, subsiste la necesidad de composiciones que incrementen la movilización y el tráfico de células madre.

45 Los extractos basados en agua de *Aphanizomenon flos aquae* y su uso para tratar tumores se describe en Ind. I. of Microbio-logy, vol. 43(1), 2003, pages 9-16 (K. Kunar et al).

En el primer aspecto de la presente invención se suministra una composición que comprende una forma seca de un extracto salino acuoso o amortiguado de *Aphanizomenon flos aquae*, en donde el extracto es enriquecido por un ligando de L-selectina; y

50 Una forma seca de un extracto etanólico de *Aphanizomenon flos aquae*.

Aquí Se describe un extracto de *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) que contiene el ligando de L-selectina. Este extracto se puede formular para administración a un sujeto. Las composiciones que incluyen el extracto se pueden administrar a un sujeto necesitado de movilización de células madre y/o un número creciente de células madre circulantes. En un ejemplo, el extracto que contiene el ligando de L-selectina se administra con un extracto de *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) que contiene polisacáridos. Las composiciones, que incluyen el ligando de L-selectina de *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) se utilizan para la movilización de células madre e incrementar el número de células madre circulantes.

Aquí se describe un método para disparar la movilización de células madre al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto específico de *Aphanizomenon flos aquae* a un sujeto. Los extractos se administran en conjunto con otros extractos de *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) que contienen polisacáridos.

La administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto de algas verde azuladas, tal como un extracto que contiene un ligando de selectina, induce un incremento transitorio en la población de algunas células madre, tal como las células madre CD34+ y/o las células madre CD133+, en el sistema circulatorio del sujeto.

Lo anterior y otras características y ventajas se volverán más evidentes de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, que prosigue con referencia a las figuras que la acompañan.

Breve descripción de las figuras.

La Fig. 1 es una gráfica lineal que muestra el curso del tiempo para el incremento en el número de células madre circulantes en la sangre de humanos saludables luego de la ingestión de AFA. Se efectúa una citometría de flujo en los linfocitos y monocitos humanos, donde se utilizó anticuerpo monoclonal CD34, con especificidad para células madres humanas para demostrar que el extracto A de AFA contiene un compuesto que moviliza las células madre al incrementar su número en la circulación sanguínea.

La Fig. 2 es una gráfica de barras que muestra la citometría de flujo que se efectuó en linfocitos, monocitos y células nucleadas polimórficas humanas, donde el anticuerpo monoclonal TQ1, específico para el área de unión de ligando de la selectina L humana se utilizó para demostrar que un extracto AFA contiene un compuesto que compite por la unión del sitio de unión del ligando de L-selectina. El efecto de competencia entre el anticuerpo TQ1 y el compuesto proveniente del extracto de AFA es dependiente de la concentración.

La Fig. 3 es una ilustración esquemática del método utilizado para purificar el ligando de selectina proveniente del Extracto A de AFA. Se recubrieron gránulos magnéticos con proteína G, que se une a la porción FC de la inmunoglobulina. Estos gránulos se utilizaron para capturar una proteína recombinante quimérica que consiste de la porción extracelular de la L-selectina humana, unida con una porción Fc de la inmunoglobulina humana IgG1. Se efectuó una reacción química para formar uniones covalentes entre la porción Fc de la quimera y la proteína G sobre los gránulos magnéticos. Estos gránulos, ahora recubiertos con la quimera, con la porción extracelular de la L-selectina que llegan desde los gránulos, se utilizaron para capturar el ligando para la L-selectina en extractos AFA.

Las Figs. 4A-4B son imágenes digitales que muestran la electroforesis de gel que ilustra el peso molecular aproximado del compuesto que fue purificado por afinidad proveniente del extracto A de AFA, cuando se empleó el método de afinidad descrito en la Fig. 3. Las figuras son imágenes digitales de geles, en donde se efectuó electroforesis de gel sobre material eluido de gránulos magnéticos después de que estos gránulos habían capturado el ligando de selectina del extracto A de AFA. La Fig. 4A es una imagen digital que muestra el compuesto eluido de los gránulos que se recubrieron con L-selectina recombinante humana, y la Fig. 4B es una imagen digital que muestra el compuesto eluido de los gránulos recubiertas con P-selectina recombinante humana. Los geles fueron corridos bajo diferentes condiciones reductoras. Se muestran 2 diferentes bandas en aproximadamente los 54 y 57 kDa. Se ven patrones de banda idénticos tanto para la L- como para la P-selectina, indicando que el ligando de selección es un ligando tanto para la L como para la P-selectina.

La Fig. 5 es una imagen digital de un gel, en donde se efectuó la electroforesis de gel sobre el material eluido de los gránulos magnéticos después de que estos gránulos habían utilizado para capturar los ligandos de selectina potenciales en el Extracto A de AFA versus el Extracto B. El ligando de selección proveniente del AFA se encontró en el Extracto A. No se pudo detectar ningún ligando de selectina proveniente del AFA en el Extracto B. El carril 1 es un control negativo, el carril 2 muestra el ligando purificado proveniente del Extracto A (flecha), y el carril 3 muestra que la banda correspondiente no se dio en el Extracto B.

La Fig. 6 es una gráfica lineal que muestra los resultados provenientes del análisis de citometría de flujo de la expresión del receptor CXCR4 de quimiocina, tal como se indujo mediante un conocido ligando de L-selectina, del Fucoídán. Los datos indican que el Fucoídán ligando de L-selectina conocido, compite con el compuesto proveniente de AFA por unión a la L-selectina sobre los linfocitos sanguíneos periféricos humanos.

La Fig. 7 es una gráfica lineal que muestra los resultados provenientes de un análisis de citometría de flujo de la expresión del receptor de quimiocina CXCR4, en la medida en que este es inducido por un conocido ligando de L-selectina, el Fucoidán. Los datos indican que el Fucoidán ligando de L-selectina conocido, compite con el compuesto de AFA por unión a L-selectina en la línea celular CD34+ humana KG-1a.

- 5 La Figura 8 es una tabla. Los resultados presentados muestran que el Extracto A (AFA-W) bloquea la unión del TQ1 MoAb a la L-selectina en leucocitos humanos.

La Fig. 9 es una gráfica lineal que muestra el curso del tiempo del número de células CD34+ en sangre periférica humana después del consumo (flecha) del ligando de L-selectina (LSL), Migratosa (MGT), combinación mejorada de células madre (SE) o un placebo (control marcado). El ligando de L-selectina (LSL) es un extracto de *Aphanisomenon flos aquae* (AFA) enriquecido por el ligando de L-selectina. Para los sujetos tratados con LSL, un gramo de extracto concentrado en ligando de L-selectina (ver la sección de ejemplos) se mezcló en 40 ml de agua y fue consumido por el sujeto. La Migratosa (MGT) es un extracto en donde se extrajo *Aphanisomenon flos aquae* (AFA) líquido con 10% de etanol a 85°C durante 3 horas. La solución se centrifugó y el sobrenadante se secó utilizando RW. Para administración, se mezclaron 150 mg de producto seco con 250 mg de un portador, encapsulado en una capsula vegetal y consumido por los sujetos. La combinación mejorada de células madre (SE) fue una mezcla de LSL y de un MGT, tal como se describió anteriormente, se mezcló un gramo de SE en 40 ml de agua y fue consumido por los sujetos. El control fue de 400 gramos de hojuelas de papa finamente molidas encapsuladas en capsulas de vegetales.

Descripción detallada

20 1. Abreviaturas

AFA: *Aphanisomenon flos aquae*

Ctrl: control

LSL: ligando de L-selectina

Mg: miligramo

25 MI: mililitro

MGT: migratosa

SE: combinación madre mejorada, incluye LSL y MGT

g. gramo

kg: kilogramo

30 II. Términos

A menos que se mencione otra cosa, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al., (eds), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Robert A Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, INC., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Con el fin de facilitar la revisión de varias realizaciones de esta descripción, se suministran las siguientes explicaciones de los términos específicos:

Administración a un sujeto

40 Las rutas de administración incluyen, pero no están limitadas a, rutas oral y parenteral, tal como intravenosa (IV), intraperitoneal (IP), rectal, tópica, oftálmica, nasal y transdérmica. Se puede administrar más de un extracto. Si se administran oralmente, las células completas o los extractos se pueden suministrar o administrar en la forma de una dosis unitaria en forma sólida, semisólida, o líquida tal como tabletas, píldoras, polvos, soluciones líquidas, o suspensiones líquidas. Sin embargo, extractos de algas verde azuladas también se pueden administrar intravenosamente en cualquier medio convencional para inyección intravenosa, tal como un medio salino acuoso, o

un medio de plasma sanguíneo. El medio también puede contener materiales farmacéuticos adjuntos convencionales, tales como sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la presión osmótica, portadores de lípido (por ejemplo ciclodextrinas), proteínas (por ejemplo, seroalbúmina), agentes hidrófilos (por ejemplo metilcelulosa), detergentes, amortiguadores, preservantes, y similares. Una explicación más completa de portadores farmacéuticos aceptables se puede encontrar en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th Edition, 1995) en el capítulo 95.

Agente que afecta la hematopoyesis. Un compuesto, anticuerpo, molécula de ácido nucleico, proteína, glicoproteína, o célula que alterna la formación de las células sanguíneas, tal como las células sanguíneas blancas. Un agente molecular puede ser una molécula de ocurrencia natural o una molécula sintética. En algunas realizaciones, el agente afecta la movilización, crecimiento, proliferación, maduración, o diferenciación o liberación de las células hematopoyéticas. En una realización, el agente es un ligando de selectina extraído de una célula de alga verde azulada.

Agente que afecta la circulación de la célula madre. Un compuesto, anticuerpo, molécula de ácido nucleico, proteína, glicoproteína, o célula, que incluye neurolépticos y otras moléculas de señalización, que afectan la liberación de las células madre en el sistema circulatorio, así como también el anidamiento del sistema circulatorio en un tejido. Un agente molecular puede ser una molécula de ocurrencia natural o una molécula sintética. En un ejemplo específico, el agente es un ligando de selectina proveniente de algas verde azuladas.

Un agente que afecta la circulación de las células madre puede afectar la proporción de células madre en agrupamientos quiescentes versus los agrupamientos activos. En algunas realizaciones, el agente afecta el balance entre las células madre no diferenciadas y las células madre que se diferencian en células CD34-negativas (CD34-) y CD34-positivo (CD34+), y/o células CD133-negativas (CD133-) y CD133-positivo (CD133+). En otras realizaciones, el agente afecta la liberación de células madre provenientes de localizaciones de tejido, tales como la liberación de células CD34+ y/o células CD33+ y/o células detectadas por métodos basados en acciones enzimáticas de aldehído deshidrogenasa, proveniente del ambiente de la médula ósea.

Animal. Un organismo vertebrado, multicelular, viviente, que incluye, por ejemplo, mamíferos, peces, reptiles, pájaros.

Algas verde azuladas. Nombre común para bacterias fotosintéticas gram negativas que pertenecen a la División Cianófitas que pueden existir en formas unicelulares, coloniales o filamentosas. Las algas verde azuladas representativas incluyen, pero no están limitadas a, especies de *Spirulina* y especies de *Aphanizomenon*. El *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) es un tipo no limitativo específico de algas verde azuladas.

El término "algas" es la forma plural de "alga", que es una célula de una especie de microalga.

Sistema circulatorio. En animales, el sistema circulatorio está compuesto por las estructuras que mueven la sangre y los componentes sanguíneos en todo el cuerpo, incluyendo los sistemas vascular y linfático. Los componentes del sistema circulatorio incluyen el corazón, los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares), y los vasos linfáticos.

Célula madre circulatoria. Una célula madre presente en el sistema circulatorio.

Componente de algas verde azuladas. Cualquier fracción, extracto, o molécula aislada o purificada de células de algas verde azuladas. En una realización, el componente es una proteína o una glicoproteína, o un ácido nucleico. En otra realización, el componente es un componente fitoquímico. En otra realización, el componente es un extracto acuoso de algas verde azuladas que incluye un ligando de selectina. Así, se afectan las algas verde azuladas, se agrega un solvente inorgánico u orgánico, se recolectan los extractos. Ejemplos específicos, no limitantes, son los extractos aislados utilizando cromatografía líquida de alto desempeño, cromatografía de capa delgada, columna de afinidad, gránulos magnéticos o destilación. En una realización, el fraccionamiento se basa en el peso molecular o la hidrofobicidad de los componentes de las algas verde azuladas.

Diferenciación. El proceso por el cual las células se vuelven más especializadas para efectuar funciones biológicas. La diferenciación es una propiedad que es a menudo total o parcialmente perdida por las células que han sufrido transformaciones malignas.

Cantidad efectiva. Una cantidad, tal como una cantidad de extractos que contienen selectina de alga verde azulada, capaz de disparar o mejorar la movilización de la célula madre, que se puede determinar mediante varios métodos utilizados en las ciencias biológicas. Estos métodos incluyen. Pero no están limitados a generar una curva de respuesta de dosis empírica. En una realización una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad efectiva para mejorar la movilización de las células madre que reabastecen, reparan, o rejuvenecen el tejido. En otra realización una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad efectiva para mejorar el tráfico de las células

madre. En aún otra realización, la “cantidad terapéuticamente efectiva” es una cantidad efectiva para mejorar el anidamiento de las células madre provenientes del sistema circulatorio a varios tejidos u órganos.

Una cantidad terapéuticamente efectiva también puede ser una cantidad suficiente para tratar una condición o enfermedad, tal como una cantidad suficiente para aliviar los síntomas asociados con trastornos del sistema nervioso (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple), daño traumático del cerebro o la columna vertebral, enfermedad hepática, o trastornos de huesos o cartílagos. Una cantidad terapéuticamente efectiva también puede ser una cantidad suficiente para acelerar y mejorar la recuperación de infarto agudo de miocardio.

