

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 086**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)	<b>A61P 17/14</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/711</b>	(2006.01)		
<b>A61K 35/12</b>	(2015.01)		
<b>A61K 35/76</b>	(2015.01)		
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 1/04</b>	(2006.01)		
<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/02</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2007 PCT/JP2007/071133**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.0008 WO08053892**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2007 E 07830867 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2055308**

54 Título: **Sustancia farmacéutica para promover la regeneración funcional de tejido dañado**

30 Prioridad:

**30.10.2006 JP 2006293582**

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

**07.08.2017**

73 Titular/es:

**GENOMIX CO., LTD. (50.0%)  
3 FL. SAITO BIOTECHNOLOGY INCUBATOR 7-7-  
15, SAITO-ASAGI IBARAKI-CITY  
OSAKA 567-0085, JP y  
OSAKA UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAMAI, KATSUTO;  
YAMAZAKI, TAKEHIKO y  
KANEDA, YASUFUMI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 629 086 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

Sustancia farmacéutica para promover la regeneración funcional de tejido dañado

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a sustancias farmacéuticas que promueven la regeneración funcional de tejidos dañados.

Técnica antecedente

10 Los años recientes han revelado que diversas células madre contribuyen a los procesos de reparación de tejidos dañados, y se están desarrollando progresivamente medicamentos regenerativos novedosos que inducen la regeneración del tejido funcional al movilizar un gran número de células madre a sitios de lesión. Para obtener estos medicamentos regenerativos novedosos, es necesario que: (i) las células madre que son movilizables a los sitios de la lesión estén presentes abundantemente *in vivo*, y (ii) se hayan aislado/identificado factores que movilicen a las células madre a los sitios de lesión.

15 Los ejemplos de células madre que son movilizables a los sitios de lesión incluyen células madre tisulares que existen en áreas de lesión o tejidos cercanos, y células madre derivadas de médula ósea que existen en la sangre periférica. En años recientes, se ha dado a conocer la contribución de las células derivadas de médula ósea a muchos tipos de regeneraciones de tejido dañado, pero el mecanismo para movilizar células derivadas de médula ósea a sitios de lesión es desconocido. Las células derivadas de médula ósea, como se usan aquí, se distinguen de células madre hematopoyéticas que tienen el potencial de diferenciarse en células sanguíneas (leucocitos y eritrocitos), e incluyen células madre representadas por células denominadas células madre mesenquimatosas de la médula ósea, o grupos de células progenitoras de tejido que existen en la médula ósea. Las células madre mesenquimatosas de médula ósea son células madre no diferenciadas que tienen el potencial de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos, y condrocitos, y se pueden diferenciar además en otras células mesenquimatosas tales como fibroblastos, células musculares, células estromáticas, y células de tendón. Recientemente, se ha probado que las células madre mesenquimatosas de médula ósea se diferencian en células nerviosas, y además en células epiteliales (tales como queratinocitos de la piel) y células endoteliales vasculares (Documento 9 No de Patente). Las células progenitoras de tejido se definen como células no diferenciadas que tienen un potencial unidireccional para diferenciarse en tejidos/células específicos distintos de aquellos del sistema sanguíneo, e incluyen células no diferenciadas que tienen el potencial para diferenciarse en tejido mesenquimatoso, tejido epitelial, tejido nervioso, órganos parenquimatosos, y endotelio vascular, como se menciona anteriormente.

30 HMGB1 (proteína del Grupo de Alta Movilidad Box 1: grupo 1 de alta movilidad) es una proteína que tiene un peso molecular de alrededor de 25.000 que existe en casi todos los tipos de células *in vivo*. Según los informes previos, se conocen las siguientes funciones:

1) HMGB1 regula la expresión génica mediante unión intracelular con ADN para controlar la estructura de la cromatina (Documento 1 No de Patente);

35 2) HMGB1 es segregada a partir de monocitos o macrófagos que existen en tejidos inflamatorios mediante la acción de citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1, y LPS, y se une extracelularmente a RAGE (Receptor para Productos Finales de Glicación Avanzada) (Documento 2 No de Patente) para inducir reacciones inflamatorias fuertes (Documento 3 No de Patente);

40 3) HMGB1 es liberada a partir de células necrosadas inducidas por hipoperfusión hacia los tejidos circundantes (Documento 4 No de Patente);

4) HMGB1 está asociada con el progreso de la inflamación en pacientes con septicemia, una enfermedad infecciosa grave (Documento 5 No de Patente);

45 5) la administración de HMGB1 a áreas infartadas de modelos de infarto de miocardio promueve la división/proliferación de células madre existentes en el miocardio para promover la regeneración/recuperación funcional del miocardio (Documento 1 de Patente);

6) la administración de HMGB1 a animales modelo con insuficiencia hepática hipoperfusiva antes de la inducción de las condiciones hipoperfusivas alivia el grado de disfunción hepática (Documento 6 No de Patente);

50 7) la administración de HMGB1 a sitios de lesión de modelos de lesión muscular dirige células progenitoras vasculares administradas simultáneamente hacia sitios de lesión para promover la regeneración del tejido muscular (Documento 7 No de Patente); y

8) HMGB1 induce la formación de neuritas en células nerviosas (Documento 8 No de Patente). Sin embargo, ninguno de los informes previos mostró que las células madre derivadas de médula ósea, en particular aquellas células madre mesenquimatosas que se pueden diferenciar en osteoblastos, condrocitos, adipocitos,

y similares, se movilizaron a tejidos dañados.

Convencionalmente, se creyó que las células nerviosas centrales en el cerebro y en la médula espinal no eran regenerables una vez se dañaban. Sin embargo, la existencia de células madre neurales fue conocida recientemente, y se ha hecho posible la inducción de estas células. También se ha identificado el nicho de las células madre neurales dentro del sistema nervioso normal. Por lo tanto, ahora se espera que la recuperación de las neuronas centrales dañadas, que se consideró durante mucho tiempo imposible, es factible. Actualmente, se está desarrollando vigorosamente la investigación relacionada con la regeneración neuronal para lesión del cerebro y de la médula espinal, enfermedades degenerativas, y similares.

Las causas principales de lesión de tejido (células) cerebral son la contusión cerebral traumática y las enfermedades isquémicas cerebrales. Otras causas pueden ser la lesión que resulta de cirugías del cerebro, tales como extirpación de un tumor cerebral. En particular, la extirpación total de neuroglioma que surge de células parenquimatosas cerebrales es difícil, y no existe más elección que detenerse en la extirpación parcial para evitar daño a las funciones motora y del lenguaje. Además, el neuroglioma maligno tiene un pronóstico muy malo, y ninguno de los tratamientos desde quimioterapia y radioterapia hasta inmunoterapia/terapia génica que se investigan activamente hoy en día han logrado efectos satisfactorios. En consecuencia, un tratamiento ideal sería aquel que pueda eliminar tantas células tumorales como sea posible, y que pueda restaurar el daño a las funciones cerebrales que resulta de la extirpación.

[Documento 1 No de Patente] Bustin et al. Mol Cell Biol, 19: 5237-5246, 1999

[Documento 2 No de Patente] Horiet et al. J. Biol. Chem., 270, 25752-25761, 1995

[Documento 3 No de Patente] Wang et al. Science, 285: 248-251, 1999

[Documento 4 No de Patente] Muller et al. EMBO J, 20: 4337-4340, 2001

[Documento 5 No de Patente] Wang et al. Science, 285: 248-251, 1999

[Documento 6 No de Patente] Germani et al. J. Leukoc. Biol., 81, 2007, Electronic Journal Version

[Documento 7 No de Patente] Palumbo et al. J. Cell Biol., 164: 441-449, 2004

[Documento 8 No de Patente] Merenmies et al. J. Biol. Chem., 266: 16722-16729, 1991

[Documento 9 No de Patente] Yaojiong et al. Stem cells, 25:2648-1659

[Documento 1 de Patente] Publicación de Patente Japonesa Kohyo No. (JP-A) 2005-537253 (publicación de fase nacional japonesa sin examinar que corresponde a una publicación internacional no japonesa)

#### Descripción de la invención

##### [Problemas a resolver por la invención]

Un objetivo de la presente invención es aislar/identificar factores que movilizan células que se diferencian en tejidos dañados hacia sitios de lesión, y proporcionar invenciones que utilicen tales factores.

##### [Medios para resolver los problemas]

Una vez que se revelan los factores movilizan células que se diferencian en los tejidos dañados, la administración de tales factores a sitios de lesión permite la movilización de un gran número de células (que existen en sangre periférica o tejidos locales) que se diferencian en tejidos dañados. De este modo, se hace posible el desarrollo de nuevos medicamentos regenerativos que promueven la regeneración del tejido funcional.

Los presentes inventores examinaron la posibilidad de que células derivadas de médula ósea puedan ser movilizadas a injertos de piel procedentes de tejidos no de piel en el proceso del trasplante de injerto de piel a tejido vivo, contribuyendo así a la regeneración del tejido de la piel. Como resultado, revelaron lo siguiente por primera vez en el mundo.

1) una gran cantidad de células derivadas de médula ósea se movilizan a la piel injertada;

2) las células derivadas de médula ósea movilizadas se diferencian en cualquiera de fibroblastos dérmicos, adipocitos, células musculares, células endoteliales vasculares, y queratinocitos epidérmicos en la piel injertada, y las células derivadas de médula ósea movilizadas incluyen células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea;

3) los factores que movilizan células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea procedentes de sangre periférica hacia la piel injertada son HMGB1, HMGB2, y HMGB3 liberadas del tejido necrosado de la piel receptora;

4) HMGB1, HMGB2, y HMGB3 purificadas promueven la migración de células madre mesenquimatosas aisladas y cultivadas a partir de médula ósea;

5) los activadores que contienen HMGB1 que permiten la migración de células madre mesenquimatosas de médula ósea se pueden purificar convenientemente a partir de varios extractos de órganos, incluyendo piel, cerebro y corazón, mediante un método de cromatografía en columna que usa una columna de afinidad de heparina;

6) los activadores que permiten la migración de células madre mesenquimatosas de la médula ósea se pueden extraer convenientemente de células cultivadas; y

7) una fracción purificada en columna de heparina de extracto de piel moviliza una gran cantidad de células derivadas de médula ósea en caso de lesión cerebral.

En base a estos hallazgos, la presente solicitud proporciona las siguientes invenciones:

[1] un promotor de regeneración tisular que comprende uno cualquiera de los siguientes componentes (a) a (i), para uso en medicina regenerativa para tejido epitelial o neurológico:

(a) una proteína HMGB1;

(b) una célula que segrega una proteína HMGB1;

(c) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB1;

(d) una proteína HMGB2;

(e) una célula que segrega una proteína HMGB2;

(f) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB2;

(g) una proteína HMGB3;

(h) una célula que segrega una proteína HMGB3; y

(i) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB3;

[2] un kit que comprende uno cualquiera de los siguientes componentes (a) a (i), para uso en medicina regenerativa para tejido epitelial o neurológico:

(a) una proteína HMGB1;

(b) una célula que segrega una proteína HMGB1;

(c) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB1;

(d) una proteína HMGB2;

(e) una célula que segrega una proteína HMGB2;

(f) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB2;

(g) una proteína HMGB3;

(h) una célula que segrega una proteína HMGB3; y

(i) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB3.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa un método para producir un ratón al que se le ha transplantado la médula ósea y que expresa GFP.

La Fig. 2 presenta fotografías que muestran la acumulación de fluorescencia de GFP observada en el injerto de piel tras el trasplante de piel en la espalda de un ratón al que se le ha transplantado la médula ósea y que expresa GFP. La imagen de la parte superior izquierda es una imagen del área del trasplante de piel observada a simple vista, la imagen central superior es una imagen de tejido teñido con HE de una piel receptora en la vecindad de la frontera entre la piel injertada y la piel receptora (mostrada por la flecha), y la imagen superior derecha es una imagen de tejido teñido con HE del injerto de piel. Además, la imagen de la parte izquierda inferior muestra la acumulación de fluorescencia de GFP en la piel injertada, la imagen central inferior es una imagen agrandada del área del trasplante de piel, y la imagen derecha inferior es una imagen

agrandada que muestra la acumulación de fluorescencia de GFP en la misma imagen agrandada del injerto de piel.

La Fig. 3 muestra un conjunto de fotografías que muestran células epidérmicas derivadas de médula ósea y fibroblastos dérmicos derivados de médula ósea que se acumulan en la piel injertada en la espalda del ratón al que se le ha transplantado la médula ósea y que expresa GFP. La primera fila en la parte superior muestra imágenes de la piel del área de trasplante con poco aumento (x 100), la fila central muestra imágenes agrandadas de lo mismo que muestran la frontera de la epidermis/dermis bajo un gran aumento (x 200), y la fila inferior muestra imágenes agrandadas adicionales de lo mismo que muestran un folículo piloso bajo un gran aumento (x 200). La columna izquierda alejada muestra la tinción con DAPI (tinción nuclear), la segunda columna desde la izquierda muestra imágenes de fluorescencia de GFP de las regiones respectivas de la primera fila. La tercera columna desde la izquierda muestra las imágenes de inmunotinción de queratina 5 (K5). La cuarta columna desde la izquierda muestra imágenes fusionadas de cada una de estas fluorescencias. Se observan grandes números de células epidérmicas y fibroblastos dérmicos positivos a GFP.

La Fig. 4 es un diagrama de flujo que muestra un proceso para identificar un factor director de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en un extracto de tejido de piel.

La Fig. 5 representa un método para extraer un factor inductor de la regeneración (factor movilizador de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea) a partir de un trozo cortado de piel.

La Fig. 6 presenta un conjunto de fotografías que muestran resultados de ensayos de la capacidad/actividad migratoria de las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en un extracto de piel usando una cámara de Boyden. La fotografía superior izquierda muestra células madre mesenquimatosas de médula ósea adheridas sobre una membrana de silicona en el lado de la cámara inferior, que han migrado desde la cámara superior de la cámara de Boyden hacia el lado del extracto de piel (lado de la cámara inferior) a través de poros finos en la membrana de silicona, que se tiñen con un pigmento azul. Las imágenes teñidas se muestran inmediatamente después del cultivo (0 h), después de 12 horas (12 h), y después de 24 horas (24 h) (cuatro pocillos cada uno) desde la parte superior. La fotografía superior derecha es una imagen agrandada (0 h) bajo un gran aumento. La imagen inferior izquierda es una imagen agrandada (12 h) bajo un gran aumento. La imagen inferior derecha es una imagen agrandada (24 h) bajo un gran poder de aumento.

La Fig. 7 presenta una fotografía que muestra el resultado del ensayo la capacidad/actividad migratoria de las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, examinado en el grupo de la preparación de la fracción purificada del extracto de piel usando la cámara de Boyden, y la correspondencia con el resultado de la electroforesis con SDS-PAGE para cada una de las preparaciones de las fracciones purificadas. Desde la izquierda, la Línea 1 (M.W.): marcador de peso molecular; Línea 2 (C.E.): extracto de piel bruto; Línea 3 (H.A.): fracción que se une a la columna de afinidad de heparina (fracción semipurificada); y las Líneas 4 a 13 (A.E.): fracciones que se unen a la columna de intercambio aniónico (fracción purificada final) eluida con diversas concentraciones de NaCl, que se tiñeron todas ellas con plata después de la migración. Además, cada banda teñida en la fracción purificada final de No. 4, que mostró la actividad más fuerte de migración de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea mediante una imagen del gel de electroforesis teñida con plata (línea 7), se cortó, y entonces se llevó a cabo la espectrometría de masas y el análisis de las bases de datos. El resultado reveló que la banda indicada por la flecha es HMGB1.

La Fig. 8 presenta una fotografía que muestra el resultado del ensayo de actividad migratoria de las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea para HMGB1 usando una cámara de Boyden. Las dos imágenes en la parte superior son imágenes teñidas de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea que han migrado al extracto de piel. Las dos imágenes centrales son imágenes teñidas de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea que han migrado a la preparación purificada de HMGB1. En la parte inferior están las imágenes teñidas de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (pérdida virtual de actividad migratoria) que han migrado a una disolución neutralizada obtenida añadiendo un anticuerpo policlonal anti-HMGB1 a la preparación purificada de HMGB1 usada para la parte central.

La Fig. 9 muestra un método de ensayo *in vivo* para la actividad directora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

La Fig. 10 presenta un conjunto de fotografías que muestran la actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea *in vivo* de HMGB1. La fracción de HMGB1 (fracción purificada final No. 4) mostró una actividad de movilización de alrededor de tres veces según se compara con el control comparativo (fracción purificada final No. 1).

La Fig. 11 presenta una fotografía que muestra células movilizadas *in vivo* mediante la fracción de HMGB1 (fracción purificada final No. 4) bajo un gran aumento.

La Fig. 12 presenta un conjunto de fotografías que muestran imágenes inmediatamente después de

comenzar el cultivo de células que migraron a un tubo de silicona. A la izquierda se encuentra una imagen de células migratorias inoculadas en un medio bajo un campo de luz, y la derecha muestra una imagen de fluorescencia de GFP bajo un campo oscuro.

5 La Fig. 13 presenta un conjunto de fotografías que muestran imágenes 24 horas después de comenzar el cultivo de células que migraron al tubo de silicona. La fotografía de la izquierda muestra una imagen de células similares a fibroblastos y células similares a epiteliales que proliferaron y se adhirieron sobre una cápsula de cultivo de plástico bajo un campo de luz, y la fotografía de la derecha muestra una imagen de fluorescencia de GFP bajo un campo oscuro.

10 La Fig. 14 presenta un conjunto de fotografías que muestran imágenes 2 semanas después de comenzar el cultivo de células que migraron al tubo de silicona. Las fotografías izquierda y derecha muestran el mismo campo de vista, en las que la parte izquierda muestra imágenes bajo un campo de luz, mientras que la parte derecha muestra imágenes a través de un filtro de fluorescencia (la fluorescencia de GFP se detecta en B y D, y la fluorescencia de queratina 5 se detecta en F). Se observa una forma lineal similar a un pelo (indicado mediante el triángulo en blanco (flecha)) en el lado izquierdo de los grupos de células positivas a GFP derivadas de médula ósea que forman colonias circulares en la cápsula de cultivo de plástico. F indica que las células derivadas de médula ósea se transforman morfológicamente en una forma similar a un pelo, y expresan además queratina 5 (indicado mediante el triángulo en blanco (flecha)).

La Fig. 15 presenta un conjunto de fotografías que muestran la familia de HMGB en extracto de piel de ratón neonato, detectada mediante el método de transferencia Western.

20 La Fig. 16 muestra una ilustración de un mapa de un vector de expresión para la familia de HMGB en células de mamífero, que tiene, en dirección 3' del promotor, un potenciador de citomegalovirus y un promotor de  $\beta$ -actina de pollo para sintetizar una gran cantidad de ARNm codificados por el ADNc (ADN complementario) de la familia de HMGB.

25 La Fig. 17 presenta un conjunto de fotografías que muestran el resultado de la transferencia Western de las proteínas de fusión de la familia de HMGB etiquetadas con Flag recombinantes purificadas expresadas en células HEK293.

30 La Fig. 18 presenta un conjunto de gráficas que muestran la actividad de migración de células madre mesenquimatosas de médula ósea mediante HMGB1/HMGB2/HMGB3 recombinantes usando una cámara de Boyden. Todas las proteínas recombinantes mostraron mayores actividades de migración en comparación con los grupos de control.

La Fig. 19 presenta un conjunto de gráficas que muestran el resultado del tratamiento sobre modelos de tratamiento de úlcera cutánea de ratón usando la familia de HMGB. HMGB1, HMGB2, y HMGB3 mostraron todas ellas efectos significativos a la hora de reducir el área de la úlcera en comparación con los grupos de control.

35 La Fig. 20 presenta una fotografía que confirma la actividad inductora de la migración de HMGB1 humana y de extractos de piel humana sobre células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea humanas, usando una cámara de Boyden.

40 La Fig. 21 presenta un conjunto de fotografías que confirman las actividades de los activadores inductores de células madre mesenquimatosas de médula ósea en los extractos de corazón, cerebro y piel del ratón usando una cámara de Boyden, después de que los activadores se purificaron mediante una columna de heparina.

La Fig. 22 presenta un conjunto de fotografías que confirma las actividades migradoras de células madre mesenquimatosas de médula ósea humanas de un extracto de la estirpe celular HEK293 y un extracto de HeLa cultivados, evaluadas usando una cámara de Boyden. Ambas estirpes celulares cultivadas mostraron actividades migratorias sobre células madre mesenquimatosas de médula ósea humanas.

45 La Fig. 23A es una fotografía que muestra un ratón fijado a un aparato estereotáxico del cerebro y sometido a una incisión en la línea central en la cabeza con un escalpelo, seguido de la preparación usando un taladro. La Fig. 23B es una fotografía que muestra el cerebro al que se aplica una presión negativa usando una jeringuilla para succionar una parte del tejido cerebral. La Fig. 23C es una fotografía tras la inyección de 5  $\mu$ l de fracción purificada en columna de heparina de un extracto de piel disuelto en formulación de adhesivo de fibrina (fibrinógeno) al cerebro, y una inyección subsiguiente de 5  $\mu$ l de formulación de pegamento de fibrina (trombina). La Fig. 23D y la Fig. 23E son fotografías del modelo de lesión cerebral tomadas 2 semanas después del tratamiento. Se observó una mayor acumulación de células positivas a GFP en el grupo de tratamiento usando la fracción purificada en columna de heparina del extracto de piel en 23E en comparación con el control en 23D. La Fig. 23F y la Fig. 23G son fotografías del modelo de lesión cerebral tomadas 6 semanas después del tratamiento. Se observó una mayor acumulación de células positivas a GFP en el grupo de tratamiento usando la fracción purificada en columna de heparina de extracto de piel en 23G en comparación con el control en 23F.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Se describen inductores de células derivadas de médula ósea, que comprenden al menos uno de los siguientes ingredientes (a) a (i):

- (a) una proteína HMGB1;
- 5 (b) una célula que segrega una proteína HMGB1;
- (c) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB1;
- (d) una proteína HMGB2;
- (e) una célula que segrega una proteína HMGB2;
- (f) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB2;
- 10 (g) una proteína HMGB3;
- (h) una célula que segrega una proteína HMGB3; y
- (i) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB3.

Con el uso de tal inductor, las células derivadas de médula ósea (tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea) son dirigidas a áreas locales (área de administración/adición con el ingrediente anterior, o su vecindad), permitiendo la promoción de la regeneración del tejido funcional. Por lo tanto, un inductor se puede usar como un reactivo necesario para la investigación básica y clínica para el desarrollo de medicina regenerativa y medicina inductora de la regeneración. Por ejemplo, se hace posible movilizar células derivadas de médula ósea (tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea) a un tejido requerido *in vivo* en un animal experimental para examinar el grado de reparación tisular y la reconstrucción de la función tisular. Además, se puede llevar a cabo la investigación *in vitro* sobre la inducción de la regeneración tisular movilizand

Además, la regeneración del tejido dañado se puede promover usando un inductor. Se prevé el uso de un inductor anterior como un denominado fármaco preventivo que previene deterioros en funciones tisulares/orgánicas causados por la reducción de células madre tisulares, o como un fármaco antienvjecimiento que retrasa el progreso de alteraciones relacionadas con la edad, además del uso como un inductor/promotor de la regeneración del tejido funcional.