En un ejemplo no limitante, específico, la cantidad terapéuticamente efectiva del extracto, tal como el extracto que contiene selectina de algas verde azuladas, proviene de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 g por kg de peso de cuerpo, tal como aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.5 gramos por kg de peso de cuerpo, o de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 gramos por kg de peso de cuerpo. En otro ejemplo no limitante específico la cantidad efectiva del extracto que contiene selectina de las algas verde azuladas proviene de aproximadamente 0.25 gramos a aproximadamente 5 gramos, de aproximadamente 0.5 gramos a aproximadamente 5 gramos, o de aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 2 gramos. En un ejemplo no limitante, específico, la cantidad respectiva de extracto que contiene selectina de algas verde azuladas es 1 gramo. Esta cantidad efectiva se puede administrar a una frecuencia dada, tal como aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente 2 veces a la semana, aproximadamente 3 veces a la semana, una vez al día, aproximadamente 2 veces al día, aproximadamente 3 veces al día, o más.

La cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto de algas verde azuladas, tal como un extracto acuoso que contiene selectina de algas verde azuladas y la frecuencia de administración puede depender de una variedad de factores, tal como el género o las especies de algas utilizadas, la salud general del sujeto que está siendo tratado, y las características fisiológicas (por ejemplo altura, peso, porcentaje de grasa del cuerpo, metabolismo, etc.) del sujeto que está siendo tratado.

Se suministran aquí ensayos específicos para determinar la cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto acuoso, tal como un extracto que contiene un ligando de selectina, de algas verde azuladas. En un ejemplo, no limitante, específico, se detectan y/o analizan diferentes cantidades consumidas de un extracto que contiene ligando de selectina de algas verde azuladas, tal como AFA, por sujetos humanos en la presencia y/o la cantidad de células madre (que puede incluir subtipos de tales células) presentes en el sistema circulatorio. En otra realización, se utiliza un modelo animal (por ejemplo murino) y la población de las células madre recientemente integrada se vigila en varios tejidos (ver los ejemplos de adelante). Los métodos descritos tienen igual aplicación en configuraciones médicas y veterinaria. Por lo tanto, el término general “sujeto que está siendo tratado” incluye todos los vertebrados (por ejemplo, pero no estando limitado a, humanos, simios, perros, gatos, ratones, ratas, conejos, ovejas, caballos, cerdos, y vacas).

Mejora (mejoramiento). Un incremento en un parámetro particular de una célula u organismo. En una realización, la mejora se refiere a un 25%, 50%, 100% o un incremento mayor del 100% en un parámetro. En un ejemplo no limitante específico, la mejora en la circulación de la célula madre se refiere a un incremento en la población específica de las células, tal como un 25%, 50%, 100%, 200%, 400%, 500%, o incremento mayor en la población específica de las células o en la respuesta de la población de células. En una realización, el parámetro es la movilización de las células madre. En otra realización, el parámetro es la diferenciación de las células madre. En aún otra realización, el parámetro es el anidamiento de las células madre.

Eritrocitos. Células sanguíneas rojas que llevan oxígeno a los tejidos del cuerpo.

Extracto. Preparación concentrada de una composición, tal como algas verde azuladas, obtenidas al retirar los constituyentes activos de la composición con solventes adecuados, evaporarlos todos o aproximadamente todos del solvente, y ajustar la masa residual o polvo a la cantidad estándar predeterminada. Un extracto “se enriquece” para un producto, tal como un ligando de selectina si la actividad o cantidad de un componente de interés se incrementa sustancialmente en el extracto comparado con otros extractos o con la misma cantidad de composición original extraída.

Glicoproteína. Una molécula de complejo hecha de una fracción de proteína y una fracción de glicano y polisacárido.

Hematopoyesis. La formación y desarrollo de las células sanguíneas. La hematopoyesis involucra la proliferación y la diferenciación terminal de las células madre hematopoyéticas. En mamíferos adultos, es conocido que la hematopoyesis ocurre en la médula ósea. La hematopoyesis es la producción se células hematopoyéticas que incluyen células B, células T, células del linaje de monocito macrófago, y células sanguíneas rojas.

Anidamiento. El proceso de una célula que emigra desde el sistema circulatorio a un tejido u órgano. En algunos casos, el anidamiento se logra por vía de moléculas de adhesión específicas de tejido y procesos de adhesión.

5 Inmunológicamente normal. “Inmunológicamente normal” denota un sujeto que muestra características del sistema inmune típicas para las especies a las cuales pertenece el individuo. Estas características típicas incluye, entre otros, funcionamiento de las células B y células T así como también componentes celulares estructurales, llamados antígenos superficiales de célula, que actúan como la firma inmunológica para un organismo particular.

10 El uso de tales receptores inmunológicamente normales significa que el sistema inmune en el receptor inmunológicamente normal, por vía de sus células B (respuesta humoral) y T (respuesta celular), identificará los antígenos de superficie celular o una célula extraña o un tejido injertado como extraño. Este reconocimiento conduce finalmente a una respuesta inmune contra la célula o tejido, resulta en la destrucción de la célula o rechazo del injerto. Una respuesta inmune contra un tejido allogénico se conoce como un rechazo de huésped –versus- injerto.

15 Inmunológicamente comprometido. Un sujeto “inmunológicamente comprometido” tiene una inmunodeficiencia genotípica o fenotípica. Un sujeto genotípicamente inmunodeficiente tiene un defecto genético que da como resultado una incapacidad para generar respuestas mediadas humorales o por célula. Un ejemplo no limitante, específico, de un sujeto genotípicamente inmunodeficiente es un ratón genotípicamente inmunodeficiente, tal como el ratón SCID o un ratón de bg/un/xid (Andriole et al., J. Immunol. 135: 2911, 1985; McCune et al., Science 241: 1632, 1988) o un humano XSCID. Un “sujeto genotípicamente inmunodeficiente” es un sujeto, el cual es genéticamente capaz de generar una respuesta inmune, aunque haya sido fenotípicamente alterada de tal manera que no se vea respuesta. En un ejemplo no limitante, específico, se irradia un receptor fenotípicamente
20 inmunodeficiente. En otro ejemplo, no limitante específico, un sujeto fenotípicamente inmunodeficiente se ha tratado con quimioterapia. En aun otro ejemplo no limitante, específico, el sujeto fenotípicamente inmunodeficiente ha sufrido de infección bacteriana o viral, tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS).

25 Incremento: Un incremento significativo en una actividad particular o de un componente de interés. En una realización, la inhibición se refiere a al menos aproximadamente un 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 100% de incremento en la actividad o concentración.

Inhibir. Una disminución en un parámetro particular de una célula u organismo. En una realización, la inhibición se refiere a un 25%, 50%, o 100% de disminución en un parámetro.

30 Aislado. Un componente biológico “aislado” (tal como una molécula de ácido nucleico, polipéptido, polisacárido, selectina, ligando de selectina, u otra molécula biológica) ha sido separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos de las células en los cuales ocurre el componente natural. Una célula “aislada” se ha separado o purificado sustancialmente de otras células de diferentes especies (en el caso de microorganismo) o células del organismo (en el caso de organismos multicelulares). Los ácidos nucleicos y las proteínas se pueden aislar mediante métodos de purificación estándar, expresión recombinante en una célula huésped, o sintetizados
35 químicamente. Las células se pueden aislar mediante métodos de cultivo estándar. En una realización, las algas verde azuladas se cosechan de fuentes naturales (tales como el Lago Klamath) y se preparan mediante secado (ver adelante).

40 Leucocitos. Células sanguíneas blancas. Corpúsculos esféricos, incoloros y nucleados involucrados en la defensa del huésped, que incluyen respuestas inmunológicas. Tipos específicos de leucocitos incluyen basófilos, celomocitos, eosinófilos, hemocitos, linfocitos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas circulantes, y células madre hematopoyéticas circulantes.

45 L-selectina. Un miembro de las lectinas dependientes de calcio de la familia selectina también conocidos como CD62L. Una molécula de adhesión utilizada por las células madre para adherirse al ambiente de la médula ósea. La L-selectina, la más pequeña de las selectinas vasculares, es una molécula de 74-100kDa, que se expresa constitutivamente en los puntos de los microdobles o granulocitos, monocitos, y un vasto arreglo de L-selectina de los linfocitos circulantes también se conoce como LECAM-1, LAM-1, antígeno Mel-14, gp90^{mel}, y antígeno Leu8/TQ-1. La L-selectina se conoce por ser importante para unir los leucocitos al endotelio en varias situaciones fisiológicas, que incluyen la unión de los fagocitos al endotelio, la unión de los leucocitos al endotelio inflamado, y el anidamiento del linfocito y la adhesión a células endoteliales altas de vénulas poscapilares de los nodos linfáticos periféricos. Más
50 aún, esta molécula de adhesión contribuye mayormente a la captura de leucocitos circulantes durante las fases tempranas de la cascada de adhesión. Son conocidas las secuencias de aminoácidos de muchas L-selectinas.

55 Un “ligando de L-selectina” se une específicamente a la L-selectina. En algunas realizaciones, un ligando puede bloquear la activación mediante otros ligandos, por ejemplo mediante interferencia espacial con el área que se une al ligando. Un ligando también puede activar la célula por vía de ligación a la L-selectina, por ejemplo al disparar el flujo de calcio, arreglos del citoesqueleto, y otros eventos de señalización. Además, un ligando puede alterar las

- 5 celdas de transducción de señal de tal manera que una unión posterior con cualquier otro ligando de L-selectina, o un estímulo independiente de L-selectina da como resultado una respuesta fisiológica alterada. En algunos ejemplos, cuando se activan los linfocitos humanos por vía de los ligandos de L-selectina, la L-selectina dispara la expresión del CXCR4, un receptor para el Factor 1 derivado de células Estromales (SDF1), una citocina involucrada en la residencia de células madre en la médula ósea. En una realización, el extracto que contiene L-selectina de las algas verde azuladas inhibió la expresión del CXCR4 disparado por la activación de la L-selectina con Fucoidán. Las secuencias de aminoácido para los ligandos de L-selectina de ejemplo son conocidas. Por ejemplo, el GliCam-1 de Mus musculus se muestra el número de Acceso del GENBANK NM-00834 y los aislados de mRNA humano para GliCam -1 se muestran en los Números de Acceso del GENBANK AJ_489 590, AJ 489 591, AJ 489 592, AJ 489 593, y AJ 489 589, todas disponibles desde Junio 24, 2005. Estas secuencias de aminoácido no significan que sean limitantes, sino se suministran como ejemplos. Las formas recombinantes y modificadas están incluidas en la presente divulgación.
- 10 Linfocitos. Un tipo de célula sanguínea blanca que se involucra en las defensas inmunes del cuerpo. Existen dos tipos de linfocitos: Las células B y las células T.
- 15 Linfoproliferación. Un incremento en la producción y/o la división de los linfocitos.
- Mamífero. Este término incluye tanto mamíferos humanos como no humanos. De manera similar, el término "sujeto" incluye tanto sujetos humanos como veterinarios.
- Monocito. Una célula sanguínea blanca grande en la sangre que ingiere microbios u otras células y partículas extrañas. Cuando un monocito pasa afuera del torrente sanguíneo e ingresa a los tejidos, este se convierte en un macrófago.
- 20 Célula muscular. Una célula de tejido muscular estriado, cardiaco, o liso. En el músculo estriado (esqueleto), una célula del músculo está compuesta de un sincicio formado por la fusión de mioblastos embrionarios. En el músculo liso, la célula del músculo es una célula única caracterizada por grandes cantidades de actina y miosina y capaces de contraerse a una pequeña fracción de su longitud total. En el músculo cardiaco, las células del músculo están ligadas a las células vecinas mediante uniones especializadas denominadas discos intercalados.
- 25 Portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores farmacéuticamente aceptables útiles son convencionales. Remington Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), describe las composiciones y formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de algas verdes azuladas y los extractos descritos aquí.
- 30 En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales usualmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticos y fisiológicamente aceptables tales como el agua, solución de saliva fisiológica, soluciones salinas balanceadas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como un vehículo. Para las composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldoras, tabletas o cápsulas), los portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, o estearato de magnesio. Además a los portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas al ser administradas pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes y emulsificantes, preservantes, y agentes amortiguantes del pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.
- 35
- 40 Plasticidad. La capacidad de ser moldeado, a menudo utilizada para referirse a la flexibilidad y reversibilidad del tejido y la especificación del linaje.
- Plaquetas. Fragmentos de células pequeñas en la sangre derivados de megacariocitos. Las plaquetas participan en la curación de heridas, la coagulación de la sangre, la reparación de los vasos sanguíneos dañados y los procesos inflamatorios patológicos.
- 45 Célula progenitora. Una célula que da origen a la progenie en un linaje de célula definido. Una "célula progenitora hematopoyética" es una célula que da origen a células del linaje hematopoyético.
- P-selectina. Un miembro de las lectinas dependientes de calcio de la familia de la selectina, también conocida como CD62p. La P-selectina se expresa sobre la superficie de las células endoteliales, las plaquetas (cantidades crecientes con activación) y los megacariocitos. La P-selectina puede mediar la unión de las plaquetas activadas a los leucocitos, y puede, además, contribuir a la unión posterior de estos leucocitos al endotelio. La expresión de la P-selectina en el endotelio de la médula ósea juega un papel para las ubicaciones de las células madre in vivo, incluyendo la retención de la médula ósea, la movilización y el anidamiento (Frenette and Weiss, Blood 96(7): 2460, 2000).
- 50

Reclutamiento de una célula madre. Un proceso donde una célula madre en el sistema circulatorio migra a un tejido u órgano. El reclutamiento se puede facilitar por un compuesto o molécula, tal como una señal químico atrayente o un receptor de célula. Por ejemplo, tanto el CXCR4 como el SDF-1 tienen papeles identificados en el anidamiento de la célula madre. Hidalgo et al., Exp. Hematol. 29(3): 345-55, 2001; Kollet et al., Blood 97(10) 3283-91, 2001.

5 Célula satélite. Célula madre específica del músculo, a menudo ubicada en la periferia del tejido muscular, y capaz de migrar a un músculo para ayudar en la reparación y la reconstrucción del tejido.

10 Selectina. Una familia de las lectinas dependientes del calcio, también conocida como CD62. Los 3 miembros de esta familia incluyen la L selectina (CD62L), P-SELECTINA (CD62P), y E-selectina (CD62E). Estas moléculas de adhesión están involucradas en hacer más lento los leucocitos circulantes durante su tránsito en las vénulas, y también están involucradas en albergar otras interacciones adhesivas, que incluyen pero no están limitadas a interacciones de plaqueta leucocito, retención de célula en ciertos tejidos que incluyen la médula ósea, y la adhesión de leucocitos al endotelio inflamado.