La presente invención también proporciona promotores de la regeneración tisular, o kits que comprenden al menos uno de los siguientes ingredientes (a) a (i) para uso en medicina regenerativa para tejido epitelial o neurológico:

- (a) una proteína HMGB1;
- 30 (b) una célula que segrega una proteína HMGB1;
- (c) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB1;
- (d) una proteína HMGB2;
- (e) una célula que segrega una proteína HMGB2;
- (f) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB2;
- 35 (g) una proteína HMGB3;
- (h) una célula que segrega una proteína HMGB3; y
- (i) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB3.

Los promotores de la regeneración tisular o kits para uso según la presente invención se caracterizan por que la administración a un área de tejido dañado o la vecindad dirige células derivadas de médula ósea (tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea), que circulan en la sangre, desde la sangre periférica hacia el tejido dañado (inducción local).

Se describen métodos para producir un extracto de células que tiene una actividad inductora de células derivadas de médula ósea, que comprenden la etapa de sumergir las células en un disolvente. Además, se describen extractos de células producidos mediante el método de producción anterior y que tienen una actividad inductora de células derivadas de médula ósea.

Las células a sumergir en un disolvente no están limitadas específicamente, y los ejemplos incluyen células derivadas de tejido y estirpes celulares establecidas a partir de células derivadas de tejido (tales como Hela y HEK293, pero no se limitan a ellas), células aisladas, células no aisladas (tales como células que existen en tejidos aislados), células introducidas con un ADN que codifica una proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3. como el tejido descrito como anteriormente, se puede usar cualquier tejido. Por ejemplo, tales tejidos incluyen, pero no se limitan a, tejidos de piel vivos o tejidos obtenidos de biopsias internas (operaciones) (tales como cerebro, pulmón, corazón, hígado, estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas, riñón, vejiga, bazo, útero, testículos, y sangre).

Los ejemplos del disolvente anterior incluyen, pero no se limitan a, disolución salina fisiológica, PBS (disolución salina amortiguadora de fosfato), y TBS (disolución salina amortiguada con Tris). Además, el tiempo de inmersión de las células o del tejido en un disolvente debería tener una duración necesaria y suficiente para inducir la necrosis celular, esto es, 1 hora a 48 horas (tal como 6 a 48 horas), y preferiblemente 12 a 24 horas, pero no está limitado a ello. Por lo tanto, la "etapa de sumergir células en un disolvente" se puede reformular como "etapa de sumergir células en un disolvente durante una duración necesaria y suficiente para inducir necrosis" o "etapa de necrosar células". Además, los ejemplos de la temperatura para sumergir células o tejido en un disolvente incluyen, pero no se limita a, 4°C a 25°C (tal como 4°C a 8°C), y preferiblemente 4°C. Además, los ejemplos del pH para sumergir células o tejido en un disolvente incluyen, sin limitación, pH 7 a 8, y preferiblemente pH 7,5. Los ejemplos del amortiguador incluyen, sin limitación, una disolución amortiguadora de fosfato a una concentración de 10 mM a 50 mM, preferiblemente 10 a 20 mM.

Además, las células o tejidos se pueden retirar de un disolvente que los contiene tras sumergirlos en el disolvente. El método para retirar células o tejidos de un disolvente no está particularmente limitado en tanto en que el método sea bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células o tejidos se pueden retirar de un disolvente centrifugando a una aceleración de la gravedad de 10 G a 4000 G (por ejemplo, 440 G) a 4°C a 25°C (por ejemplo, 4°C), seguido de la separación del sobrenadante, pero el método de eliminación no está limitado a él. El sobrenadante se puede usar como un extracto de células o tejidos.

Además, se describen métodos para producir una fracción que se une a heparina que tiene una actividad inductora de células derivadas de médula ósea, que comprenden las siguientes etapas. Además, se describen fracciones que se unen a heparina producidas mediante el método de producción anterior, que tienen una actividad inductora de células derivadas de médula ósea.

(a) una etapa de sumergir las células o tejido en un disolvente;

(b) una etapa de puesta en contacto de un extracto obtenido mediante la etapa (a) con heparina inmovilizada; y

(c) una etapa de eluir una fracción que se une a heparina (también se puede expresar como fracción purificada con heparina o fracción purificada con columna de heparina) de la heparina inmovilizada.

"Heparina inmovilizada" se refiere a heparina que está unida covalentemente a un portador insoluble. Los ejemplos del portador insoluble incluyen, pero no se limitan a, perlas de Sepharose (tal como Sepharose 4B, Sepharose 6B, etc.: GE Healthcare). También se puede usar una heparina inmovilizada comercialmente disponible (columna Hitrap Heparin HP: GE Healthcare).

Los ejemplos de condiciones para poner en contacto un extracto de células o tejidos con heparina inmovilizada incluyen, pero no se limitan a, alrededor de pH 7 a 8 (preferiblemente pH 7,5), y una concentración de sal de 0 a 200 mM, y preferiblemente alrededor de 100 a 200 mM. El tiempo durante el cual el extracto está en contacto con heparina inmovilizada no está limitado específicamente, pero el contacto se retiene preferiblemente durante 5 minutos o más en aras de una absorción suficiente de la fracción que se une a heparina sobre heparina inmovilizada. Los ejemplos de la temperatura incluyen, pero no se limitan a, 4 a 8°C, y preferiblemente 4°C. Además, los ejemplos de la condición de elución de la fracción que se une a heparina absorbida sobre la heparina inmovilizada incluyen, pero no se limitan a, un pH de alrededor de 7 a 8 y una concentración de sal de 200 a 1000 mM (preferiblemente alrededor de 1000 mM).

Adicionalmente, se describen métodos para producir una fracción que se une a un intercambiador aniónico que tiene una actividad inductora de células derivadas de médula ósea, que comprenden las siguientes etapas.

(a) una etapa de sumergir células o tejidos en un disolvente;

(b) una etapa de puesta en contacto de un extracto obtenido mediante la etapa (a) con heparina inmovilizada;

(c) una etapa de eluir una fracción que se une a heparina de la heparina inmovilizada;

(d) una etapa de puesta en contacto la fracción que se une a heparina obtenida mediante la etapa (c) con un intercambiador aniónico; y

(e) una etapa de eluir una fracción que se une a un intercambiador aniónico del intercambiador aniónico.

Además, se describen fracciones que se unen a un intercambiador aniónico producidas mediante el método de producción anterior y que tienen una actividad inductora de células derivadas de médula ósea.

Los ejemplos del intercambiador aniónico incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores que usan DEAE (dimetilaminoetilo) o Q (amonio cuaternario). También se pueden usar intercambiadores aniónicos comercialmente disponibles (tales como Source15Q, Source30Q, MonoQ, MiniQ, PC3.2/3, Mini Q4.6/50 PE, Columnas HiTrap IEX, HiTrap SP HP, Q Sepharose High Performance, Hiload 16/10 Q Sepharose HP, HiPrep 16/10 SP XL, Q Sepharose XL, HiPrep 16/10 Q FF, HiPrep 16/10DEAE FF, Q Sepharose Fast Flow, y DEAE Sepharose Fast Flow (todos ellos de GE Healthcare)).

Los ejemplos de las condiciones para poner en contacto una fracción que se une a heparina con un intercambiador aniónico son un pH de alrededor de 7 a 9 (preferiblemente pH 8), y una concentración de sal de 0 a 100 mM, preferiblemente alrededor de 50 mM, pero no se limitan a ellas. El tiempo para poner en contacto un extracto con un intercambiador aniónico no está particularmente limitado, pero el contacto se retiene preferiblemente durante 5 minutos o más en aras de una absorción suficiente de la fracción que se une al intercambiador aniónico sobre el intercambiador aniónico. Los ejemplos de la temperatura incluyen, pero no se limitan a, 4 a 16°C, y preferiblemente 4°C. Además, los ejemplos de condiciones para eluir la fracción que se une a un intercambiador aniónico absorbida sobre el intercambiador aniónico incluyen, pero no se limitan a, un pH de alrededor de 7 a 9 (preferiblemente alrededor de pH 8) y una concentración de sal de 100 a 2000 mM (preferiblemente alrededor de 1000 mM).

Se describen inductores de células derivadas de médula ósea, que comprenden el extracto mencionado anteriormente, la fracción mencionada anteriormente, o un extracto o fracción producida por el método mencionado anteriormente.

Con el uso de tal inductor, las células derivadas de médula ósea (tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea) son dirigidas a áreas locales (área a la que se administra/añade el ingrediente anterior, o un área en su vecindad), que permite la promoción de la regeneración del tejido funcional. Por lo tanto, el inductor se puede usar como un reactivo necesario para la investigación básica y clínica para el desarrollo de medicamentos regenerativos y medicamentos inductores de la regeneración. Por ejemplo, se hace posible movilizar células derivadas de médula ósea (tal como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea) a un tejido requerido *in vivo* en un animal experimental para examinar el grado de reparación tisular y reconstrucción de la función tisular. Además, se puede llevar a cabo la investigación *in vitro* sobre la inducción de la regeneración tisular movilizand o células derivadas de médula ósea (tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea).

Además, se puede promover la regeneración del tejido dañado usando el inductor anterior. Además del uso como inductor/promotor de la regeneración del tejido funcional, también se espera que el inductor anterior se use como un denominado fármaco preventivo que previene deterioros de la función tisular/orgánica causados por la reducción de células madre tisulares, o como un fármaco antienvjecimiento que retrasa el progreso de alteraciones relacionadas con la edad.

Las células derivadas de médula ósea (tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea) que se movilizan hacia el tejido dañado se diferencian en diversos tipos de células para contribuir a la regeneración funcional del tejido dañado, y al mantenimiento/mejora de las funciones. En la presente invención, los ejemplos de tejido dañado incluyen, pero no se limitan a, tejidos dañados por diversas patologías, trauma, quemaduras, inflamación, autoinmunidad, anomalías génicas, y similares, que provocan estados isquémicos, hipoperfusivos/hipóxicos. El tejido dañado también incluye tejidos necrosados.

Los tejidos en la presente invención son tejidos epiteliales y neurológicos. Además, con el uso de los promotores de la regeneración tisular anteriores, son posibles los tratamientos para inducir regeneración del tejido funcional no solamente en enfermedades cutáneas tales como úlceras cutáneas intratables, heridas de la piel, bullosis, y alopecia, pero también en daños tisulares tales como infarto cerebral, infarto de miocardio, fractura de hueso, infarto pulmonar, úlceras gástricas, y enteritis. Los tipos de animales a los que se les administrará el promotor de la regeneración tisular anterior incluyen animales humanos y no humanos, que se pueden ejemplificar mediante, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, ratas, monos, cerdos, perros, conejos, hámsters, y cobayas.

Las células derivadas de médula ósea de la presente descripción son células distintas de las células madre hematopoyéticas, o células derivadas de ellas tales como leucocitos, eritrocitos, y plaquetas, e incluyen células madre representadas por células que se han denominado hasta ahora células madre mesenquimatosas de médula ósea y poblaciones de células progenitoras de tejidos que existen en la médula ósea. Las células derivadas de médula ósea de la presente descripción se pueden aislar de una recogida de sangre de médula ósea o recogida de sangre periférica. Las células madre hematopoyéticas son no adherentes, mientras que las células derivadas de médula ósea de la presente invención se obtienen como células adherentes por medio de un cultivo celular de una fracción monocítica de sangre obtenida a partir de la recogida de sangre de médula ósea o de la recogida de sangre periférica. Además, las células derivadas de médula ósea de la presente descripción incluyen células madre mesenquimatosas, y tienen el potencial para diferenciarse en, preferiblemente, osteoblastos (la inducción de la diferenciación se puede identificar observando la calcificación), condrocitos (que se pueden identificar mediante

5 tinción positiva con azul alcian, tinción positiva con safranina O, o similar), adipocitos (que se pueden identificar mediante tinción positiva con Sudan III), y otras células mesenquimatosas tales como fibroblastos, células del músculo liso, células estrictóricas, y células de tendón; y además células nerviosas, células epiteliales (por ejemplo, queratinocitos epidérmicos y células epiteliales intestinales que expresan la familia de citoqueratinas), y células endoteliales vasculares. Sin embargo, las células a diferenciar no están limitadas a las células anteriores, y también se incluye el potencial para diferenciarse en células de órganos parenquimatosos tales como hígado, riñón, y páncreas.

10 En la presente descripción, las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea se refieren a células que existen en la médula ósea, que se recolectan directamente de la médula ósea o que se recolectan indirectamente de otros tejidos (tejidos mesenquimatosos tales como sangre, piel, y grasa), y se pueden cultivar y se pueden hacer proliferar como células adherentes en una cápsula de cultivo (hecha de plástico o de vidrio). Estas células se caracterizan por tener un potencial para diferenciarse en tejidos mesenquimatosos tales como hueso, cartílago, y grasa, y se pueden obtener a partir de la recogida de sangre de médula ósea, sangre periférica, o tejidos mesenquimatosos. Las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea también se caracterizan por tener el potencial para diferenciarse en tejidos epiteliales tales como queratinocitos que constituyen la piel, administrando estas células que se han adherido antes sobre una cápsula de cultivo a un área de lesión del cuerpo vivo.

20 Las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea de la presente descripción son células madre multipotentes, y tienen una potencia para diferenciarse preferiblemente en: osteoblastos (la inducción de la diferenciación se puede identificar observando la calcificación), condrocitos (que se pueden identificar mediante tinción positiva con azul alcian, tinción positiva con safranina O, o similar), adipocitos (que se pueden identificar mediante tinción positiva con Sudan III), y otras células mesenquimatosas tales como fibroblastos, células del músculo liso, células del músculo esquelético, células estrictóricas, y células de tendón; células nerviosas, células pigmentarias, células epidérmicas, células del folículo piloso (que expresan familia de citoqueratinas, familia de queratina del pelo, o similar), células epiteliales (por ejemplo, queratinocitos epidérmicos y células epiteliales intestinales que expresan la familia de citoqueratinas, o similares), y células endoteliales; y además preferiblemente en células de órganos parenquimatosos tales como hígado, riñón, y páncreas. Sin embargo, las células diferenciadas no se limitan a las células anteriores.

30 Además, las células madre mesenquimatosas de médula ósea humanas se pueden ejemplificar mediante, pero no se limitan a, células que se pueden obtener directamente de la recogida de sangre de médula ósea, sangre periférica, o grasa, o que se pueden obtener como células adherentes cultivando una fracción de monocitos aislada. Los marcadores para las células madre mesenquimatosas de médula ósea humanas pueden ser, por ejemplo, todos o algunos de los marcadores de Lin-negativo, CD45-negativo, y CD44-positivo, pero no se limitan a ellos.

35 Además, las células madre mesenquimatosas de médula ósea de ratón se pueden ejemplificar mediante, pero no se limitan a, células que se pueden obtener mediante métodos descritos en los Ejemplos. Los marcadores para las células madre mesenquimatosas de médula ósea de ratón pueden ser, por ejemplo, todos o algunos de los marcadores de Lin-negativo, CD45-negativo, y CD44-positivo, Sca-1 positivo y c-kit negativo, pero no se limitan a ellos.

40 Las células progenitoras de tejidos se definen como células no diferenciadas que tienen una potencia unidireccional para diferenciarse en tejidos/células específicos distintos del sistema sanguíneo, e incluyen células no diferenciadas que tienen la potencia para diferenciarse en tejido mesenquimatoso, tejido epitelial, tejido nervioso, órganos parenquimatosos, y endotelio vascular, como se menciona anteriormente.

45 Para los promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención, no hay ninguna limitación particular en los componentes distinta del al menos uno de los ingredientes (a) a (i) mencionados anteriormente, en tanto que el componente no inhiba la inducción de células derivadas de médula ósea (tales células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea) ni inhiba la promoción de la regeneración tisular. Por ejemplo, además de la al menos una de las sustancias (a) a (i) mencionadas anteriormente, los promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención pueden contener: moléculas (grupos moleculares) relacionados con la potenciación de la función de HMGB1, HMGB2, o HMGB3 para inducir la regeneración de tejido funcional; moléculas (grupos moleculares) que inhiben acciones no previstas de HMGB1, HMGB2, o HMGB3; factores que regulan la proliferación y diferenciación de células derivadas de médula ósea (tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea); y otros factores que potencian/mantienen estos factores o las funciones celulares.

55 Los tipos de animales que sirven como fuente de proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3 para los promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención incluyen animales humanos y no humanos, que se pueden ejemplificar mediante seres humanos, ratones, ratas, monos, cerdos, perros, conejos, hámsters, y cobayas, pero el tipo es preferiblemente el mismo que el animal al que se le administrará la proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3.

Las proteínas HMGB1 en promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención se pueden

ejemplificar mediante, pero no se limitan a, proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, o 5. Las proteínas HMGB1 empleadas según la presente invención también pueden incluir proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, o 5. Los ejemplos de tales proteínas incluyen: 1) proteínas aisladas que comprenden una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, supresiones, inserciones, y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, o 5, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, o 5; y 2) proteínas aisladas que son codificadas por los ADN que se hibridan en condiciones restrictivas con los ADN que comprenden la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2, 4, o 6, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, o 5.

Las proteínas HMGB2 en promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención se pueden ejemplificar mediante, pero no se limitan a, proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7, 9, u 11. Las proteínas HMGB2 empleadas según la presente invención también pueden incluir proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7, 9, u 11. Los ejemplos de tales proteínas incluyen: 1) proteínas aisladas que comprenden una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, supresiones, inserciones, y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7, 9, u 11, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7, 9, u 11; y 2) proteínas aisladas que son codificadas por los ADN que se hibridan en condiciones restrictivas con los ADN que comprenden la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 8, 10, o 12, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7, 9, u 11.

Las proteínas HMGB3 en promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención se pueden ejemplificar mediante, pero no se limitan a, proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13 o 15. Las proteínas HMGB3 empleadas según la presente invención también pueden incluir proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13 o 15. Los ejemplos de tales proteínas incluyen: 1) proteínas aisladas que comprenden una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, supresiones, inserciones, y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13 o 15, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13 o 15; y 2) proteínas aisladas que son codificadas por los ADN que se hibridan en condiciones restrictivas con los ADN que comprenden la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 o 16, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13 o 15.

Las proteínas aisladas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 pueden ser homólogas o parálogas de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15. Los expertos en la técnica pueden aislar proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, mediante métodos conocidos (volumen suplementario de "Jikken Igaku (Experimental Medicine), Idenshi Kougaku Handbook (Genetic Engineering Handbook)", p. 246-251, publicado por Yodosha Co., Ltd., 1991).

Los ejemplos de proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 incluyen proteínas que tienen actividad inductora de células derivadas de médula ósea (tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea).

Las proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, supresiones, inserciones, y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, incluyen proteínas de origen natural. Generalmente, los genes eucariotas tienen un polimorfismo como se conoce en genes de interferón, etc. Las alteraciones en las secuencias nucleotídicas causadas por el polimorfismo pueden dar como resultado una o más sustituciones, supresiones, inserciones, y/o adiciones de aminoácidos. Las proteínas de origen natural, tales como las que comprenden una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, supresiones, inserciones, y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, están incluidas en las proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 de la presente invención.

La presente invención también incluye proteínas mutantes producidas artificialmente, en tanto que sean funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15. Los métodos conocidos que provocan mutaciones aleatorias a una secuencia nucleotídica dada incluyen sustitución o sustituciones de par o pares de bases a través de tratamiento del ADN con ácido nitroso (Hirose, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79:7258-7260, 1982). Este método permite la introducción aleatoria de sustitución o sustituciones de par o pares de bases en un segmento específico mediante tratamiento con ácido nitroso del segmento que se desea mutar. Como alternativa, las tecnologías para dirigir al sitio una mutación diana incluyen el método de dúplex con saltos (Kramer W. y Fritz HJ., Methods in Enzymol., 154:350-367, 1987), y similares. Un vector bicatenario cíclico, en el que se clona un gen al que se le va a introducir una mutación, se separa en hebras sencillas. Estas hebras sencillas se hibridan con un oligonucleótido sintético mutado en el sitio

diana. Un ADN monocatenario complementario derivado del vector, linealizado mediante una enzima de restricción, se recombina con el vector monocatenario cíclico, y el espacio entre el oligonucleótido y el vector se llena usando una ADN polimerasa, que entonces se constituye en un vector bicatenario completo mediante ligación.

5 El número de aminoácidos a modificar estaría típicamente dentro de 50, preferiblemente dentro de 30, y más preferiblemente dentro de 5 aminoácidos (por ejemplo, un aminoácido).

10 Cuando un aminoácido se sustituye artificialmente, la sustitución por un aminoácido que tiene propiedades similares daría como resultado el mantenimiento de la actividad de la proteína original. Las proteínas empleadas según la presente invención incluyen proteínas que resultan de una sustitución conservativa en la sustitución anterior del aminoácido o aminoácidos, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15. La sustitución conservativa se considera importante cuando se sustituye un aminoácido o aminoácidos de dominios importantes para las actividades de la proteína. Tal sustitución conservativa de aminoácido o aminoácidos es bien conocida por los expertos en la técnica.

15 Los ejemplos de grupos de aminoácidos adecuados para la sustitución conservativa incluyen aminoácidos básicos (tales como lisina, arginina, e histidina), aminoácidos ácidos (tales como ácido aspártico y ácido glutámico), aminoácidos polares no cargados (tales como glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, y cisteína), aminoácidos no polares (tales como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, y triptófano), aminoácidos  $\beta$ -ramificados (tales como treonina, valina, e isoleucina), y aminoácidos aromáticos (tales como tirosina, fenilalanina, triptófano, e histidina).

20 Además, la sustitución no conservativa puede incrementar las actividades de la proteína (por ejemplo, proteínas activadas constitutivamente).

25 Además, las proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 se pueden obtener por métodos que utilizan la hibridación. Es decir, se usa como sonda un ADN que codifica la proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3 de la presente invención como se muestra en la SEC ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, o 16, o un fragmento del mismo, y después se aíslan los ADN que se pueden hibridar a él. Una reacción de hibridación realizada en condiciones restrictivas conduce a la selección de ADN muy homólogo como secuencia nucleotídica. Esto aumenta las posibilidades de proteínas aisladas que contienen proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3. Los ejemplos de una secuencia nucleotídica muy homóloga incluyen aquellas que tienen 70% o más, y deseablemente 90% o más de identidad.

30 En un ejemplo específico, la expresión "condiciones restrictivas" se refiere a condiciones de hibridación con 6 x SSC, formamida al 40% a 25°C, y lavado subsiguiente con 1x SSC a 55°C. La restricción depende de las condiciones tales como concentración de sal, concentración de formamida, o temperatura; sin embargo, para los expertos en la técnica es obvio cómo ajustar estas condiciones para obtener una restricción necesaria.