15 Célula madre. Célula pluripotente que da origen a la progenie de muchos tipos de tejido, que incluye, (pero no está limitada a) los linajes de células hematopoyéticas completos y las células estromales de la médula. Una célula madre típica reside en la médula ósea, o como un tipo de célula estromal adherente, o como una célula más diferenciada que expresa CD34 en la superficie celular o de una manera en donde la célula es negativa para la superficie celular CD34. Las células madre también pueden expresar CD133. Así, una célula madre puede ser una célula CD34+, una célula CD133+, o se puede mostrar para expresar tanto CD34 como CD133 (ver He et al., CELLS AND Development 14(2): 188-198, 2005). Alternativamente, una célula madre puede ser una célula que se puede medir mediante aminoacetaldehído marcado fluorescentemente, formado cuando una encima en el citoplasma de la célula madre convierte un sustrato no fluorescente en un compuesto fluorescente que es retenido dentro de la célula madre y que permite su detección con base en la función enzimática.

20 Un subconjunto de las células CD34+ en la médula ósea, los productos de leucaferesis y la sangre del cordón con características fenotípicas primitivas expresan el CD133, una molécula de 5 transmembrana de función desconocida. Los anticuerpos específicos para CD133 tienen el 35-75% de la población de CD34+ que depende de la fuente de las células madre (De Wynter et al., Stem Cells 16: 387-396; 1998). El transporte de una fracción de célula madre no adherente CD133+ CD34+ aislada en ratones NOD/SCID inmunodeficientes indujeron un injerto multilinjaje mieloides y linfoides, sugiriendo que estas células están altamente enriquecidas en las células de repoblación SCID (Kuci et al., Blood 101: 869-876, 2003).

30 Células madres "totipotentes", tales como las células madre hematopoyéticas o las células madre neuronales, generalmente dan origen a progenie de un número limitado de tipos de tejido. Las células madre hematopoyéticas, las células madre musculares y las células precursoras neuronales son varios ejemplos de células madre totipotentes.

35 Sujeto. Un animal que tiene un sistema circulatorio, incluyendo vertebrados tales como humanos y otros sujetos veterinarios, tales como, pero no limitados a, primates, caninos, felinos, bovinos, y roedores.

40 Tráfico. El proceso de movimiento de una célula desde el tejido de origen y que viaja dentro del sistema circulatorio. En una realización, el tráfico incluye el movimiento de una célula desde el tejido de origen, el anidamiento mediante la adhesión al endotelio, la transmigración, y la migración final dentro del órgano objetivo. En otra realización, el tráfico es el proceso del movimiento de una célula del sistema inmune. En otra realización, el tráfico incluye la movilización de la célula madre. Un ejemplo no limitante, específico de tráfico es el movimiento de la célula madre a un órgano objetivo. Otro ejemplo no limitante, específico, del tráfico es el movimiento de una célula B a una célula pre-B que sale de la médula ósea y se mueve a un órgano objetivo.

45 Transdiferenciación. El cambio de una célula o tejido desde un estado diferenciado a otro, o la diferenciación de una célula madre específica de tejido en otro tipo de célula como, por ejemplo, una célula madre de médula ósea que se diferencia en una neurona.

50 Trasplante. La transferencia de una población de células, tejido o una porción del mismo desde un cuerpo o parte del cuerpo a otro cuerpo o parte del cuerpo. Un "trasplante alogénico" o "trasplante heterólogo" es el trasplante de un individuo a otro, en donde los individuos tienen genes en uno o más locus que no son idénticos en la secuencia en los dos individuos. Un trasplante alogénico puede ocurrir entre dos individuos de las mismas especies, que se diferencian genéticamente, o entre individuos de dos diferentes especies. Un "trasplante autólogo" es el trasplante de un tejido o una porción del mismo de un sitio a otro en el mismo individuo, o el trasplante de un tejido o una porción del mismo desde un individuo a otro, donde los dos individuos son genéticamente idénticos.

A menos que se explique de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por alguien medianamente experto en la técnica al cual pertenece esta

descripción. Los términos singulares “uno”, “una”, y “el” incluyen los términos plurales a menos que el contexto claramente indique otra cosa. De manera similar, la palabra “o” pretende incluir “y” a menos que el contexto claramente indique otra cosa. Se debe entender, adicionalmente, además, que todos los tamaños de las bases o los tamaños de los aminoácidos, y todos los valores de los pesos moleculares o las masas moleculares, dados para los ácidos nucleicos o los polipéptidos son aproximados, y se suministran para descripción. El término “comprende” significa “incluye”. En caso de conflicto, la presente especificación, que incluye explicaciones de los términos, tendrá prevalencia. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Ligando de selectina aislado de células de algas verde azuladas.

Se describe aquí un extracto acuoso de algas verde azuladas, tales como la *Aphanizomenon flos aquae* (AFA), que esta enriquecida para un ligando de selectina, tal como un ligando de L-selectina. En una realización, el extracto es “Extracto A” un extracto acuoso que incluye compuestos polares rápidamente disueltos en el agua o solución salina, que están enriquecidos por un ligando de selectina, tal como el ligando de L-selectina. Este extracto se seca utilizando un proceso conocido, y se resuspende en una solución acuosa.

El *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) se puede fraccionar. Se ha descrito el proceso para hacer crecer, cosechar, y concentrar células de algas verde azuladas. El AFA se puede aislar de cualquier fuente. La fuente puede ser una fuente natural de algas verde azuladas, tales como un lago (por ejemplo el Lago Klamath). La fuente también puede ser una fuente hecha de algas verde azuladas tales como un lago artificial o una fuente de agua. La fuente puede ser un ambiente producido para hacer crecer y cosechar algas verde azuladas comercialmente.

Las algas verde azuladas se pueden utilizar directamente, o se pueden almacenar como líquido, líquido congelado, secado por congelamiento, o secado utilizando el método descrito adelante. En una realización, las algas verde azuladas son cosechadas y secadas utilizando la tecnología REFRACTANCE WINDOW™. El término tecnología “REFRACTANCE WINDOW™” se refiere a un sistema en donde el secador utiliza las específicas propiedades del agua para llevar el agua hacia afuera del producto. En resumen, cuando se coloca agua sobre una fuente de calor, el calor se dispersa en el agua a través de convección. En la medida en que este absorbe calor, el agua transmite energía infrarroja al exterior en tres vías: evaporación, conducción y radiación. Si la superficie de la superficie del agua está cubierta por un medio transparente tal como plástico, la evaporación y su pérdida de calor asociada está bloqueada y solo ocurre conducción. La membrana plástica actúa como un espejo que refleja la energía infrarroja. Cuando un material húmedo, tal como las algas verde azuladas se colocan en una superficie plástica, el agua en el material crea una “ventanas” que permiten el paso de la energía infrarroja. Se cree que en este sistema el agua en el material permite que ocurra la radiación, conducción y evaporación, suministrando una transferencia de calor excepcionalmente efectiva. Sin embargo, después de pocos minutos, en la medida en que el material se seca, la “ventana” infrarroja se cierra y la conducción permanece como los únicos medios para la transferencia de calor. En razón a que el plástico es un pobre conductor del calor, se pierde poco calor y se transfiere al producto. Por lo tanto, cuando se seca con la tecnología REFRACTANCE WINDOW™, las algas se exponen a calor solo brevemente.

En este sistema de secado, las algas líquidas (células suspendidas en solución) se colocan sobre la superficie de una correa transportadora del secador. La correa es mylar grado alimento (película de poliéster transparente) ubicada en la superficie del agua caliente. El calor proveniente del agua circulante se conduce a la correa y luego el agua presente en el producto se seca, acelerando suavemente el proceso natural de evaporación mientras que se protegen los nutrientes naturales. En la medida en que el producto se seca y el agua se evapora, el calor cesa de ser transmitido al producto. Sin estar unido por la teoría, esta evita la degradación de los polipéptidos, los ácidos nucleicos, los nutrientes y los pigmentos. Así, el proceso de secado mantiene la temperatura de las algas muy por debajo de la temperatura del agua circulante por debajo de la correa transportadora.

Otros sistemas de secado se pueden utilizar para producir algas secas. Generalmente, dos factores juegan un papel en la degradación de las algas: el grado de calor y el tiempo de exposición al calor. Aplicando una alta cantidad de calor durante un corto periodo de tiempo da como resultado una menor degradación de los componentes de las algas verde azuladas. En un ejemplo, se aplica calor, tal como una temperatura de aproximadamente 65°C a 80°C, tal como una temperatura de aproximadamente 70°C a 75°C, o aproximadamente 72°C. El calor se puede aplicar durante una cantidad suficiente de tiempo para secar las algas, tales como aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, o aproximadamente 2 a aproximadamente 10 minutos, o durante aproximadamente 3 a aproximadamente 7 minutos. En un ejemplo, se aplica calor a las algas a 72°C durante solamente 3 a 5 minutos. Este proceso es conocido por alguien medianamente versado en la materia, y se describe de manera completa en el sitio de la Rossha Enterprises, y se describe en Abonyi et al., “Evaluation of Energy Efficiency and Quality Retention for the REFRACTANCE WINDOW™ Drying System: Research Report” Washington State University, Pullman, WA, December 30, 1999. Sin embargo, también se pueden utilizar células secadas por congelamiento.

Tal como se describe aquí, se puede preparar un extracto de células de algas verde azuladas de *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) frescas, deshidratadas o preservadas. Las algas se pueden extraer con agua o una solución salina amortiguada adecuada. Por ejemplo, se utiliza agua o soluciones amortiguadas, en general de un pH neutro (aproximadamente pH 7.0 a aproximadamente pH 7.8, tal como aproximadamente pH 7.2 a aproximadamente pH

7.6, o aproximadamente pH 7.4). Las soluciones salinas amortiguadas adecuadas son bien conocidas en la técnica e incluyen solución salina amortiguada de fosfato (tal como, aproximadamente, 0.1 M de solución salina amortiguada de fosfato) y medios de cultivo comercialmente disponibles. La extracción acuosa se efectúa generalmente por debajo de la temperatura ambiente (generalmente 25°C), tal como una temperatura de aproximadamente 3°C a aproximadamente 15°C, tal como aproximadamente 4°C a aproximadamente 10°C, o aproximadamente 4°C, pero la extracción también se puede efectuar a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

En un ejemplo, un gramo de material de algas seco de *Aphanizomenon flos aquae* (AFA), se suspende en aproximadamente 10 ml a aproximadamente 50 ml, tal como aproximadamente 40 ml de solución salina amortiguada de fosfato (por ejemplo, 0.1 M de solución salina amortiguada de fosfato, pH 7.4), y se incuba a 4°C. Esta incubación puede durar 5 minutos, media hora, varias horas, o toda la noche. En varios ejemplos, las algas se incuban en una solución acuosa durante aproximadamente la media hora a aproximadamente dos horas, aproximadamente la media hora a aproximadamente tres horas, o aproximadamente media hora a aproximadamente doce horas. Las algas suspendidas en la solución salina amortiguada se pueden proteger de la luz para disminuir la degradación. Luego de incubación en la solución acuosa, el material sólido se separa del extracto acuoso. La mezcla de algas en la solución acuosa, tal como la solución salina, se puede mezclar por inversión repetida del frasco, y se centrifuga para remover el material sólido. Por ejemplo, la suspensión se puede centrifugar en 400 g durante 10 minutos.

Luego de la separación del material sólido, el sobrenadante, que generalmente aparece de color azul, se aísla. El extracto se denomina "extracto A". Este sobrenadante se puede esterilizar opcionalmente, tal como mediante filtración. En un ejemplo, se decanta un sobrenadante azul brillante luego de la centrifugación y el filtrado estéril utilizando un filtro de 0.22 mm. Este filtrado se puede almacenar, tal como a aproximadamente 4°C en la oscuridad.

El extracto que contiene el ligando de selectina, tal como el ligando de L-selectina, tal como el Extracto A, se puede secar, tal como se describió anteriormente. En un ejemplo, calor, tal como una temperatura de aproximadamente 65°C a aproximadamente 80°C se aplica al extracto acuoso, tal como una temperatura de aproximadamente 70°C a aproximadamente 75°C o aproximadamente 72°C. El calor se puede aplicar durante una cantidad suficiente de tiempo para secar el extracto, tal como aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, o durante aproximadamente 2 a aproximadamente 10 minutos, o durante aproximadamente 3 a aproximadamente 7 minutos. En un ejemplo, el calor se aplica al extracto a 72°C durante solamente 3 a 5 minutos. Este proceso es similar al proceso para secar algas (ver Abonyi et al., "Evaluation of Energy Efficiency and Quality Retention for the REFRACTANCE WINDOW™ Drying System: Research Report" Washington State University, Pullman, WA, December 30, 1999). Una persona medianamente versada en la materia podría fácilmente producir un producto seco desde un extracto acuoso utilizando las metodologías conocidas.

En varios ejemplos no limitantes, específicos, una cantidad efectiva del extracto que contiene selectina de las algas verde azuladas, tal como un extracto acuoso enriquecido por un ligando de L-selectina es de aproximadamente 0.25 gramos a aproximadamente 5 gramos, o de aproximadamente 0.5 gramos a aproximadamente 5 gramos, o de aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 2 gramos de un extracto acuoso seco, tal como el Extracto A. En un ejemplo no limitante, específico, la cantidad efectiva del extracto que contiene selectina de algas verde azuladas es de aproximadamente un gramo de un extracto acuoso seco, tal como el Extracto A.

Un ligando de selectina se puede purificar adicionalmente del Extracto A acuoso. Por ejemplo, el ligando de selectina se aísla utilizando purificación de afinidad. En un ejemplo, el Extracto A es puesto en contacto con un sustrato sólido que incluye la L-selectina, la P-selectina, o la E-selectina. Se pueden utilizar gránulos magnéticos covalentemente unidos a una selectina, tal como la L-selectina humana. Una secuencia de aminoácido de ejemplo de la L-selectina humana se establece como el número de acceso NP_000646 del GENBANK; una secuencia de aminoácidos de ejemplo de L-selectina de murino se establece como CAB55488 y una secuencia de ejemplo de una L-selectina de ratón se establece como el No. De Acceso a AAH52681 DEL GENBANK. Secuencias de ejemplo adicionales de L, P, y E selectinas se pueden encontrar en la base de datos del GENBANK.