35 Usando la hibridación, por ejemplo, se pueden aislar ADN que codifican homólogos de las proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 distintas de aquellas proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15.

40 Las proteínas que son funcionalmente equivalentes a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 tienen normalmente una homología elevada con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15. La expresión "homología elevada" se refiere a una identidad de secuencia de al menos 30% o más, preferiblemente 50% o más, más preferiblemente 80% o más (por ejemplo, 95% o más). La identidad de las secuencias nucleotídicas y secuencias de aminoácidos se puede determinar usando un sitio de búsqueda de homología vía internet (por ejemplo, se pueden usar búsquedas de homología tales como FASTA, BLAST, PSI-BLAST, y SSEARCH en DNA Data Bank of Japan (DDBJ) [cuyos ejemplos incluyen la página de búsqueda de homología (Search and Analysis) en el sitio web del DNA Data Bank of Japan (DDBJ); <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>]. Además, se pueden llevar a cabo búsquedas usando BLAST a través del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (cuyos ejemplos incluyen la página de BLAST en la página de inicio del sitio web de NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol., 1990, 215(3):403-10; Altschul, S.F. & Gish, W., Meth. Enzymol., 1996, 266:460-480; Altschul, S.F. et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402)).

50 Por ejemplo, en el cálculo de la identidad de las secuencias de aminoácidos usando Advanced BLAST 2.1, el valor de la identidad (%) se puede obtener mediante lo siguiente: se usa blastp como el programa, el valor esperado se ajusta a 10, todos los filtros se ajustan a OFF, se usa BLOSUM62 para la matriz, y el coste de la existencia de espacios, por coste de espacio de resto, y la relación lambda se ajustan a 11, 1, y 0,85, respectivamente (parámetros por defecto) (Karlín, S. y S. F. Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68; Karlín, S. y S. F. Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7).

Las proteínas empleadas según la presente invención, o proteínas funcionalmente equivalentes a ellas, pueden ser proteínas sometidas a diversas modificaciones, tal como modificación fisiológica con cadenas de azúcar y similares, marcaje con sustancias fluorescentes o radioactivas, o fusión con otras proteínas. Particularmente en recombinantes

que se describirán más tarde, la modificación con cadenas de azúcar puede variar dependiendo de los hospedantes usados para la expresión. Sin embargo, incluso si hay una diferencia en las modificaciones con cadenas de azúcar, todas las proteínas que tienen propiedades similares a aquellas de las proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 descritas aquí son proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 de la presente invención, o proteínas funcionalmente equivalentes a ellas.

Las proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 se pueden obtener no solo de materiales vivos, sino también en forma de recombinantes al incorporar genes que codifican estas proteínas en un sistema de expresión apropiado. A fin de obtener proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 mediante técnicas de ingeniería genética, los ADN mencionados anteriormente que codifican las proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 se pueden incorporar en un sistema de expresión apropiado, y entonces se pueden expresar. Los ejemplos de sistemas de hospedante/vector aplicables a la presente invención incluyen el vector de expresión pGEX y *E. coli*. Con pGEX, los genes extraños se pueden expresar como una proteína de fusión con glutationa-S-transferasa (GST) (Gene, 67:31-40, 1988). pGEX, al que se le ha incorporado un gen que codifica la proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3, se introduce en una cepa de *E. coli*, tal como BL21, mediante choque térmico, se incuba durante un tiempo apropiado, y entonces se añade isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) para inducir la expresión de las proteínas HMGB1 fusionada con GST, HMGB2 fusionada con GST, o HMGB3 fusionada con GST. Puesto que GST de la presente invención se absorbe sobre Glutathione Sepharose 4B, el producto de expresión se separa fácilmente y se purifica mediante cromatografía en columna de afinidad.

Además, lo siguiente también se puede aplicar como sistemas de hospedante/vector para obtener recombinantes de las proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3. En primer lugar, cuando se usan bacterias como hospedantes, hay comercialmente disponibles vectores de expresión para proteínas de fusión que utilizan una etiqueta de histidina, una etiqueta de HA, y una etiqueta de FLAG, y similar. Con respecto a levaduras, se sabe que las levaduras que pertenecen al género *Pichia* son eficaces para la expresión de proteínas que contienen cadenas de azúcar. En términos de la adición de cadenas de azúcar, también son útiles los sistemas de expresión que utilizan un vector baculovírico con células de insecto como hospedante (Bio/Technology, 6:47-55, 1988). Además, usando células de mamífero, la transfección de un vector se lleva a cabo usando promotores tales como CMV, RSV, y SV40. Cualquiera de estos sistemas de hospedante/vector se puede usar como un sistema de expresión de las proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3. Además, los genes también se pueden introducir usando vectores víricos tales como vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, y vectores víricos adenoasociados.

Las proteínas así obtenidas empleadas según la presente invención se pueden aislar intracelular o extracelularmente (medio, etc.), y se pueden purificar como proteínas que son sustancialmente puras y homogéneas. Las proteínas se pueden separar y purificar usando métodos de separación y purificación que se usan habitualmente en la purificación de proteínas, y no están particularmente limitados. Por ejemplo, las proteínas se pueden separar y purificar seleccionando y combinando apropiadamente una columna de cromatografía, filtro, ultrafiltración, precipitación salina, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, electroforesis con enfoque isoelectrónico, diálisis, recristalización, y similar.

Los ejemplos de cromatografías incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, y cromatografía de adsorción (Marshak et al., *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografías se pueden realizar usando cromatografías en fase líquida, tales como HPLC y FPLC.

Además, las proteínas empleadas según la presente invención son preferiblemente proteínas sustancialmente purificadas. Aquí, la expresión "sustancialmente purificada" significa que la pureza de la proteína de la presente invención (proporción de la proteína de la presente invención en los componentes proteicos totales) es 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 100%, o próximo a 100%. El límite superior para "próximo a 100%" depende de las técnicas de purificación y técnicas analíticas de los expertos en la técnica, cuyos ejemplos son 99,999%, 99,99%, 99,9%, 99%, y similar.

Además, una proteína sustancialmente purificada incluye cualquier proteína purificada mediante cualquier método de purificación, en tanto que la pureza de la proteína sea como se menciona anteriormente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, proteínas sustancialmente purificadas seleccionando y combinando apropiadamente la cromatografía en columna, filtro, ultrafiltración, precipitación salina, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, electroforesis de enfoque isoelectrónico, diálisis, recristalización, y similar, mencionados anteriormente.

Las células en las que se liberan o segregan proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 de los promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención incluyen básicamente todos los tipos de células derivadas de tejido *in vivo*. Las células que se pueden recolectar y cultivar fácilmente se ejemplifican mediante, pero sin limitarse a, fibroblastos (tales como fibroblastos de piel normales y estirpes celulares derivadas de ellos). Además, las células que segregan proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 también se pueden producir mediante la siguiente manera. Un vector se produce insertando un ADN que codifica la proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3, o un ADN

que codifica una proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3 ligado con un ADN que codifica una señal de secreción (ATG CAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTG TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC; SEC ID NO: 17), en un vector de expresión conocido o un vector de terapia génica. El vector producido se introduce en células de mamífero tales como fibroblastos (tales como fibroblastos de piel normales y estirpes celulares derivadas de ellos), células de insectos, y otras células. No hay limitaciones particulares en los tipos de animales a partir de los que derivan estas células, aunque se usan preferiblemente células procedentes del tipo de animal del animal diana sometido a regeneración tisular, células de la propia diana, o células derivadas de un pariente consanguíneo de la diana sometida a regeneración tisular.

Los ADN que codifican proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 de los promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención pueden ser los ADNc, ADN genómicos, ADN naturales, o ADN sintetizados artificialmente, en tanto que codifiquen la proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3. Los ADN que codifican proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3 están contenidos normalmente en promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención en una forma insertada en vectores (tales como vectores de terapia génica).

Los ejemplos de los vectores de terapia génica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, vectores plasmídicos, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, vectores del virus de Sendai, vectores de la cubierta del virus de Sendai, y vectores del virus del papiloma. Los vectores de la terapia génica pueden contener secuencias de ADN promotoras que inducen eficazmente la expresión génica, factores que regulan la expresión génica, y moléculas que son necesarias para mantener la estabilidad del ADN.

Los promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención también pueden contener: péptidos parciales de la proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3 que tienen actividad induciendo células derivadas de médula ósea (tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea); células que segregan estos péptidos parciales; o vectores insertados con los ADN que codifican estos péptidos parciales.

Los métodos para administrar promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención incluyen la administración oral o parenteral. Los ejemplos específicos de los métodos de administración incluyen la administración mediante inyección, administración intranasal, administración transpulmonar, y administración percutánea. Los ejemplos de administración mediante inyección incluyen inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, e inyección hipodérmica, mediante las cuales los inductores o los promotores de la regeneración tisular de la presente invención se pueden administrar sistémica o localmente (tal como subcutánea o intracutáneamente, o a la superficie de la piel, globo ocular, conjuntiva palpebral, mucosa nasal, mucosa intraoral, mucosa gastrointestinal, mucosa vaginal/intrauterina, o sitio de lesión).

El método de administración se puede seleccionar apropiadamente según la edad y los síntomas del paciente. Cuando se administra una proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3, la dosis por tiempo de la proteína se puede seleccionar en un intervalo de 0,0000001 mg a 1000 mg por kg de peso corporal de un paciente. Como alternativa, la dosis se puede seleccionar en un intervalo de 0,00001 mg a 100000 mg por cuerpo de paciente, por ejemplo. Cuando se administran células que segregan proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3, o vectores de terapia génica a los que se les ha insertado los ADN que codifican proteínas HMGB1, HMGB2, o HMGB3, se pueden administrar de manera que las cantidades de proteína HMGB1, HMGB2, o HMGB3 en los tejidos dañados están dentro del intervalo anterior. Sin embargo, la dosis de los promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención no está limitada a ellas.

Los promotores de la regeneración tisular para uso según la presente invención se pueden formular según los métodos habituales (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, última edición, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A.) y pueden contener juntos vehículos farmacéuticamente aceptables y aditivos. Los ejemplos incluyen tensioactivos, excipientes, colorantes, perfumes, conservantes, estabilizantes, amortiguadores, agentes de suspensión, agentes isotonicantes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, promotores de la fluidez, y agentes saborizantes, aunque no están limitados a ellos, y se pueden usar apropiadamente otros vehículos habituales. Los ejemplos específicos incluyen ácido silícico anhidro ligero, lactosa, celulosa cristalina, manitol, almidón, carmelosa cálcica, carmelosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, dietilaminoacetato de polivinilacetato, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicérido de ácido graso de cadena media, aceite de ricino hidrogenado polioxi-etileno 60, azúcar blanca, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, y sales inorgánicas.

### Ejemplos

La presente invención se describirá aquí más abajo con referencia a los Ejemplos, pero no se ha de interpretar como limitada a estos Ejemplos.

#### [Ejemplo 1]

Objetivo: Evaluación de la contribución de células derivadas de médula ósea a la regeneración funcional de tejido de piel transplantado a un cuerpo vivo.

Método: En vista del objetivo anterior, se llevaron a cabo estudios mediante los siguientes métodos.