La selectina puede ser una molécula nativa, tal como una L-selectina humana, una P-selectina humana, una L-selectina de murino, o una P-selectina de murino. La selectina también puede ser una forma trabajada por ingeniería genética tal como una molécula recombinante que es una forma estable de la L-selectina, y/o una molécula que incluye un fragmento de una selectina, tal como la porción extracelular de la molécula de L selectina humana. En un ejemplo, la selectina es una proteína de fusión en la cual la porción extracelular de la L-selectina humana y la porción Fc de la inmunoglobulina. Tales proteínas de fusión recombinantes están comercialmente disponibles, tales como de, por ejemplo, R&D Systems, y se pueden ordenar a través de la Internet. El sustrato sólido covalentemente unido a la selectina, tal como, pero no limitada, la L-selectina, se incuba con el sobrenadante "Extracto A" (el extracto soluble en agua de las algas verde azuladas).

El material proveniente de las algas que se une específicamente a la selectina es luego aislado. Por ejemplo, el ligando de selectina se puede dividir de la molécula de selectina recombinante utilizando un tratamiento con ácido. El ligando de selectina también se puede dividir de la molécula de selectina recombinante utilizando un tratamiento alcalino y/o utilizando un tratamiento con calor.

Tal como se describió aquí, el ligando de selectina aislado tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 60 kDa, tal como aproximadamente 55 kDa, bajo condiciones reductoras. En un ejemplo, el ligando de selectina aislado tiene un peso molecular de aproximadamente 54 kDa o aproximadamente 57 kDa bajo condiciones reductoras. En una realización, el ligando de selectina no forma un complejo. Por ejemplo, el ligando de selectina puede no formar un complejo con sí mismo o con otro ligando de selectina.

En varios ejemplos, bajo condiciones no reductoras, el ligando de selectina se puede asociar en un complejo. Así, si un complejo de tres subunidades de 54 kDa se forma bajo condiciones no reductoras el peso molecular es de aproximadamente 162 kDa y si se forma el complejo de tres subunidades de 57 kDa el peso molecular aparente bajo condiciones no reductoras es de aproximadamente 171 kDa. Sí un complejo de tres subunidades de 54 kDa y tres subunidades de 57 kDa se forma bajo condiciones no reductoras el peso molecular del complejo es de aproximadamente 233 kDa. Así, el ligando de selectina purificado puede tener un peso molecular de aproximadamente 200 kDa bajo condiciones no reductoras. Sí se forma un complejo de cada uno de los ligandos, entonces el peso molecular aparente del complejo es aproximadamente de 111 kDa. De manera alternativa, las dos subunidades pueden no ser un complejo, y el peso molecular aparente bajo condiciones no reductoras será el mismo que bajo condiciones reductoras. El ligando de selectina puede ser una proteína o una glicoproteína.

Los extractos y las composiciones descritas aquí se pueden administrar en cualquier forma, incluyendo sólidos tales como tabletas o polvos o como una preparación líquida. En un ejemplo, las composiciones se formulan por administración entérica. Un ejemplo de una formulación de uso es una preparación farmacéutica (tal como una tableta, un líquido entérico, un líquido parenteral, cápsula, líquido intranasal u otra forma). Un ejemplo particular descrito en la composición es una preparación farmacéutica. En particular una tableta o cápsula. Como es conocido en la técnica, las composiciones adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, obleas, o tabletas, que contiene cada una, una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición, como polvo o gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso. Así, las formas de dosis incluyen tabletas, capsulas, dispersiones, soluciones, cápsulas y similares. En razón a su fácil administración, las tabletas y las cápsulas representan una forma unitaria de dosis oral conveniente, en la cual se emplean portadores farmacéuticos sólidos de cubierta como se describió anteriormente. Sin embargo, los compuestos también se pueden administrar mediante medios de liberación controlada, o se pueden formular por otros medios de suministro, tales como, pero no limitados a suministro intranasal o transdérmico.

Las composiciones pueden incluir ingredientes inactivos tales como agentes de unión, (tales como almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); los ligadores o rellenos (tales como lactosa, pentosan, celulosa microcristalina o hidrogenfosfato de calcio); lubricantes (tales como estearato de magnesio, talco o sílica), desintegrantes (tal como almidón de papa o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (tales como laurilsulfato de sodio).

En un ejemplo, una tableta que contiene las composiciones descritas aquí, tales como pero no limitadas a un extracto enriquecido para un ligando de L-selectina o una forma sólida de la misma, o un ligando de selectina purificado, se pueden preparar mediante compresión o moldeo, opcionalmente, con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar mediante compresión en una máquina adecuada, en la forma de flujo libre tal como polvos o gránulos de un extracto seco y/o ligando de selectina, opcionalmente mezclado con un ligador, lubricante, diluyente inerte, agente activo de superficie dispersante. La composición tal como la tableta, puede incluir componentes farmacéuticamente aceptables tales como lactosa, glucosa, sacarosa, almidón de maíz, almidón de papa, ésteres de celulosa tal como acetato de celulosa, etil celulosa, estearato de magnesio, silicato de magnesio, sílica precipitada, talco, ácidos grasos tales como ácido esteárico, celulosa microcristalina, cera carnauba y similares. Las tabletas o capsulas se pueden recubrir mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o ellos se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otros vehículos adecuados antes de uso (ver la sección de ejemplos). Tales preparaciones líquidas se pueden preparar mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables que son agentes inactivos, tales como agentes de suspensión (tal como jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsificantes (tal como lecitina o acacia), y preservantes (tal como metilo propil-p-hidroxibenzoatos o ácidos sórbicos). Las composiciones también se pueden hacer de un sabor agradable, y así pueden contener sales amortiguadas, saborizantes, colorantes y agentes endulzantes según sea adecuado.

Los diluyentes y otros ingredientes inactivos tales como uno o más agentes de unión farmacéuticamente aceptables, rellenos, soportes, agentes espesantes, agentes mejoradores del sabor, agentes colorantes, preservantes, estabilizantes, reguladores, emulsificantes, agentes de flujo, absorbentes, y similares o mezclas de los mismos se pueden utilizar dependiendo de la forma de la composición empleada. La composición también puede incluir un endulzante, tal como un endulzante natural (por ejemplo, azúcar o miel) o un endulzante artificial (por ejemplo sacarina, si se desea). En general, los ingredientes portadores, azúcares, diluyentes, estabilizadores, amortiguantes, saborizantes y texturizantes son considerados como ingredientes inactivos, en la medida en que ellos no imparten un efecto terapéutico en o de los mismos.

La composición incluye uno o más extractos adicionales de *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) que induce la migración de las células madre. Este extracto se puede obtener al extraer *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) líquido en, etanol. En un ejemplo, se produce el extracto adicional al extraer *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) en aproximadamente 10% a aproximadamente 20% de etanol. En un ejemplo, la composición incluye un extracto
 5 preparado al extraer *Aphanizomenon flos aquae* (AFA), *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) líquido en aproximadamente 10% de etanol. En un ejemplo, el extracto adicional se produce al incubar AFA líquido en aproximadamente 10% de etanol a una temperatura de aproximadamente 65°C a aproximadamente 85°C que se aplica al extracto acuoso, tal como una temperatura de aproximadamente 70°C a aproximadamente 90°C o
 10 aproximadamente 85°C. La solución es luego centrifugada y el sobrenadante se seca (ver anteriormente). En una realización, se administra al sujeto aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg, tal como aproximadamente 100 mg a aproximadamente 250 mg, tal como aproximadamente 150 mg del producto seco.

En un ejemplo, una composición de uso incluye aproximadamente 0.25 gramos a aproximadamente 5 gramos, desde aproximadamente 0.5 gramos a aproximadamente 5 gramos, o desde aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 2 gramos de un extracto que contiene selectina, tal como una forma sólida de un extracto acuoso enriquecido por un ligando de L-selectina, tal como el Extracto A. En un ejemplo no limitante específico, la
 15 composición incluye aproximadamente 1 gramo de extracto seco que contiene selectina de algas verde azuladas (tal como AFA), tal como una forma sólida de una forma enriquecida de un extracto acuoso enriquecido de un ligando de L-selectina, tal como el Extracto A. La composición también incluye aproximadamente 150 mg de un segundo extracto seco de AFA, en donde el segundo extracto seco se produce al incubar AFA en aproximadamente 10% a
 20 aproximadamente 20% de etanol en aproximadamente 70°C a aproximadamente 90°C durante aproximadamente 1 a 3 horas, tal como al incubar a AFA en aproximadamente 10% de calor a aproximadamente 850°C durante aproximadamente 1 a 3 horas.

Mejoramiento de la Movilización de la Célula Madre.

Se describe un método aquí para mejorar la movilización de la célula madre al administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto acuoso de algas verde azuladas tales como *Aphanizomenon flos aquae*
 25 (AFA, enriquecido por un ligando de selectina tal como L-selectina, y/o una cantidad terapéuticamente efectiva de un ligando de selectina purificado. El ligando de selectina puede ser un ligando de L-selectina, P-selectina, y/o E-selectina. Los ligandos de selectina estimulan la liberación de células madre (Frenette and Weiss, Blood 196(7): 2460, 2000). El sujeto puede ser cualquier sujeto, tal como un humano o un sujeto veterinario.

Un extracto acuoso de algas verde azuladas enriquecido por un ligando de selectina, tal como L-selectina se puede administrar solo o en combinación con otros agentes. En varias realizaciones, una forma sólida del extracto acuoso enriquecido por un ligando de selectina (o una forma sólida del mismo) se incluye en una composición farmacéutica
 30 junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Las cantidades terapéuticamente efectivas o los componentes adicionales, tales como las formas sólidas de extractos adicionales, también se pueden administrar al sujeto.

El extracto acuoso se seca, de tal manera que se produce una forma sólida, y una cantidad terapéuticamente efectiva de la forma sólida se administra a un sujeto de interés. La cantidad terapéuticamente efectiva del extracto, tal como un extracto acuoso de algas verde azuladas enriquecido por un ligando de selectina, es de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 g por kg de peso de cuerpo, tal como aproximadamente 0.05 a
 35 aproximadamente 0.5 gramos por kg de peso de cuerpo, o de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 gramos por kg de peso de cuerpo. En otro ejemplo no limitante, específico, la cantidad efectiva de la forma sólida de un extracto acuoso de algas verde azuladas enriquecido por un ligando de selectina es de aproximadamente 0.25 gramos a aproximadamente 5 gramos, de desde aproximadamente 0.5 gramos a aproximadamente 5 gramos, o desde aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 2 gramos. En un ejemplo no limitante, específico, la cantidad efectiva de la forma sólida del extracto acuoso de algas verde azuladas enriquecidas forman un ligando de selectina
 40 y es de aproximadamente 1 gramo.

Los agentes activos de la composición descritos aquí se pueden mezclar con un portador. En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración a ser empleado. Por ejemplo, las formulaciones parenterales usualmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente
 50 aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas balanceadas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como un vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, polvo, píldoras, tabletas, o formas de cápsula) portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados de manitol farmacéutico, lactosa, almidón, o estearato de magnesio. Además de los portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas al ser administradas pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsificantes, preservantes, y agentes amortiguantes del pH y similares, por ejemplo
 55 acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Esta cantidad efectiva se puede administrar a una frecuencia dada, tal como aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente 2 veces a la semana, aproximadamente 3 veces a la semana, una vez al día, aproximadamente 2 veces al día, aproximadamente 3 veces al día, o más. Una persona medianamente versada en

la materia puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente efectiva de un ligando de selectina purificado, o un extracto acuoso enriquecido de un ligando de selectina. En un ejemplo no limitante, específico, se evalúa la cantidad de células madre circulantes, tal como la cantidad de células que expresan CD34.

5 La cantidad terapéuticamente efectiva de un sólido proveniente de un extracto acuoso de algas verde azuladas enriquecido por un ligando de selectina y la frecuencia de administración de estas composiciones, puede depender de una variedad de factores, tales como el género o las especies de algas utilizadas, la salud general del sujeto a ser tratado, y las características fisiológicas (por ejemplo altura, peso, porcentaje de grasa del cuerpo, metabolismo), del sujeto a ser tratado. El extracto acuoso se seca, y luego la cantidad específica se disuelve en un portador y posteriormente se administra al sujeto.

10 Se suministran aquí ensayos específicos para determinar una cantidad terapéuticamente efectiva del extracto acuoso, tal como, un ligando acuoso enriquecido por una selectina. En un ejemplo no limitante, específico, diferentes cantidades de extracto que contienen ligando de selectina de algas verde azuladas, tales como AFA, son consumidas por sujetos humanos y se detecta y/o analiza la presencia y/o cantidad de células madre (que puede incluir subtipos de tales células) presentes en el sistema circulatorio. En otra realización, se utiliza un modelo animal
15 (tal como un ratón, rata, u otro modelo veterinario), y la población de las células madre recientemente integrada se vigila en varios tejidos (ver los ejemplos de adelante). Se debe notar que los métodos descritos tienen igual aplicación en configuraciones médicas y veterinarias.

20 Sin importar como se suministra o administra, el extracto de algas verde azuladas induce un incremento transitorio en la población de células madre circulante, tales como células madre CD134+ o y/o células CD133+. El extracto de algas verde azuladas también puede incluir un incremento transitorio en las células madre que se puede medir mediante amino acetaldehído fluorescentemente marcado. Este procedimiento se describe en el sitio de red de las células madre (ver <http://www.stemcell.com/technical/aldefluor.asp>, ver también http://www.stemcell.com/technical/12_aldefluor.pdf). En resumen, el amino acetaldehído marcado fluorescentemente se puede difundir libremente hacia las células. Una enzima ALDH intracelular (aldehído deshidrogenasa) se
25 convierte en un amino acetato marcado fluorescentemente, puede no difundirse hacia afuera de las células. Así, las células que tienen una enzima ALDH (tal como las células madre) se vuelven fluorescentes. Otras células (tales como las células que no son células madres, incluyen células diferenciadas) aparecen no fluorescentes después del lavado.

30 El mejoramiento de la movilización de las células madre se puede medir al evaluar la respuesta de las células madres a una dosis particular de extracto de algas verde azuladas. En una realización, que suministra un ligando de selectina purificado proveniente de algas verde azuladas a un sujeto se mejorara la movilización de esas células madre del sujeto dentro de un cierto periodo de tiempo, tal como menos de aproximadamente 5 horas, menos de aproximadamente 4 horas, menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 10 minutos luego de la administración.

35 En una realización, la administración del extracto acuoso de las algas verde azuladas enriquecido para un ligando de selectina, da como resultado la movilización de las células madre en la circulación de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 minutos luego de la administración. Las células madre movilizadas ingresarán al sistema circulatorio, incrementado así el número de células madre circulantes dentro del cuerpo del sujeto. El incremento porcentual en el número de células madres circulantes comparado con una línea base normal puede ser de
40 aproximadamente 25%, aproximadamente 50%, aproximadamente 100% o mayor del 100% de incremento comparado con un control. En una realización, el control es el valor de línea base del mismo sujeto. En otra realización, el control es el número de células madre circulantes en un sujeto no tratado, o en un sujeto tratado con un placebo o un portador farmacológico.

45 En algunas realizaciones, el sujeto es saludable. En otras realizaciones el sujeto está sufriendo de una enfermedad o condición fisiológica, tal como inmunosupresión, enfermedad crónica, daño traumático o enfermedad degenerativa. En ciertas realizaciones, el sujeto sufre una enfermedad o condición de la piel, sistema digestivo, sistema nervioso, sistema linfático, sistema cardiovascular, o sistema endocrino. En realizaciones específicas, el sujeto sufre de osteoporosis, enfermedad de Alzheimer, infarto cardiaco, enfermedad de Parkinson, daño traumático del cerebro, esclerosis múltiple, cirrosis hepática, o cualquier enfermedad o condición descrita en los ejemplos de adelante.

50 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se suministran para ilustrar las características particulares de varias realizaciones descritas. El alcance de la presente invención no se debe limitar a aquellas características ejemplificadas.

Ejemplo 1

Producción de AFA y extracción

Algas verde azuladas, *Aphanizomenon flos aquae* (AFA), se aislaron del lago Klamath. Las algas verdeazuladas se secaron utilizando tecnología REFRACTANCE WINDOW™.

5 Un gramo de material seco de algas se resuspendió en 10 ml de solución salina amortiguada de fosfato y se incubó en 1 hora a 4°C y se protegió de la luz. Esta agua nieve se mezcló durante inversión repetida del frasco, y se centrifugo a 400g durante 10 minutos. El sobrenadante azul brillante se decantó y se filtró estéril utilizando 0.22 mm de filtro. Este filtrado se almacenó en frío y en oscuro y se utilizó el mismo día de preparación. Este extracto se denominó Extracto A.

Ejemplo 2

Ligando de selección extraído de AFA-W: materiales y métodos

10 Amortiguadores y medios: para los cultivos celulares, las células fueron resuspendidas y cultivadas en RPMI-1640 con 10% de suero de ternero fetal, 1% de penicilina y estreptomycin, y L-glutamina. Para inmunoteñido, las células fueron lavadas, resuspendidas, y teñidas en solución salina amortiguada de fosfato que contiene 0.02% de Azida y 1% de suero de terno fetal o seroalbumina bobina. Para diseños de proliferación y para ensayos de electroforesis de fosfotirosina, las células se prepararon en RPMI 1640 con rojo fenol, 10% de suero de terno fetal (Gibco, Grand Island NY), 1% de glutamina, 1% de penicilina y 1% de estreptomycin.

15 Extractos Cianobacteriales: polvo seco de algas verde azuladas de agua fresca de *Aphanizomenon flos aquae* (AFA) se obtuvieron del lago Klamath superior en Oregón, USA. Para los primeros experimentos, se usó un polvo secado por congelamiento. Para los últimos experimentos, se obtuvo un polvo proveniente de Desert Lake Technologies LLC, Keno, OR, que se había secado utilizando la tecnología de secado REFRACTANCE WINDOW™. El polvo seco de *Spirulina platensis* se obtuvo de Healthforce Nutritional Inc, Escondido CA. Un gramo de material de alga seco se resuspendió en 10ml de solución salina amortiguada de fosfato y se incubó durante toda la noche a 4°C y se protegió de la luz. El agua nieve se mezcló mediante inversión repetida del frasco, y se centrifugo a 400g durante 10 minutos. El sobrenadante azul brillante se decantó y se filtró estéril utilizando solo 0.22 mm de filtro. Este filtrado se almaceno en frío y oscuridad, y se utilizó en el mismo día de preparación.

25 Anticuerpos monoclonales: El anticuerpo monoclonal CD62L TQ1 (específico para el área de unión del ligando de la molécula L selectina) unido a ficoeritrina (PE), se compró de Coulter (Hialech, FL). CD45-PerCP, CD11b-PE, CD14-PE y los anticuerpos de control de anticuerpos se obtuvieron de Becton-Dickinson.

30 Captura de ligando utilizando Dynabeads y proteína quimera: Con el fin de identificar el peso molecular del compuesto que se une a la selectina, se utilizó un método libre de células, en el cual Dynabeads (DynaL Biotech., Lake Success, NY) recubiertas con proteína G se incubaron con una proteína quimera de selectina (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN). La proteína quimera es una fusión del domino extra celular de L-selectina, P-selectina, o E-selectina humana, con una porción Fc de inmunoglobulina G humana. La proteína quimera se ligó a las *Dynabeads* recubiertas con proteína G utilizando el protocolo recomendado por el fabricante, en el cual los gránulos se encubaron durante 1 hora, en 5.4 mg/ml de solución recientemente hecha de dimetilpimelimidato x 2HC1 (Sigma Aldrich) en 0.2 M de amortiguador de trietanolamina pH 8.0 (Sigma Aldrich). El reticulamiento se detuvo al remover los gránulos provenientes de la solución reticulantes, y se resuspendieron en 50 mM de amortiguador TRIS Ph 7.5 (Sigma Aldrich) durante 15 minutos. La quimera no unida se eluyó de los gránulos mediante dos lavados en amortiguador de citrato/ácido cítrico pH 2.8. Los gránulos fueron entonces lavados varias veces en PBS pH 7.4, y agregados a un extracto de agua AFA recientemente hecho. El material unido proveniente del extracto de agua AFA se eluyó en una de tres maneras: 1) al hervir en un amortiguador en Leammli que contiene beta-mercaptoetanol, 2) eluyendo con pH 12.5, y 3) competencia por el sitio de unión de ligando de selectina utilizando ligandos de selectina conocidos. Se encontró que un compuesto de aparentemente idéntico peso molecular se purificó por afinidad tanto para la L-selectina como la P-selectina.

45 En experimentos paralelos, los gránulos recubiertos con proteína de fusión de L-selectina/IgG1 humana recombinante se utilizaron para ver si el extracto de agua similar proveniente de otras algas verde azuladas, *Spirulina platensis*, contenían un compuesto de unión de selectina similar.

50 Electroforesis: Las muestras de eluyente proveniente del método de afinidad Dynabead se prepararon mediante electroforesis de gel al mezclar 1:1 v/v en un amortiguador de muestra Leammli (Biorad cat# 161-0737) con mercaptoetanol. Se efectuó la electroforesis de gel SDS en 4-15% de geles (BioRad) en amortiguador TRIS/glicina/SDS (Biorad cat# 161-0732) durante 1 hora a 120 V.

La electroforesis para proteína nativa se efectuó con reactivos libres de SDS, utilizando un amortiguador de muestra nativo (Biorad cat# 161-0738) para cargar y un amortiguador TRIS/glicina (Biorad cat# 161-0734) para electroforesis.

Sujetos humanos: voluntarios humanos saludables se reclutaron con consentimiento informado por el personal de laboratorio y estudiantes de entre 20 y 45 años de edad. Se obtuvieron muestras de sangre mediante venopunción bajo condiciones asépticas, y se procesaron inmediatamente.

5 Aislamiento de células Mononucleares de sangre periférica (PBMC): la sangre venosa periférica se puso en capa sobre un Ficoll-hypaque (Amersham), y se centrifugó durante 25 minutos a 400g. La interface rica en PBMC se cosechó, y las células se lavaron dos veces en RPMI.

10 Aislamiento de células nucleadas Polimórficas (PMN): Células venosas periféricas se mezclaron con dextrano 70 en 0.9% de solución salina a una concentración final de 1% de dextrano a temperatura ambiente. Se permitió la sedimentación durante 1 hora. El sobrenadante rico en leucocitos se cosechó y los leucocitos se peletizaron mediante centrifugación. Los gránulos se resuspendieron en 2 ml de solución salina amortiguada de fosfato que luego se puso en capas sobre la parte superior de 3 ml de Ficoll-Hypaque y se efectuó centrifugación con gradiente para separar las células mononucleares (linfocitos y monocitos) de los neutrófilos. El gránulo que contiene neutrófilo se resuspendió en solución salina. Las células se lavaron, resuspendieron en un medio rico en nutrientes (RPMI 1640), y se mantuvieron en hielo hasta uso.

15 Inmunoteñido para L-selectina: se distribuyeron leucocitos de sangre periférica frescos y fijados con normalina en pozos de una placa microtítulo de 96 pozos con fondo en V en una concentración aproximada de 10^5 células por pozo. Un extracto a base de agua recientemente preparado de algas verde azuladas AFA se preparó en solución salina fisiológica en diluciones efectuadas en serie. Las células fueron resuspendidas en PBS-AFA-W, PBS-AFA-W-azida, o PBS-PC en varias diluciones. Las células fueron incubadas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos. La fracción no fija no estuvo en contacto con azida de sodio durante el tratamiento con extracto AFA, pero se resuspendió en amortiguador que contiene azida de sodio para el posterior inmunoteñido. Esto fue para permitir los movimientos libres del citoesqueleto y eliminación de L-selectina. La fracción que se mantuvo en 0.02% de azida de sodio estuvo en contacto con azida de sodio durante el procedimiento completo, tanto el tratamiento con extracto AFA, como el posterior inmuno teñido, este bloqueo el movimiento del citoesqueleto y reduciría o bloquearía el desprendimiento de L-selectina. Después de la incubación o sin AFA-W, se agregó amortiguador, y las células se centrifugaron. El sobrenadante se descartó, y las células se resuspendieron en un volumen de 50 μ l de solución salina amortiguada de fosfato que contiene 1% de suero de becerro fetal y 0.05% de azida. Se agregaron las cantidades óptimas de anticuerpos monoclonales, según se determinó por titulaciones previas. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agregó el amortiguador, y las placas se centrifugaron. Se descartaron los sobrenadantes, se resuspendieron las células en 50 μ l de amortiguador, y se fijaron en 1% formalina. Las muestras se mantuvieron frías y a oscuras hasta adquisición mediante citometría de flujo. La adquisición se efectuó durante de las 24 horas luego de la fijación.

35 Inmunoteñido para la expresión de CXCR4 inducida por los ligandos de L-selectina: La unión de Fucoidán a la L-selectina da como resultado una externalización del CXCR4 hecho previamente en la superficie celular, seguido por internalización, creando una ventana de tiempo para la respuesta a los factores quimiotácticos. Este sistema se utilizó para examinar si el AFA-W competiría con el Fucoidán por la unión a la L-selectina en la superficie celular del glucosito, y para evaluar si esta bloquearía este efecto funcional de otro ligando de L-selectina. Para hacerlo así, el PBMC humano recientemente purificado se resuspendió en RPMI y se distribuyó en una serie de micropozos de fondo redondo. Se agregó Fucoidán a una serie de pozos, AFA-W a otra serie, y se agregó una mezcla de Fucoidán AFA-W a la tercera serie de pozos. En diferentes puntos de tiempo (1, 10, 20, 30, 40, 60 minutos) el PBS que contiene la azida de sodio se agregó a los pozos con el fin de detener los movimientos del citoesqueleto, y de esta manera detener el reciclaje del CXCR4, permitiendo el teñido para el CXCR4 expresado en la superficie celular en cada punto de tiempo. Las células se lavaron en solución salina amortiguada con fosfato que contiene azida, se tiñó con CXCR4-P utilizando el protocolo estándar descrito anteriormente, fijado en formalina, y analizado por citometría de flujo.

Estimación del peso molecular de los componentes nativos versus los desnaturalizados del ligando de selectina proveniente de AFA: Se midieron las distancias en el gel para los marcadores de peso molecular conocido. La posición del ligando de selectina derivado de AFA (doble banda) se graficó en esa gráfica.

Ejemplo 3

50 Las células madre se movilizan mediante un extracto acuoso proveniente de AFA

Estos experimentos descritos adelante demuestran que un extracto acuoso de AFA (Extracto A, también denominado "AFA-W") esta enriquecido para un ligando de selectina y se puede utilizar para mejorar la movilización de las células madre CD34+.

55 Se identificaron voluntarios humanos saludables, y se evaluó la proporción de las células CD34+ en la sangre periférica (células CD34+ circulantes) de cada persona antes del consumo del extracto que contiene selectina de las

algas verde azuladas así como también 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos después del consumo. A los voluntarios se les instruyó limitar la actividad física y mental durante un tiempo antes y después del consumo del extracto de AFA.

5 En una realización, se extrajeron 5 gramos de AFA secos en 40 ml de agua y el participante bebió el agua. En otra realización, los participantes consumieron 750 mg de extracto que contiene ligando de L-selectina seco de AFA. Las células sanguíneas rojas en muestras de sangre completas obtenidas de cada voluntario se lisaron utilizando solución lisante FACS (Beckton-Dickinson, San Jose, CA). El resto de las células se lavó y se tiñó con anticuerpo monoclonal HPCA-2 conjugado con isotiocianato de fluoresceína. Las muestras se fijaron en 1% de formalina y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo FacsCalibur (Beckton-Dickinson, San Jose, CA) y el software CellQuest (Beckton-Dickinson, San Jose, CA).