1) Se examinó el grado de contribución de células derivadas de médula ósea a la regeneración funcional de tejido injertado, utilizando el sistema de transplante de piel viva de ratones a los que se les ha transplantado la médula ósea y que expresan GFP. Específicamente, ratones C57BL/6 machos de 6 a 8 semanas se irradiaron con una dosis letal de radiación (10 Gy), e inmediatamente después de eso, se transplantaron células de médula ósea derivadas de ratones transgénicos que expresan GFP (proteína fluorescente verde) ( $5 \times 10^6$  células/0,1 ml de disolución fisiológica amortiguadora de fosfato a pH 7,4) a través de la vena caudal (Fig. 1).

2) Las células de médula ósea transplantadas se dejaron injertar (durante 6 semanas) y como resultado, se obtuvieron ratones a los que se les transplantó la médula ósea que expresan GFP. Después, se transplantó piel de un ratón neonatal (hembra) a la piel dorsal de los ratones a los que se les transplantó la médula ósea y que expresan GFP.

3) El injerto de piel se dejó injertar y, habiendo tenido una regeneración tisular de la piel satisfactoria (4 semanas), se observó el grado de acumulación de fluorescencia de GFP en el área de la piel injertada, usando microscopio estereoscópico de fluorescencia.

4) Bajo anestesia mediante inhalación, el injerto de piel se recolectó mediante biopsia. Después, se prepararon secciones de piel congeladas ( $6 \mu\text{m}$ ) usando un microtomo con un dispositivo de enfriamiento, y entonces se fijaron con paraformaldehído al 4% (durante 30 minutos). Los núcleos celulares en el tejido se tiñeron con DAPI. La inmunotinción se llevó a cabo usando un anticuerpo contra queratina 5 específica de células epidérmicas. El tejido se selló para examinar la presencia de células derivadas de médula ósea positivas a GFP con un microscopio de láser confocal. Una parte de la muestra se tiñó con HE, para examinar su construcción tisular.

Resultado: En el sistema del transplante de piel viva de ratones a los que se les transplantó la médula ósea y que expresan GFP, se observó una fuerte acumulación de fluorescencia de GFP que corresponde a la región de piel regenerada (Fig. 2). Además, con la observación histológica usando la muestra de HE del injerto de piel, se observó regeneración funcional del tejido de la piel que contiene un gran número de folículos pilosos (Fig. 2). Con la observación usando un microscopio de láser confocal, se observó fluorescencia de GFP en muchos queratinocitos epidérmicos que expresan queratina 5, fibroblastos dérmicos, y otras células del músculo liso y adipocitos, mostrando que estas células derivan de la médula ósea (Fig. 3). Es decir, por primera vez se dio a conocer que muchas de las células epiteliales y mesenquimatosas requeridas para la regeneración funcional de la piel transplantada fueron suministradas a partir de células madre derivadas de médula ósea.

Discusión: Por primera vez, estos resultados del estudio mostraron claramente un descubrimiento exitoso de que las células derivadas de médula ósea contribuyen enormemente a la regeneración de la piel tras el transplante de piel, que es un procedimiento clínico rutinario.

Se da a conocer que la médula ósea tiene dos sistemas de células madre: las células madre hematopoyéticas, y las células madre mesenquimatosas. Es difícil imaginar que el gran número de células epiteliales y células mesenquimatosas derivadas de médula ósea que se movilizaron a la piel transplantada (como se muestra mediante el presente estudio) se suministraron solamente a partir de células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea. Esto sugiere fuertemente la posible contribución de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea a la regeneración funcional de tejidos transplantados. Es decir, se predijo que, inmediatamente tras el injerto de piel, se libera del tejido de piel receptor un factor para movilizar células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, que conduce a la hipoperfusión/necrosis, en el que las células madre mesenquimatosas se movilizan desde la médula ósea a través de la circulación de la sangre periférica hacia el trozo de piel transplantada, e induciendo así la regeneración del tejido funcional de la piel.

### [Ejemplo 2]

Objetivo: Identificación de un factor inductor de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en un extracto de tejido de piel.

Método: Con el objetivo de identificar un factor movilizador de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea que se espera que sea liberado de la piel cortada en condiciones hipoperfusivas, se llevaron a cabo estudios mediante los siguientes métodos.

1) Para obtener células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea de ratón, se recolectaron células de médula ósea a partir del fémur o hueso de la tibia de ratones C57BL/6, y entonces se extendieron sobre una placa de cultivo celular que tiene D-MEM que contiene 10% de suero fetal bovino (Nacalai) como medio de cultivo celular, y entonces se cultivaron en la condición de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Cuando las células proliferaron hasta el punto de ocupar 70 a 100% del área inferior de la placa de cultivo, las células se despegaron de la placa de cultivo usando 0,25% de tripsina/1 mM de EDTA (Nacalai), y entonces se cultivaron en las condiciones anteriores. Este procedimiento de pasada y cultivo se repitió al menos cinco veces. Posteriormente, estas células adherentes se aislaron y cultivaron, seguido de un análisis de antígenos de la superficie celular usando citometría de flujo, para confirmar que todas estas células eran Lin-negativas,

CD45-negativas, y CD44-positivas, Sca-1-positivas y c-kit-negativas. Se confirmó que estas células fueron capaces de diferenciarse en células óseas y adipocitos, y tienen propiedades de células madre mesenquimatosas de médula ósea.

5 2) Trozos de piel libre obtenidos de 400 ratones neonatos se sumergieron en 400 ml de disolución fisiológica amortiguadora de fosfato a pH 7,4 (PBS). La disolución se incubó a 4°C durante 24 horas, y entonces se centrifugó a 440 G a 4°C durante 10 minutos para eliminar el tejido. El sobrenadante se recolectó para preparar un extracto de piel.

10 3) A fin de confirmar que el extracto de tejido de piel así obtenido tiene actividad inductora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, se examinó, usando una cámara de Boyden, la actividad de migración de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea de ratón C57BL6, cuya estirpe celular ya se ha establecido por los presentes inventores. Específicamente, se insertó un extracto de piel (25  $\mu$ l) en la cámara inferior (volumen: 25  $\mu$ l) de la cámara de Boyden, y se colocó sobre él una membrana de policarbonato que tiene poros finos de 8  $\mu$ m. La cámara superior (volumen: 50  $\mu$ l) de la cámara de Boyden se colocó además sobre esto haciendo contacto, y se llenó con una suspensión de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (5 x 10<sup>4</sup> células/50 ml de disolución de cultivo: DMEM/10% de suero fetal bovino). La cámara se incubó en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 4 a 24 horas. Tras el cultivo, la cámara superior se retiró, y se extrajo la membrana de silicona. El número de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea que habían migrado a la cámara inferior a través de los poros finos se examinó cuantitativamente mediante tinción.

20 4) Para purificar factores que tienen una actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en el extracto de piel, se llevó a cabo una cromatografía en columna de afinidad de heparina y una cromatografía en columna de intercambio aniónico (columna Q). El extracto de piel se diluyó 10 veces con 9 volúmenes de amortiguador de fosfato 20 mM a pH 7,5 a 4°C (disolución diluida A). Se vertió amortiguador de fosfato 20 mM a pH 7,5 (30 ml) en la columna HiTrap Heparin HP (volumen de la columna: 5 ml, GE Healthcare) previamente para equilibrar la columna. Después, la disolución diluida A se dejó unir a la columna. Entonces, la columna se lavó con amortiguador de fosfato 20 mM a pH 7,5 con NaCl 100 mM (30 ml). Para eluir las proteínas absorbidas, se vertió amortiguador de fosfato 20 mM a pH 7,5 con NaCl 1000 mM en la columna, para eluir las fracciones en los tubos. Las fracciones que tienen la capacidad migratoria según el método de evaluación de la actividad migratoria usando una cámara de Boyden como se describió en 2) se recogieron de cada fracción absorbida. Se diluyó con 9 volúmenes de Tris HCl 50 mM pH 8,0 (disolución diluida B). Se vertió Tris HCl 50 mM pH 8,0 (30 ml) en una columna HiTrap mono Q (volumen de la columna: 1 ml, GE Healthcare) previamente para equilibrar la columna. Posteriormente, la disolución diluida B se dejó unir a la columna. A fin de eluir las proteínas absorbidas, se vertieron Tris HCl pH 8,0 y NaCl 1000 mM en la columna, para eluir las fracciones en los tubos. El procedimiento de purificación anterior se puede llevar a cabo todo él a 4 a 16°C, pero se lleva a cabo preferiblemente a 4 a 8°C, y más preferiblemente 4°C. Los eluatos se evaluaron mediante el método de evaluación de la actividad migratoria usando la cámara de Boyden como se describió en 2).

35 5) Las preparaciones purificadas derivadas del extracto de piel que tienen la actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, que se obtuvo combinando la evaluación de la actividad migratoria usando una cámara de Boyden y cromatografía en columna, se sometieron a electroforesis de SDS-PAGE para separarlas en el gel basándose en el peso molecular, y las bandas de las proteínas migratorias se detectaron mediante tinción con plata.

40 6) Entre los grupos de proteínas derivadas de extracto de piel que se habían sometido a electroforesis de SDS-PAGE y que se separaron en el gel como bandas individuales mediante la tinción con plata de 5), se cortaron las bandas de proteínas obtenidas a partir de preparaciones purificadas mediante cromatografía que tienen la actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea más fuerte, y entonces se llevó a cabo la identificación de estas proteínas mediante espectrometría de masas y análisis de bases de datos.

45 7) Entre los grupos de proteínas identificados, se seleccionaron las proteínas candidatas que tienen la actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea. Las preparaciones purificadas que incluyen tales proteínas candidatas se trataron con anticuerpos neutralizantes (se incubaron 100  $\mu$ l de disolución de preparación purificada en hielo durante 30 minutos con anticuerpo policlonal diluido 100 veces de la proteína candidata. Entonces, se examinó el grado de inhibición sobre la actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea mediante evaluación de la capacidad migratoria usando una cámara de Boyden.

50 8) Las preparaciones de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea purificadas obtenidas se mezclaron en Matrigel en alrededor de un volumen de 10%. Un tubo de silicona que tiene un diámetro de alrededor de 1 mm y una longitud de 5 mm se llenó con el Matrigel, que entonces se transplantó subcutáneamente a la espalda de ratones a los que se les transplantó la médula ósea y que expresan GFP. Dos semanas después, el tubo insertado se extrajo, y se analizó cuantitativamente mediante un fluorímetro la

60

fluorescencia de GFP que se emite de las células derivadas de médula ósea que habían migrado al tubo. Después, las células migratorias se extrajeron del tubo, y se inocularon en un medio DMEM/10% de suero fetal bovino, seguido del cultivo en una incubadora de CO<sub>2</sub>, para examinar la actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea *in vivo*. Estas células que se cultivaron de forma continua durante 2 semanas se fijaron con paraformaldehído al 2% a 25°C durante 10 minutos, y se enjuagaron con PBS cuatro veces, 5 minutos cada vez, para eliminar el paraformaldehído por lavado. Entonces, se trató con una disolución de leche desnatada al 2%, y se dejó reaccionar con una dilución de 1000 veces de un anticuerpo anti-queratina 5 de ratón (diluido con leche desnatada al 2% que contiene 0,5% de tween 20) a 4°C durante 16 horas. El anticuerpo se eliminó por lavado con PBS cuatro veces durante 5 minutos cada vez. Entonces se dejó reaccionar con anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con Alexa546 diluido 1000 veces (diluido con leche desnatada al 2%) a 25°C durante 1 hora. El protocolo experimental anterior de 1) a 8) se resume en la Fig. 4.