15 La FIG.1 ilustra que el consumo del extracto que contiene el ligando de selectina del AFA disparó un incremento transitorio en las células madres circulantes. Específicamente, el eje de las X muestra el curso en el tiempo de un experimento típico a 0, 10, 30 y 60 minutos después de la ingestión del extracto que contiene el ligando de L-selectina de AFA, expresado como un porcentaje del nivel de control. Al momento de la ingestión, la proporción de las células CD34+ circulantes es la misma que el control. Se observó un incremento en el pico en las células CD34+ circulantes en aproximadamente 10-30 minutos después del consumo. En este punto de tiempo, el número de células CD34+ circulantes se incrementó dos veces (más del 200%) sobre el valor de control. A la hora después de la digestión del extracto que contiene el ligando de selectina de AFA, las células CD34+ circulantes regresaron al valor de línea base. Por lo tanto, un extracto acuoso de AFA puede mejorar la liberación de células madre endógenas (por ejemplo, células CD34+) provenientes de la médula ósea y otros sitios anatómicos en la circulación. El consumo del extracto que contiene el ligando de selectina de AFA moviliza las células madre CD34+.

Ejemplo 4

Un extracto acuoso de AFA contiene un ligando de selectina.

25 Los experimentos descritos adelante documentan que el AFA contiene un compuesto soluble en agua que reduce específicamente el inmunoteñido del TQ1 de la L-selectina en los linfocitos, monocitos y neutrófilos humanos.

30 Las Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) se aislaron de la sangre venosa periférica de capas en Ficoll-Hypaque (Amersham), y se centrifugaron durante 25 minutos a 400g. Se cosechó la interface rica en PBMC, y las células se lavaron dos veces en RPMI. Se aislaron las Células Polimorfonucleares (PMN) al mezclar la sangre venosa periférica con dextrano 70 en una solución salina al 0.9% hasta una concentración final de 1% de dextrano a temperatura ambiente. Se permitió la segmentación durante 1 hora. Se cosecho el sobrenadante rico en leucocitos y los leucocitos se sedimentaron mediante centrifugación. El gránulo se resuspendió en 2ml de solución salina amortiguada de fosfato la cual fue puesta en capas sobre la parte superior de 3 ml de Ficoll-Hypaque, y se efectuó una centrifugación de gradiente para separar la células mononucleares (linfocitos y monocitos) de los neutrófilos. El gránulo que contiene los neutrófilos se resuspendió en solución salina. Las células se lavaron, resuspendieron en un medio rico de nutrientes (RPMI 1640), y se mantuvieron en hielo hasta uso.

40 Se distribuyeron los leucocitos de la sangre periférica frescos y fijados a formalina en los pozos de una placa de microtítulo de 96 pozos con fondo en V a una concentración aproximada de 10^5 células por pozo. Se preparó el extracto recientemente preparado a base de agua de AFA de algas verde azuladas en solución salina fisiológica y se efectuaron las disoluciones en serie. Las células se resuspendieron en BS, PBS-AFA-W, PBS-AFA-azida, o PBS-PC en varias disoluciones. Las células se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos, la fracción no fijada no estuvo en contacto con la azida de sodio durante el tratamiento con el extracto de AFA, pero se resuspendió en un amortiguador que contiene azida de sodio para el posterior inmunoteñido. Esto se hizo para permitir los movimientos libres del citoesqueleto y el desprendimiento de la L-selectina. La fracción que se mantuvo en 0.02% de azida de sodio estuvo en contacto con la azida de sodio durante el procedimiento completo, tanto el tratamiento con extracto de AFA como el posterior inmunoteñido. La azida de sodio bloquea el movimiento del citoesqueleto y reduce o bloquea el desprendimiento de la L-selectina. Por lo tanto, cualquier reducción en el teñido para la L-selectina con anticuerpo monoclonal se debe a la competencia directa con un compuesto en un extracto de AFA.

50 Después de la incubación con o sin extracto A (AFA-W) se agregó amortiguador, y las células se centrifugaron. Se descartó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en un volumen de 50 μ l de solución salina amortiguada con fosfato que contiene 1% de suero de becerro fetal y 0.05% de azida. Se agregaron las cantidades óptimas de anticuerpos monoclonales, tal como se determinaron mediante titulaciones previas. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agregó un amortiguador, y las placas se centrifugaron. Se descartaron los sobrenadantes, se resuspendieron las células de 50 μ l de amortiguador y se fijaron en 1% de formalina. Las muestras se mantuvieron en frío y oscuridad hasta la adquisición por citometría de flujo. La adquisición se efectuó en las 24 horas desde la aplicación. El anticuerpo monoclonal CD62L TQ1 (específico para el área de unión del ligando de la molécula L-selectina) unido a la ficoeritina (PE), se compró en Coulter (Hiialeah FL).

La incubación de PBMC y PMN con el extracto de agua de AFA (AFA-W) dio como resultado la reducción del inmunoteñido con anticuerpo monoclonal de L-selectina antihumano TQ1, que es conocido por ser específico para el área de unión del ligando de la L-selectina (Sepertin et al., JImmunol. 147(3):942-9,1991). La reducción medida por AFA-W del teñido de TQ1 fue más fuerte sobre los linfocitos y el PMN, pero también se observó en los monocitos (FIG. 2A). En los linfocitos y en el PMN, se observó aproximadamente 40-70 veces de reducción en el teñido del TQ1 cuando las células se preincubaron con AFA-W en contraste con una reducción de 15 veces para los monocitos

La expresión del CD11b fue ligeramente sobrerregulada, aunque no se observaron cambios significativos para los otros marcadores de adición (CD11a, CD18, CD29, CD49d, CD49e, y CD44). Los linfocitos de la sangre periférica fijados con formalina se incubaron en ausencia o presencia de diluciones en serie de AFA-W. El teñido de los linfocitos con el anticuerpo TQ1 mostró una reducción dependiente de dosis en la unión del TQ1 a la L-selectina con incremento de la concentración del extracto A. Como el efecto también fue visto en los linfocitos fijados a formalina, el teñido reducido podría no deberse al desprendimiento de la L-selectina (Fig.2).

Ejemplo 5

El ligando de selectina AFA bloquea la expresión de los receptores de quimiocina disparados por Fucoidán en la línea celular KG-1^a CF34^{brillante}

La línea celular primitiva KG-1 es brillantemente positiva para CD34 y para la L-selectina, tal como se evaluó mediante teñido con el anticuerpo monoclonal TQ1. El KG-1a también contiene reservorios intracelulares del receptor de quimiocina CXCR4 que se externalizaron luego del ligado de la L-selectina. La incubación del KG-1a con el Fucoidán, y el agonista de L-selectina, disparó la expresión del receptor de quimiocina CXCR4. El extracto A de AFA bloquea el efecto mediado por Fucoidán sobre la expresión de CXCR4 (FIG. 3).

Ejemplo 6

Purificación del ligando de L-selectina proveniente de AFA

Un ligando de selectina se aisló del AFA utilizando perlas magnéticas covalentemente unidas a proteínas de fusión trabajadas por ingeniería genética en las cuales la porción extracelular de la L-selectina o la P-selectina recombinante humana se acopla a la porción Fc de inmunoglobulina. Las perlas se incuban con la fracción soluble de AFA y se aísla el ligando de selectina (ver FIG. 4A:L-selectina, Figura 4B: P-selectina). Las perlas se recolectaron utilizando un imán y se lavaron muchas veces. Las perlas fueron entonces expuestas a un tratamiento con ácido o hervidas con un tratamiento alcalino para romper la unión entre el ligando y la selectina recombinante. El ligando de selectina también se aisló utilizando una columna de afinidad.

Cuando el ligando de selectina se recubrió bajo condiciones reductoras, este es un dímero hecho de dos subunidades de aproximadamente 54kDa y 57kDa (FIG. 4B). Una molécula compuesta basada en estas subunidades podría tener pesos moleculares de 108, 111, o 114kDa aproximadamente, y mayores multiplicidades de los mismos. Utilizando técnicas de exclusión de tamaño, cuando la fracción del extracto A se pasó a través de un filtro de 100kDa, el ligando se encontró en mayores concentraciones en la porción por encima de 100kDa. Por lo tanto, el ligando se puede aislar como un dímero de al menos 100kDa.

Ejemplo 7

El ligando de selectina extraído del AFA no se encuentra en el extracto B.

El extracto B se produjo en varias etapas, primero al extraer los compuestos en etanol, luego de regreso al amortiguador polar (agua, solución salina). La primera etapa fue producir un polvo amarillo/café proveniente de AFA seco, inicialmente durante 3 horas a 50°C con una solución acuosa que contiene 20% de etanol, el sobrenadante se decantó y los sólidos se precipitaron al agregar etanol a una concentración final del 80%. El precipitado se secó utilizando la técnica de secado REFRACTANCE WINDOWTM. Cuando este polvo amarillo se regresó a la solución acuosa (agua o solución salina) se produjo un extracto naranja. Se removieron los sólidos mediante centrifugación, y la solución estéril sobrenadante se filtró. Este líquido es el extracto B. Este extracto se incubó con las perlas magnéticas recubiertas descritas anteriormente, el extracto B no contiene un ligando de selectina (FIG. 5).

Ejemplo 8

El ligando de selectina proveniente de las algas verde azuladas modulan la expresión de CXCR4.

Las células madres se mantuvieron dentro del ambiente de la médula ósea al menos en parte a través de las moléculas de adición de selectina. Cuando la selectina se acopla mediante un ligando apropiado, ésta dispara la expresión del receptor de citocina CXCR4. El receptor CXCR4 es un receptor específico para el Factor 1 derivado de

la célula extromal (SDF-1) y la unión del SDF-1 al CXCR4 ayuda a mantener las células madre unidas a la médula ósea. La inhibición de la unión del ligando de selectina reduce la expresión del CXCR4, que conduce a la separación de las células madre provenientes de la médula ósea y su liberación en el torrente sanguíneo.

5 Para demostrar el efecto fisiológico del ligando de selectina proveniente del AFA, en una realización el ligando de selectina se probó sobre la expresión del CXCR4 disparada por el fucoídán, y un ligando de L-selectina conocido que estimula la expresión del CXCR4. La expresión de los factores del CXCR4 que siguen la exposición del fucoídán se evaluó sobre linfocitos que utilizan citometría de flujo. La incubación con el ligando de selectina AFA inhibió significativamente la expresión del CXCR4 sobre los linfocitos humanos (FIG. 6) y sobre la línea celular progenitora CD34+ KG-1a (Figura 7), indicando que este es un mecanismo por medio del cual el ligando de selectina AFA puede disparar la movilización de las células madre.

Ejemplo 9

Células madre provenientes de la médula ósea pueblan múltiples tejidos distantes.

15 Se puede utilizar un modelo para evaluar la capacidad de las células madre movilizadas por el consumo de algas verde azuladas para poblar tejidos distantes del cuerpo. Ratones macho se seleccionaron como animales donadores de médula ósea, mientras que todos los ratones receptores son hembras. Los receptores hembras son irradiados subletalmente antes de la inyección de las células de médula ósea de macho en sus venas de la cola. Se evaluaron dos grupos de ratones. El primer grupo de 20 animales se irradió subletalmente, se inyectó con la médula ósea, y se puso en alimentación normal. Al segundo grupo de 20 animales es también irradiado subletalmente, recibe médula ósea de macho, y son alimentados con una dieta de alimentación normal más 0.5 a 15% p/v del ligando de selectina que contiene la fracción de AFA.

20 Aproximadamente 6×10^6 células nucleadas de médula ósea de adulto se cosecha de los ratones macho con edades de 8-10 semanas y se inyectan en las venas de la cola de los receptores hembras adultos isogénicos irradiados subletalmente, también con edades de 8-10 semanas. Los ratones provenientes de cada grupo se sacrifican en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: tiempo 0,1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas y 8 semanas. En los puntos de tiempo de 2 y 8 semanas, 6 ratones se sacrificaron de cada grupo. En todos los otros puntos de tiempo, se sacrificaron 2 ratones de cada grupo

30 Durante las primeras dos semanas después de la inyección, se toman 15 microtítulos de sangre completa proveniente de la oreja, cola, o pata, inmediatamente se diluyen en 200 microtítulos de amortiguador (Solución salina amortiguada de fosfato, pH=7.2, 2% de suero, 0.02% de azida) para diluir los factores de coagulación y evitar la coagulación. Se ensayaron muestras de sangre para vigilar la repoblación de las plaquetas, las células sanguíneas rojas, y los leucocitos en la sangre. Una porción de la muestra de sangre se utilizó para obtener un conteo celular y para evaluación diferencial de las células sanguíneas rojas versus las células sanguíneas blancas. La muestra se ensayó utilizando un citómetro de flujo, y la proporción de neutrófilos, linfocitos, y monocitos se evaluó utilizando dispersión frontal lateral. Los leucocitos de la sangre se examinaron por su origen masculino utilizando citometría de flujo.

40 Al momento del sacrificio, varias células y tipos de tejido se examinaron para antígeno Hy, lo que demostraba que la célula o tejido se originaba en un ratón macho. Los cerebros se cosecharon y se examinó el cerebro completo, incluyendo el bulbo olfatorio, el hipocampo, las áreas corticales, y el cerebelo. La médula ósea, el músculo cardíaco, el músculo de la pata trasera, el hígado, el páncreas, secciones del intestino delgado, y tejido pulmonar se examinaron para presencia de células con cromosomas Y, mediante su presión del antígeno de superficie Hy mediante inmunofluorescencia, o por fluorescencia mediante hibridación *in situ* con fluorescencia utilizando sondas para los cromosomas Y. Estos datos documentan en qué proporción una dieta que contiene algas verde azuladas promueve el proceso de anidación, implementación y diferenciación de las células madre de médula ósea inyectadas.

45 Ejemplo 10

Células madre provenientes de médula ósea pueblan múltiples tejidos distantes.

50 Un estudio similar a aquel descrito anteriormente se condujo utilizando ratones macho transgénicos que llevaban el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) y ratones hembras isogénicos como receptores. Los animales se trataron, alimentaron, se sacrificaron tal como se describió anteriormente, y las muestras sanguíneas también se analizaron de manera similar.

Los leucocitos de la sangre se examinaron para la expresión de GFP utilizando citometría de flujo y, al momento del sacrificio, varias células y tipos de tejidos se examinaron para antígeno GFP, lo cual demuestra el origen del

donador. Los tejidos y los órganos se cosecharon tal como se describió anteriormente y se detectó la presencia de células que llevan GFP mediante citometría de flujo o microscopia fluorescente.

Ejemplo 11

Repoblación de células madre incrementadas de tejido traumatizado

- 5 Se utilizó un modelo de ratón para evaluar el anidamiento y la integración de células madre derivadas de medula ósea en tejido traumatizado.

10 Todos los donantes de medula son ratones macho adulto (de 8-10 semanas de edad), y todos los ratones receptores son hembras adultas (de 8-10 semanas de edad). Se evaluaron los dos grupos de ratones. Un grupo de receptores irradiados subletalmente recibió 6×10^6 células donadoras nucleadas por vía de inyección en la vena de la cola y se les permitió 2 semanas de recuperación. Los animales son entonces traumatizados ligeramente mediante la inserción de una aguja delgada en el musculo de la pata trasera, el corazón, y el cerebro. Todos los animales recibieron alimentación normal durante todo el estudio. Y en el segundo grupo, ratones hembra son tratados idénticamente a los del primer grupo, pero se alimentaron con una dieta que incluye 0.5 a 15% p/v de fracción que contiene ligando de selectina de AFA.

15 Se sacrificaron dos ratones antes del trauma para evaluar los niveles de línea base de las células derivadas del macho. Posteriormente, los ratones se sacrificaron en los siguientes puntos de tiempo: 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, y 4 semanas. Se sacrificaron dos ratones para cada punto de tiempo, excepto para el punto de tiempo de 2 semanas donde se sacrificaron 6 ratones de cada grupo. El musculo de la pata trasera, como el corazón, y el tejido del cerebro se aislaron de los animales sacrificados. Se cortan secciones a través de las áreas traumatizadas, y se tiñen para células derivadas de macho utilizando análisis de marcador de superficie celular para la expresión del antígeno Hy o mediante hidrogenación *in situ* con fluorescencia utilizando sondas para el cromosoma Y. Alternativamente, los ratones donadores transgénicos que expresan GFP se utilizaran (similar al ejemplo #4).

Los datos obtenidos demostraron el efecto de consumir la fracción que contiene el ligando de selectina del AFA a la velocidad del reclutamiento de la célula madre luego del trauma.

25 Ejemplo 12

Reporte de caso para reparación de tejido

30 Un sujeto fue una fisicoculturista que había tenido un accidente hacía tres años. Un coche golpeo su carro en la puerta sobre el lado del conductor y se giraron varios músculos en su cadera y muslo. El tuvo una serie de cirugías para volver a unir varios músculos. A pesar de las cirugías exitosas el daño del musculo fue tan severo que permaneció con un dolor constante y no pudo reasumir su entrenamiento de levantamiento de pesas, ya que aún una sesión media de entrenamiento era seguida por hinchamiento y dolor, lo que le evitaría caminar durante varios días.

35 Ella ensayo muchas drogas antiinflamatorias, pero después de 18 meses ella aun no podía entrenar. Ella empezó a consumir una fracción de alga verde azulada que contenían un ligando de selectina. Dos semanas más tarde, ella reportó ser capaz de regresar al gimnasio, y después de dos meses de consumo, ella había reasumido el entrenamiento normal, indicando una reparación extensa del tejido muscular.

Ejemplo 13

Reporte de caso para reparación de tejido

40 Un sujeto de 55 años de edad fue por un sexto reemplazo de cadera –cuarto del lado izquierdo. En general, había muy pobre pronóstico y enormes dificultades involucradas.

El cirujano ortopédico reconstruyo la pelvis y el acetabeum. Sin embargo, antes de la cirugía al sujeto se le informo por el grupo de médicos que no había manera de que el cuerpo produjera el nuevo hueso necesario para el éxito de largo plazo del procedimiento. Se consideró que si el sujeto conseguía crecimiento de hueso probablemente sería menor que el que se requería para curación.

45 Al sujeto se le suministro una fracción de algas verde azuladas que contienen L-selectina poco después de la cirugía. El nuevo crecimiento de hueso fuerte apareció rápidamente y la recuperación fue rápida. El sujeto reportó que ellos ya no necesitaban las muletas y que fue capaz de soportar su propio peso en 6 semanas - comparado con 6 meses con la cirugía previa del sujeto. El sujeto reportó la confirmación de curación acelerada en cada revisión. El

sujeto también reportó que el hueso que rodeaba su cadera derecha que tenía una revisión hecha a comienzos de los años 80 se encontraba muy fuerte. Esto se consideró excepcional.

Ejemplo 14

Reporte de caso

5 Una mujer joven se le diagnosticó a la edad de 3 años distrofia muscular infantil. Ella era incapaz de caminar. Ella estaba muy frágil, y frecuentemente experimentaba neumonía, lo cual cada vez daba como resultado el confinamiento en cama durante 8-10 días. Ella estuvo en terapia convencional por distrofia muscular durante 6 meses pero esto no dio ningún cambio como resultado. Ella comenzó el consumo de *Spirulina*, lo cual en alguna proporción mejoró su función inmune ya que ella experimentó menos frecuente y menos severas neumonías. Ella entonces inicio el consumo de una fracción de algas verde azuladas que contienen un ligando de selectina (Extracto A). Después de dos semanas ella inició sus primeras etapas. Después de tres meses ella estaba caminando, no tuvo más neumonía.

15 La enfermedad es una enfermedad heredada, y varios miembros de la familia con la misma enfermedad con degeneración adicional, también comenzaron el consumo de la fracción de algas (Extracto A). Estos individuos reportaron que ellos experimentaron beneficios de consumir esta fracción.

Ejemplo 15

Estudios en humanos

Un estudio con control de placebo aleatorizado triple ciego en sujetos humanos se condujo sobre el efecto de varios extractos de AFA en los números de las células madre. Los siguientes métodos se utilizaron en estos estudios:

20 Consumibles: Se probaron cuatro consumibles. Dos fueron líquidos y tres fueron encapsulados. Ninguno de los voluntarios, ni la persona que administra la sustancia, ni el personal de laboratorio que efectúa los análisis de datos conocían que sustancias se estaban administrando el día del estudio.

25 1. LSL: El extracto A, como una fracción AFA enriquecida en ligando de L-selectina. Un gramo de la fracción concentrada en ligando de (LSL) se mezcló en 40 ml de agua y se sirvió para el estudio de los sujetos en un vaso de papel.

2. Migratosa (MGT): La fracción conocida por contener un compuesto bioactivo responsable por la migración de células inmunes y células madre se obtuvo al extraer líquido AFA con 10% de etanol a 50°C durante una hora. La solución se centrifugó y el sobrenadante se secó utilizando RW. Este producto había sido internamente denominado migratosa (MGT). La migratosa (150 mg) se mezcló con 250 mg de placebo y se administró en una capsula vegetal.

30 3. StemEnhance (SE): StemEnhance es una mezcla de LSL Migratosa. Un gramo de StemEnhance se mezcló en 40 ml de agua y se sirvió para estudiar los sujetos en un vaso de papel.

4. Placebo: El placebo consistía de 400 mg de hojuelas de papa molidas finamente tinturadas de verde, encapsuladas en capsulas vegetales. La apariencia fue idéntica a aquella de las capsulas que contenían migratosa.

35 Sujetos: Un total de 19 personas fueron entrevistadas provenientes de voluntarios saludables donadores regulares de sangre. Se utilizaron los siguientes criterios de exclusión.

- Menores de 20 o mayores de 65 años de edad.
- Embarazo
- Asma y alergias severas que requieren medicación diaria
- Cualquier enfermedad crónica conocida o previa/enfermedades venéreas presentes
- 40 • Frecuente uso de droga recreacional
- Función digestiva dañada (incluyendo cirugía gastrointestinal mayor previa).

De las personas entrevistadas, 14 cumplieron los criterios del estudio y estaban deseosas de participar. Entre los 14, tres fueron excluidos posteriormente en parte del estudio debido al no cumplimiento. Entre los restantes 11 voluntarios, seis fueron hasta los cuatro días de estudio cada uno, de tal manera que se obtuvieron datos para todos los cuatro consumibles para la misma persona. El resto de cinco voluntarios pudieron participar en tres días de estudio cada uno.

Los sujetos fueron programados para llegada el mismo día de la semana en cuatro semanas sucesivas durante un periodo de dos meses. Los sujetos fueron programados el mismo día de la semana para mayor consistencia en los datos. Se les instruyó dormir bien en la noche antes de cada día de estudio, y comieron el mismo tipo de desayuno blando en cada día de estudio.

Luego de llegar, los voluntarios fueron sentados en áreas tranquilas alejados el uno del otro, para desanimar la charla y producir un ambiente tranquilo (no hubo afectaciones tales como teléfonos, timbres de puerta, charlas entre el personal de laboratorio). Los voluntarios se les instruyó permanecer quiescentes, confortablemente sentados en una silla, durante una hora. El movimiento se restringió a un caminar lento en el baño, si se requería. Después de una hora, se tomaron muestras de sangre de línea base; inmediatamente después de extraer la muestra de línea base, se suministró un consumible. A los voluntarios se les instruyó permanecer quiescentes durante todo el experimento. Se tomaron posteriormente muestras de sangre a los 30, 60 y 120 minutos después de la ingestión del consumible.

Cada día, luego de la llegada al laboratorio, los voluntarios llenaban un cuestionario que daba una evaluación diaria de sus condiciones generales. Este cuestionario pretendía identificar cualquier caso por el cual los podrían haber sido eliminados debido a circunstancias extraordinarias. Los siguientes criterios se utilizaron como datos de eliminación:

- Falta de sueño
- Estimulantes en las dos horas luego del arribo
- Estrés

Evaluación de las células madres circulantes: En cada punto de tiempo, se extrajeron 5 ml de sangre en heparina, y se extrajeron 2ml de sangre en EDTA. Los frascos de sangre se colocaron sobre una placa rodante hasta uso. La sangre extraída en EDTA se utilizó para obtener un conteo sanguíneo completo (CBC) utilizando un contador Coulter (Micro Diff II, Beckam Coulter). Todos los CBCs se efectuaron dentro de la hora después de la extracción de la muestra. Todos los CBCs se efectuaron por triplicado.

La sangre de heparinizada se utilizó para purificación de la fracción de célula mononuclear de sangre periférica mediante centrifugación de gradiente, y se procesó para inmunoteñido y citometría de flujo. Los marcadores de célula madre CD34-FITC (clon 8G12) y CD133-PE se utilizaron para inmunofluorescencia bicolor. Se efectuó el teñido de todas las muestras con CD34-FITC/CD133-PEW por triplicado. Se utilizaron los controles de isotipo apropiados en muestras paralelas. Los controles positivos para cada donador tuvieron CD45 y CD14. Las células teñidas se fijaron en 1% de formalina y se adquirieron mediante citometría de flujo inmediatamente. Archivos de 200,000 eventos se recolectaron en cada muestra.

Ya que las células utilizadas para inmunoteñido no incluyeron coagulación de granulocito, la adquisición de 200,000 eventos incluyó más células madre que si se hubiera utilizado la sangre completa. El uso de la fracción de célula mononuclear de sangre periférica permitió así la recolección de datos con mayor número de células madre, dando un mejor peso estadístico a las diferencias observadas en los números de células madre.

El teñido para CD 14 se efectuó en muestras paralelas, ya que no interfería con el análisis del CD 34 y el CD133. Se efectuó el análisis de citometría de flujo utilizando un Software CellQuest Pro (Becton Dickinson).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

El consumo de SE y LSL condujo a un incremento en el número de células CD34+ circulantes (ver FIG. 9) mientras que el MGT condujo a una disminución en el número de células CD34+ circulantes. Después del consumo del placebo se presentaron varios cambios que no tenían significancia estadística. Tanto con el SE como con el LSL un número de voluntarios mostro una tendencia a una disminución transitoria inicial en el número de células DC34+; esta observación fue mayor para el LSL aunque no alcanzo significancia. A los sesenta minutos después del consumo, el SE ($p < 0.003$) y LSL ($p < 0.02$) disparó un incremento significativo en el número de células CD34+. Sin embargo, el MGT disparó una disminución significativa ($p < 0.03$).

5 En una parte posterior de los análisis de datos, cada una de las respuestas de los voluntarios a los extractos AFA se normalizo para la misma respuesta de la persona al placebo. Esto se hizo para sustraer el cambio porcentual obtenido con el placebo del cambio porcentual obtenido con el extracto. Esto se hizo para los tres consumibles. Este procedimiento no incrementó la magnitud o significancia de las respuestas; el patrón que se obtuvo fue similar al de la FIG. 9

10 Otra parte de los análisis de datos se enfocó en el cambio porcentual máximo para cada consumible comparado con el placebo. El razonamiento de este análisis es que la absorción de los compuestos bioactivos, el suministro a los órganos blanco, y el tiempo para generar una respuesta fisiológica cuantificable puede ser diferente dependiendo de cada una de las fisiologías completas del voluntario. Este método de análisis minimiza las diferencias en los tiempos de respuesta individuales y permite una comparación en la proporción del cambio, sin importar si se observó un cambio máximo a los 30 o 60 minutos. Con base en este método se encontró un incremento de $24 \pm 5\%$ en el número de células madre circulantes con SE y una disminución de $24 \pm 2\%$ con MGT. Se encontró una respuesta media del 27% y 77%, respectivamente, para el SE y el MGT.

15 El marco de tiempo para alcanzar la respuesta máxima parece ser no mayor de unas pocas semanas. Para evitar un factor de desviación potencial en los datos, la mayoría de los estudios se efectuaron sobre muestras de los sujetos que regularmente consumían AFA. En el presente estudio, solo un sujeto no fue un consumidor regular de AFA. Este sujeto no mostro incremento notable en la movilización de células CD34+. Se debe notar que este voluntario se retiró del análisis. Ya que fue solo un sujeto el que no consumió AFA regularmente, las muestras obtenidas del sujeto podrían ser utilizadas para un análisis estadístico relevante. Además, una complicación de este tipo de
20 protocolo es por el hecho de que los individuos no se movilizan todos de acuerdo con un marco de tiempo similar, y así pueda haber una infraestimación del tipo real de movilización. La respuesta al placebo mostro variaciones, aunque todas las fluctuaciones no alcanzaron significancia estadística. Sin embargo, estas fluctuaciones parecieron ser reales y sugirió que un mejor entendimiento del ciclo diario de CD34+ se podía utilizar para diseñar estudios futuros.