Resultado: Partiendo de la disolución del extracto de piel cortada de ratón neonato en PBS (Fig. 5), las proteínas que tienen la actividad movilizadoras de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea se sometieron a identificación y análisis funcional mediante los métodos mencionados anteriormente. La evaluación de la actividad migratoria usando una cámara de Boyden mostró que el extracto de piel tiene una actividad inductora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea extremadamente fuerte (Fig. 6). Usando esta actividad como índice, se usó una columna de afinidad de heparina y una columna de intercambio aniónico (columna Q) para proceder con la purificación del factor diana. Las fracciones obtenidas se analizaron cada una mediante electroforesis en SDS-PAGE. Como resultado, se mostró una fuerte actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea mediante tinción con plata en la preparación purificada que contiene varias proteínas que se separaron en el gel en forma de bandas individuales (Línea 7 en la Fig. 7). Las bandas obtenidas teñidas con plata se cortaron, y entonces se sometieron a espectrometría de masas y análisis de bases de datos. Como resultado, se reveló que la proteína que tiene un peso molecular de alrededor de 25.000 indicada por la flecha fue HMGB1 (Fig. 7). Para aclarar que HMGB1 contenida en esta fracción purificada (Línea 7) tiene la actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea pretendida, se llevó a cabo un experimento de inhibición de la migración usando el anticuerpo policlonal anti-MGB1. Como resultado, se reveló que el anticuerpo policlonal anti-HMGB1 inhibe fuertemente la actividad migratoria de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en la preparación purificada (Fig. 8), y que el factor movilizador de células madre derivadas de médula ósea presente en el extracto de piel es HMGB1.

Además, para confirmar que HMGB1 tiene una actividad movilizadora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea *in vivo*, se insertó subcutáneamente un tubo de silicona que contiene esta preparación purificada en la espalda de un ratón al que se le transplantó la médula ósea y que expresa GFP. Dos semanas más tarde, se examinaron las propiedades de las células movilizadas al tubo (Fig. 9). Como resultado, la preparación purificada de HMGB1 movilizó un mayor número de células derivadas de médula ósea positivas a GFP hacia el tubo (alrededor de tres veces) en comparación con el control comparativo (preparación purificada usada para la Línea 4 en SDS-PAGE de la Fig. 7) (Fig. 10). La Fig. 11 muestra una imagen de gran aumento mediante un microscopio estereoscópico de fluorescencia. Posteriormente, las células positivas a GFP movilizadas hacia el tubo se extrajeron, y se cultivaron en medio DMEM/10% de suero fetal bovino. Como resultado, inmediatamente después del cultivo se observaron células que flotan con forma redonda (Fig. 12); sin embargo, 24 horas después se confirmó que las células derivadas de médula ósea positivas a GFP se adhieren sobre la cápsula de cultivo y proliferaron en forma de células similares a fibroblastos con forma de husillo, y posteriormente en forma de células similares a las epiteliales con forma de cilindroide (Fig. 13). Cuando estas células se cultivaron de forma continua durante otras 2 semanas, se observaron células que forman folículos pilosos entre las células derivadas de médula ósea positivas a GFP (Fig. 14A; campo de luz, bajo aumento, Fig. 14B; fluorescencia de GFP, bajo aumento, Fig. 14C; campo de luz, gran aumento, Fig. 14D; fluorescencia de GFP, gran aumento). Además, cuando se usaron técnicas inmunohistoquímicas para queratina 5, un marcador de queratinocitos epiteliales, se observaron células positivas a queratina 5 entre las células derivadas de médula ósea positivas a GFP (Fig. 14E; campo de luz, Fig. 14F; fluorescencia de células positivas a queratina 5).

Discusión: Esta vez, los presentes inventores han descubierto por primera vez en el mundo que: trozos de piel libre producen HMGB1; la HMGB1 producida tiene actividad movilizadora de una gran cantidad de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea hacia los trozos de piel; las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea movilizadas hacia los trozos de piel se diferencian en células mesenquimatosas tales como fibroblastos, adipocitos, células del músculo liso en el tejido de la piel, y se diferencian además en células que forman folículos pilosos de células epidérmicas, para inducir regeneración funcional de tejidos de piel transplantados. Se puede predecir fácilmente que esta movilización de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea por HMGB1, y las funciones de regeneración de tejido funcional resultantes, no solo para la regeneración de piel transplantada, sino también como un mecanismo para inducir la regeneración de tejido funcional en diversos órganos/tejidos dañados que acompañan a la hipoperfusión/necrosis. Los presentes inventores creen firmemente que, si el desarrollo de fármacos usando una formulación de HMGB1 permite la movilización de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea hacia el área local durante la regeneración de los tejidos dañados, permitiría una terapia inductora de la regeneración de tejido funcional para órganos funcionales vitales, sin que los órganos se hagan disfuncionales debido a la curación de cicatrices fibrosas.

**[Ejemplo 3]**

Objetivo: Identificación de la familia de HMGB1 en el extracto de piel, y examen de la actividad inductora de células madre mesenquimatosas de médula ósea

Método: Usando el método de transferencia Western se confirmó si el extracto de piel de ratón neonato contenía o no la familia de proteínas HMGB. Se usaron como muestra diez  $\mu\text{l}$  del extracto de piel obtenido en el [Ejemplo 2], y se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron sobre una membrana de PVDF usando un dispositivo de transferencia (ATTO). La membrana se incubó con PBS que contiene 3% de leche desnatada y 0,1% de Tween 20 (S-T-PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora, y entonces se dejó reaccionar con cada uno de anticuerpo de conejo anti-HMGB1 de ratón, anticuerpo de conejo anti-HMGB2 de ratón, o anticuerpo de conejo anti-HMGB3 de ratón, que se diluyeron 1000 veces con S-T-PBS, a 4°C durante 16 horas. Tras la reacción, la membrana de PVDF se lavó con S-T-PBS cinco veces durante 5 minutos. Después, la membrana de PVDF se incubó con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa diluido 2000 veces (diluido con S-T-PBS) (GE Healthcare) a 25°C durante 1 hora. Posteriormente, tras lavar con S-T-PBS cinco veces durante 5 minutos, la membrana de PVDF se dejó reaccionar con ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare). La película de ECL se expuso y se desarrolló para detectar la presencia de las proteínas HMGB1, HMGB2, y HMGB3.

Se extrajo ARN de la piel de ratón neonato usando Trizol (Invitrogen), y posteriormente el ADNc se sintetizó usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript III (Invitrogen). Usando este ADNc como molde, los ADNc de HMGB 1, HMGB2, y HMGB3 se amplificaron usando el método de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los ADNc se insertaron en el vector plasmídico pCAGGS para expresar proteínas en células de mamífero, de manera que se pudiesen expresar proteínas con una secuencia de etiqueta Flag adicional (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Lys; SEC ID: 18) en el término N de la secuencia de aminoácidos. Estos vectores plasmídicos se introdujeron en HEK293 (estirpe celular de cultivo derivado de riñón embrionario humano) y se cultivaron durante 48 horas para expresar las proteínas. Las células que expresan cada una de las proteínas HMGB1, HMGB2, y HMGB3, y el sobrenadante del cultivo se incubaron a 4°C durante 16 horas, que entonces se centrifugó a 4400 g durante 5 minutos para recolectar el sobrenadante. Se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  del gel del anticuerpo anti-Flag (Sigma) en 50 ml de este sobrenadante, y entonces se incubó a 4°C durante 16 horas. La centrifugación se llevó a cabo entonces para recolectar el gel, y se lavó con PBS cinco veces. Posteriormente, la proteína se eluyó usando 3X de péptido Flag (final 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Las expresiones de las proteínas recombinantes se observaron mediante el método de transferencia Western usando anticuerpo de ratón anti-Flag diluido 1000 veces (diluido con S-T-PBS) y anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa diluido 2000 veces (diluido con S-T-PBS) (GE Healthcare). La actividad migratoria de las células madre mesenquimatosas de médula ósea de ratón en estas proteínas recombinantes purificadas se evaluó de la misma manera como en el [Ejemplo 2] usando una cámara de Boyden. Además, a fin de observar la eficacia del fármaco *in vivo* de la familia de HMGB, se cortó un círculo, que tiene un diámetro de 8  $\mu\text{m}$ , en la piel dorsal de ratones C57BL/6 de 8 semanas, para preparar modelos de úlcera cutánea. Se mezclaron cada una de HMGB1, HMGB2, y HMGB3 purificadas (100 ng) con la misma cantidad de disolución de ácido hialurónico que tiene una concentración de 1 g/100 ml de PBS, y se administraron 100  $\mu\text{l}$  de la misma a la superficie de la úlcera. La superficie de la úlcera se cubrió con una gasa/material protector de heridas adhesivo transparente Tegaderm (3M Healthcare) para evitar que se seque, y la superficie de la herida se midió a lo largo del tiempo para determinar el efecto terapéutico.

Además, para examinar si el extracto de piel humana y la HMGB1 humana purificada tienen o no actividad que permita la migración de células madre mesenquimatosas de médula ósea humanas, para la evaluación se usó una cámara de Boyden de la misma manera como en el [Ejemplo 2]. Se sumergió una piel humana que tiene un área de 1  $\text{cm}^2$  en 1 ml de PBS, y entonces se incubó a 4°C durante 16 horas y posteriormente se centrifugó a 440 G a 4°C durante 10 minutos. Se recolectó el sobrenadante solo, para ser usado como extracto de piel humana. Además, las células madre mesenquimatosas de médula ósea humanas (Cambrex) se usaron como las células a colocar en la cámara superior de la cámara de Boyden (como resultado del análisis de antígenos de superficie mediante citometría de flujo, se confirmó que estas células son positivas para CD105, positivas para CD166, positivas para CD29, positivas para CD44, negativas para CD34, y negativas para CD45. También se ha encontrado, mediante ensayos de inducción de la diferenciación, que se diferencian en adipocitos, condrocitos, y células óseas). Además, en la cámara inferior se colocaron 100 ng/pocillo de HMGB1 humana (R&D) y extracto de piel humana diluido 10 veces con PBS. Como control, se usó PBS.

Resultado: Como resultado de la transferencia Western, se detectaron bandas de HMGB2 y HMGB3, así como la banda de HMGB1. Por lo tanto, se confirmó que el extracto de piel de ratón neonato contiene las proteínas de la familia, HMGB2 y HMGB3, además de HMGB1 (Fig. 15). Se prepararon vectores de expresión de HMGB1/HMGB2/HMGB3 que tienen una etiqueta Flag añadida al término N de cada proteína (Fig. 16). Estos vectores de expresión se introdujeron en células HEK293, y las proteínas expresadas se purificaron usando la etiqueta Flag, y se llevó a cabo la transferencia Western para observar estas proteínas (Fig. 17). La actividad migratoria de las células madre mesenquimatosas de médula ósea de ratón se midió usando estas proteínas purificadas, y la actividad se confirmó en todas las proteínas (Fig. 18). El área de la úlcera producida en la espalda del ratón se midió cada 7 días, y se confirmó un efecto significativo a la hora de reducir el área de la úlcera en el grupo de tratamiento con HMGB1, 2, y 3, en comparación con el grupo sin tratamiento (Fig. 19). Similar al caso del

ratón, se reveló que HMGB1 humana y el extracto de piel humana tienen actividad migratoria de células madre mesenquimatosas de médula ósea humanas (Fig. 20).