25 Este estudio confirmo que el SE y el LSL, ambos incluyen un extracto acuoso seco enriquecido por un ligando de selectina, son efectivos para movilizar células madres de medula ósea al incrementar el número de células CD34+ circulantes. Los datos recolectados en este estudio mostraron un incremento SE en el número de células madre circulante de hasta el 35%.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una forma seca de extracto acuoso o de solución salina amortiguada de *Aphanizomenon flos aquae*, en donde el extracto se enriquece con un Ligando de L-selectina; y

Una forma seca de extracto etanólico de *Aphanizomenon flos aquae*.

5 2. La composición de la reivindicación 1 que comprende, además, un portador farmacéuticamente aceptable

3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde el extracto de etanol se produce al suspender *Aphanizomenon flos aquae seco* en 10 a 20 por ciento de etanol en aproximadamente 50°C a aproximadamente 60°C.

10 4. La composición de la reivindicación 3 que comprende 1 gramo a aproximadamente 2 gramos, preferiblemente 1 gramo, de un extracto seco de solución acuosa o solución salina de *Aphanizomenon flos aquae*, en donde el extracto es enriquecido por un ligando de L- selectina, y 100 mg a 500 mg, de un extracto de etanol seco de *Aphanizomenon flos aquae*.

5. La composición de la reivindicación 3, obtenible mediante el proceso de

15 poner en contacto una primera cantidad de *Aphanizomenon flos aquae* en 0.1 molar de solución salina amortiguada con fosfato o agua durante aproximadamente media hora a aproximadamente 12 horas para producir un extracto acuoso:

Retirar el material sólido del extracto acuoso;

Secar el extracto acuoso para producir una composición sólida que comprende un ligando de L-selectina;

20 Incubar una segunda cantidad de *Aphanizomenon flos aquae* en 10% de etanol a aproximadamente 50°C durante aproximadamente una hora para producir un extracto de etanol;

retirar el material sólido del extracto de etanol; secar el material sólido proveniente del extracto de etanol para producir una forma sólida del extracto de etanol; y

mezclar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición sólida que comprende el ligando de L-selectina y una cantidad terapéuticamente efectiva de la forma sólida del extracto de etanol.

25 6. El producto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en un método para movilizar las células madre hematopoyéticas en un sujeto, que pretende administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva del producto, movilizándolo de esta manera las células madre hematopoyéticas en el sujeto.

7. El producto de la reivindicación 6, en donde las células madre hematopoyéticas expresan CD34 (CD34+), CD133 (CD133+), o ambas.

30 8. El producto de la reivindicación 6 o 7 en donde el sujeto es un humano.

9. El producto de la reivindicación 6 o 7 en donde el sujeto es un sujeto veterinario.

10. El producto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde el método comprende, además, medir el número de células madre CD34+ en el sujeto.

11. El producto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el sujeto es saludable.

35 12. El producto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el sujeto es inmunosuprimido y tiene enfermedad crónica, y enfermedad traumática, o enfermedad degenerativa.

13. El producto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el sujeto tiene un trastorno del sistema digestivo, sistema nervioso, sistema linfático, sistema cardiovascular o sistema endocrino.

40 14. El producto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el sujeto tiene osteoporosis, enfermedad de Alzheimer, infarto cardiaco, enfermedad de Parkinson, daño traumático del cerebro, esclerosis múltiple o cirrosis del hígado.

15. El producto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, donde las células madre que se anidan se incrementa aproximadamente 100% a aproximadamente 500% comparadas con el control.

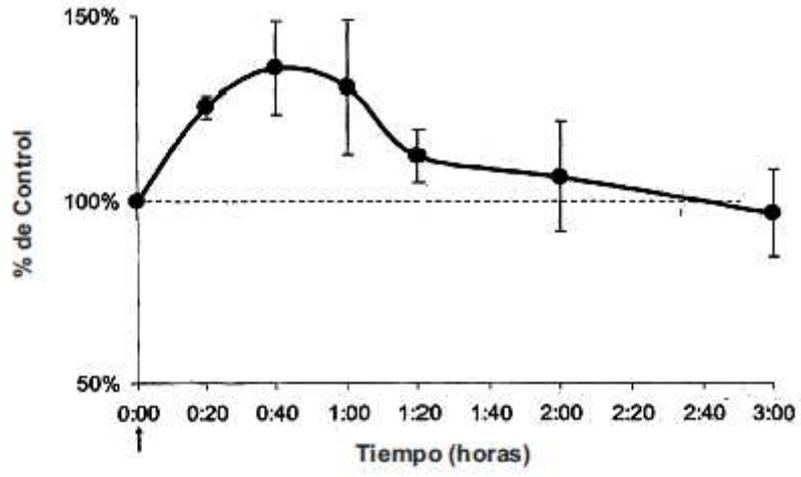


FIG. 1

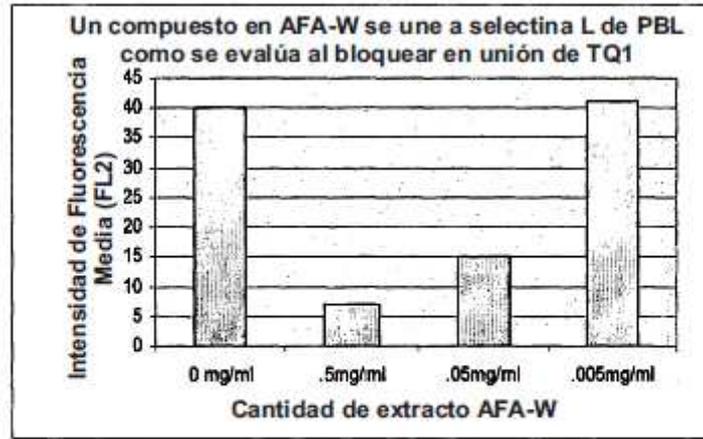


FIG. 2

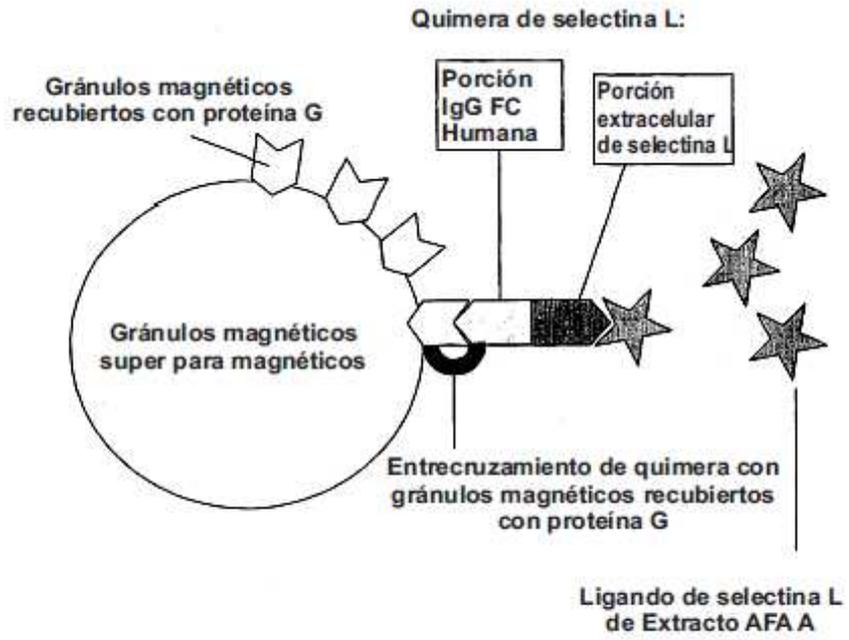


FIG. 3

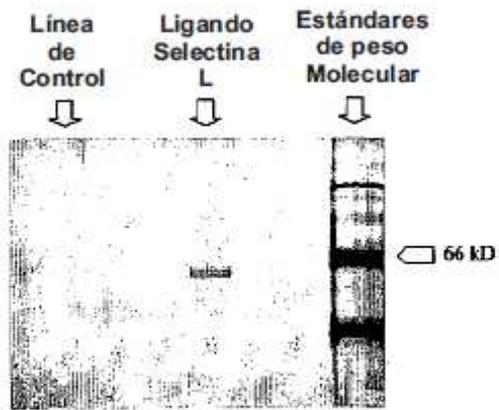


FIG. 4A

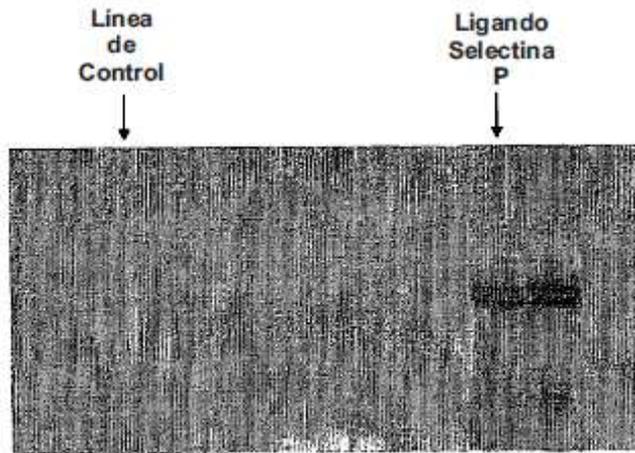


FIG. 4B

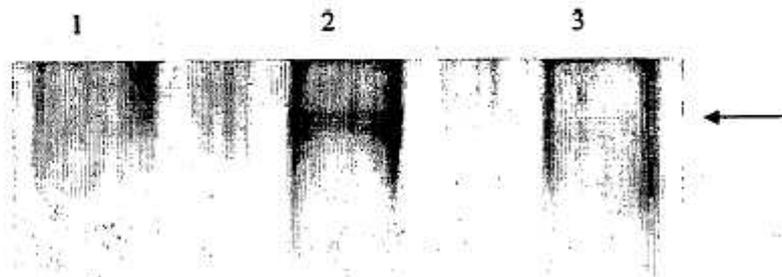


FIG. 5

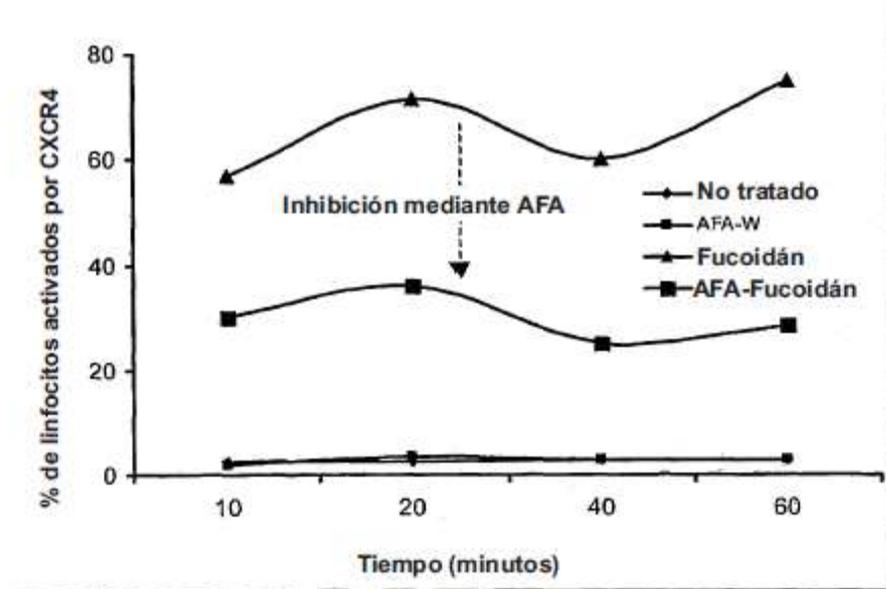


FIG. 6

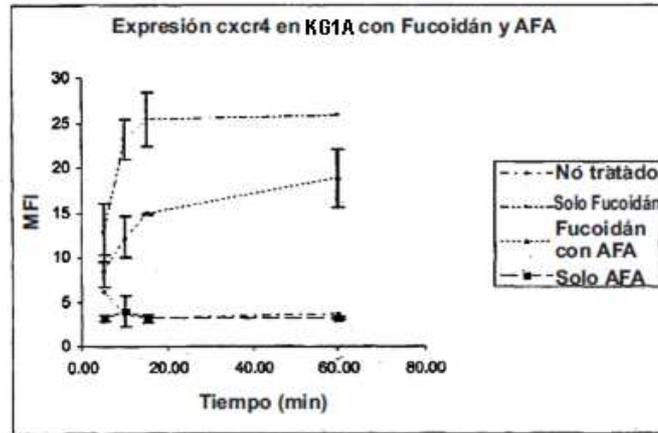


FIG. 7

Tabla 1. AFA-W bloquea la unión de TQ1 MoAb a selectina L en leucocitos humanos

	Linfocitos			Neutrófilos 1% de formalina
	Células no fijadas	azida de sodio 0.02%	1% de formalina	
Fluorescencia Media				
Células no teñidas	1	1	1	2
Tinción TQ1	244	366	149	156
Tinción TQ1 después de tratam. previo con AFA-W	98	216	82	61
Prueba t	<0.003	<0.002	<0.005	<0.001
Fluorescencia media				
Células no teñidas	1	1	1	1
Tinción TQ1	221	374	134	138
Tinción TQ1 después de tratam. previo con AFA-W	44	208	64	26
Prueba t	<0.002	<0.001	<0.02	<0.001

Todos lo teñidos se realizan por triplicado. Los valores dado para células teñidas se basa en promedios de 3 muestras.

FIG. 8

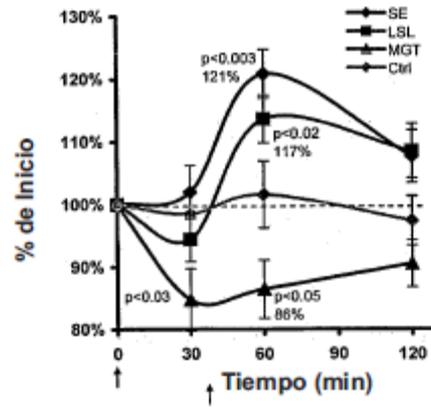


FIG. 9