Discusión: HMGB2 y HMGB3 son conocidas como proteínas que tienen grandes homologías con HMGB1. También se espera que estas proteínas tengan propiedades similares a HMGB1. Se confirmó que HMGB2 y HMGB3 de la familia de HMGB1 también son producidas a partir del extracto de la sección de piel libre. Además, se produjeron proteínas recombinantes HMGB1/HMGB2/HMGB3, y también se confirmó su actividad migratoria de células madre mesenquimatosas de médula ósea *in vitro* y el efecto terapéutico *in vivo* sobre una úlcera cutánea. Se reveló que la familia de HMGB (HMGB1/HMGB2/HMGB3) y la familia de HMGB recombinante, en la sección de piel libre de ratón neonato, tienen actividad inductora de células madre mesenquimatosas de médula ósea y actividad inductora localmente de células madre derivadas de médula ósea que se diferencian en epitelio, y que el grupo de células derivadas de médula ósea así inducidas se diferencian en diversas células tales como queratinocitos epidérmicos, folículos pilosos y fibroblastos en el tejido dañado, para promover la recuperación del tejido dañado. Además, puesto que las células madre mesenquimatosas de médula ósea son células madre multipotentes, los presentes inventores creen que los efectos terapéuticos también son de esperar de la misma manera mediante la administración sistemática o administración local de la familia de HMGB para tratar estados dañados en otros tejidos, por ejemplo daños tisulares tales como lesión cerebral, infarto de miocardio, y fractura de huesos.

Además, se sabe que, entre el ser humano y el ratón, la homología de secuencias de aminoácidos para HMGB1 es 98% (213/215), 96% (202/210) para HMGB2, y 97% (195/200) para HMGB3. Por lo tanto, se considera que HMGB humana y HMGB de ratón tienen actividades similares, y los resultados de los presentes Ejemplos revelaron que el extracto de piel humana y HMGB1 humana tienen actividades inductoras de células madre mesenquimatosas de médula ósea de la misma manera que aquellas del extracto de piel de ratón y de HMGB1 de ratón.

#### [Ejemplo 4]

Objetivo: Establecimiento de un método para producir un extracto tisular que contenga factores inductores de células madre mesenquimatosas de médula ósea.

Método: Se sumergió el cerebro, corazón, intestino, riñón e hígado de un ratón C57BL6 de 6 semanas, y piel de un ratón neonato, en 1 ml de disolución fisiológica amortiguada de fosfato (PBS) a pH 7.4. Las disoluciones se incubaron a 4°C durante 24 horas, y entonces se centrifugaron a 440 G a 4°C durante 10 minutos para eliminar los tejidos. Se recolectaron los sobrenadantes para preparar extractos tisulares. Para confirmar si el extracto así obtenido tiene actividad inductora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, se examinó la actividad migratoria de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea de la misma manera como en el [Ejemplo 2], usando una cámara de Boyden. Además, la concentración de HMGB1 contenida en estas muestras se midió usando un kit de ELISA para HMGB1 (Shino-Test). Después, los extractos tisulares del cerebro, corazón y piel se dejaron unir a una columna de afinidad de heparina de la misma manera como en el [Ejemplo 2], y la actividad inductora de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en la fracción unida a la proteína se confirmó usando la cámara de Boyden.

Resultado: El extracto de cerebro de ratón contenía una cantidad de HMGB1 equivalente al extracto de piel de ratón neonato. Además, también se observó actividad inductora de células madre mesenquimatosas de médula ósea en el cerebro de ratón así como también en la piel. Aunque el extracto de intestino de ratón y el extracto de corazón de ratón contenían poca HMGB1, se observaron actividades inductoras de células madre mesenquimatosas de médula ósea. Además, las fracciones de cerebro de ratón y de corazón de ratón unidas a la columna de heparina, así como también la fracción de piel de ratón unida a la columna de heparina, mostraron actividades inductoras de células madre mesenquimatosas de médula ósea (Fig. 21). La Tabla 1 muestra los resultados de las medidas de la concentración de HMGB1 y de la actividad inductora de células madre mesenquimatosas de médula ósea en cada uno de los extractos tisulares de ratón.

45

[Tabla 1]

	Concentración de HMGB1 (ng/ml)	Actividad inductora de células madre mesenquimatosas de médula ósea
Piel	110	Presente
Cerebro	140	Presente
Corazón	4	Presente
Intestino	0	Presente
Riñón	115	ND
Hígado	61	ND

	Concentración de HMGB1 (ng/ml)	Actividad inductora de células madre mesenquimatosas de médula ósea
ND: Sin datos		

Discusión: Se desarrolló un método en el que HMGB1 se puede extraer convenientemente no solo de la piel sino también del cerebro sumergiendo simplemente estos órganos en un amortiguador fisiológico. Este método también es aplicable a otros órganos, tales como hígado y riñón. Además, aunque los extractos procedentes del intestino y del corazón contienen poca HMGB1, se observó una actividad inductora de células madre mesenquimatosas de médula ósea. Esto sugiere que estos extractos contienen otra sustancia o sustancias inductoras de células madre mesenquimatosas de médula ósea, además de HMGB1. Tales sustancias contenidas en estos extractos están presentes originalmente en cada tejido, y se considera que inducen fisiológicamente células madre mesenquimatosas de médula ósea hacia el tejido dañado cuando se daña el tejido. La presente invención desarrolló un nuevo método para extraer conveniente y funcionalmente múltiples sustancias inductoras de células madre mesenquimatosas de médula ósea, incluyendo HMGB1, a partir de diversos órganos. Además, también se desarrolló un método para purificar sustancias inductoras de células madre mesenquimatosas de médula ósea procedentes de un extracto tisular usando la unión a la columna de heparina. Estas sustancias que tienen actividades inductoras de células madre mesenquimatosas de médula ósea se pueden purificar a partir del cerebro y del corazón de la misma manera como en la piel usando una columna de heparina.

#### [Ejemplo 5]

Objetivo: Establecimiento de un método para extraer activadores de la migración de células madre mesenquimatosas a partir de células cultivadas.

Método: La estirpe celular cultivada derivada de riñón embrionario humano HEK293 y la estirpe celular de carcinoma de cuello uterino humano HeLa se cultivaron cada una en D-MEM que contiene 10% de suero fetal bovino (Nacalai). Estas células se lavaron cada una con PBS, y entonces se sumergieron  $10^7$  células en 5 ml de PBS (Nacalai) a 4°C durante 16 horas. La disolución se centrifugó a 440 G (aceleración de la gravedad) a 4°C durante 5 minutos, y entonces se recolectó el sobrenadante. Las células madre mesenquimatosas de médula ósea humanas se colocaron en la cámara superior de una cámara de Boyden, y se colocó un extracto celular diluido (con DMEM) 5 veces en la cámara inferior, para confirmar la actividad migratoria de células madre mesenquimatosas de médula ósea humanas.

Resultado: El extracto de HEK293 y el extracto de HeLa mostraron ambas actividades migratorias de células madre mesenquimatosas de médula ósea similares (Fig. 22).

Discusión: Los activadores de la migración de células madre mesenquimatosas de médula ósea se extrajeron con éxito mediante el método conveniente de sumergir en PBS células cultivadas.

#### [Ejemplo 6]

Objetivo: Se examinó si se puede inducir o no la regeneración de células neuronales mediante la producción de modelos de ratón con cerebros defectuosos, a los que se administró una fracción de extracto de piel purificada mediante columna de heparina en una manera de liberación sostenida en el sitio de lesión local, mediante lo cual se permitió que las células madre contenidas en un sistema mielóide de ratón migrasen hacia el sitio de lesión local.

Método:

(1) Preparación de fracción de extracto de piel purificada mediante columna de heparina

Una sección de piel cortada de ratón neonato se incubó en PBS (ratón/ml) a 4°C durante 16 horas, y se obtuvo un extracto de piel. El extracto de piel se diluyó 10 veces con 9 volúmenes de amortiguador de fosfato 20 mM a pH 7,5 a 4°C. Se vertió previamente amortiguador de fosfato 20 mM a pH 7,5 (30 ml) en una columna HiTrap Heparin HP (volumen de la columna: 5 ml, GE Healthcare), para equilibrar la columna. Se permitió entonces que la disolución diluida se uniese a la columna. Después, la columna se lavó con amortiguador de fosfato 20 mM a pH 7,5 y con NaCl 100 mM (30 ml). Para eluir las proteínas absorbidas, se vertieron amortiguador de fosfato 20 mM a pH 7,5 y NaCl 1000 mM en la columna, y las fracciones se eluyeron en los tubos. Cada una de las fracciones absorbidas se evaluó según la evaluación de la actividad migratoria de células derivadas de médula ósea de ratón usando el método de la cámara de Boyden mostrado en el Ejemplo 2, y se recolectó la fracción o fracciones que tienen actividad migratoria. La disolución o disoluciones que tienen la actividad se usaron como una fracción o fracciones del extracto de piel purificadas con heparina.

(2) Producción de ratones mielosupresores

Se irradiaron ratones con una única dosis de rayos X a 10 Gy para producir ratones mielosupresores.

(3) Transplante de médula ósea de ratón que expresa GFP a ratones mielosupresores

Se recolectaron células de médula ósea procedentes tanto de los fémures como de las tibias de ratones que expresan GFP. Estas células se administraron a los ratones mielosupresores a través de la vena caudal 24 horas después de la irradiación. La administración se llevó a cabo bajo anestesia inhalable usando isoflurano.

5 (4) Producción de un modelo de ratón con cerebro defectuoso (con tejido cerebral defectuoso)

Los ratones mielosupresores a los que se les transplantaron células de médula ósea de ratones que expresan GFP se sometieron a anestesia por inhalación usando isoflurano, y se inyectó intraperitonealmente pentobarbital (45 mg/kg) a los ratones. Los ratones se fijaron sobre un aparato estereotáctico cerebral y se sometieron a una incisión en la línea media en la cabeza con un escalpelo. Se llevó a cabo la trepanación a 2,5 mm lateral derecho y 12,5 mm anterior al bregma usando un taladro (Fig. 23A). A una profundidad de 3 mm de este sitio, se insertó y se fijó una aguja Surflew 20G. Después, se aplicó una presión negativa usando una jeringuilla para succionar una parte del tejido cerebral (Fig. 23B).

(5) Administración de una fracción de extracto de piel purificada mediante columna de heparina al sitio con tejido cerebral defectuoso

15 Se inyectaron en el sitio anterior cinco  $\mu$ l de una fracción de extracto de piel purificada mediante columna de heparina disuelta en fibrinógeno del adhesivo tisular de fibrina Bolheal (Kaketsuken), y subsiguientemente se inyectaron 5  $\mu$ l de trombina de Bolheal usando una jeringuilla Hamilton y una jeringuilla de 26G (Fig. 23C). El objetivo de esta operación fue ejercer el efecto del agente de liberación sostenida de una fracción del extracto de piel purificada mediante columna de heparina.

20 (6) Evaluación de los efectos de la regeneración de células neuronales en sitios con tejido cerebral defectuoso

Para la evaluación, se usaron ratones del grupo de control y del grupo de tratamiento. Se determinó un ajuste de tiempo transcurrido apropiado (a lo largo del tiempo), a los ratones se les perfusionó con paraformaldehído al 4% y se fijaron, y entonces se cortó el cerebro. Posteriormente, se llevó a cabo la fijación externa con paraformaldehído al 4%. Entonces se deshidrataron en un gradiente de sacarosa al 15% y al 30% para producir secciones congeladas.

25 Los núcleos se tiñeron con una disolución de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro), y la sección se cerró herméticamente usando un inhibidor fotoblanqueante. La acumulación de células positivas a GFP en el sitio de lesión (sitio de tejido cerebral defectuoso) se evaluó usando un microscopio de láser confocal.

Resultado: La acumulación de células positivas a GFP se muestra cualitativamente para 2 semanas y 6 semanas después de la administración. La acumulación de células positivas a GFP tiende a ser mayor en los sitios de lesión del grupo de tratamiento en lugar del grupo de control, tanto para 2 semanas (control; Fig. 23D, fracción de extracto de piel purificada mediante columna de heparina; Fig. 23E) como para 6 semanas (control; Fig. 23F, fracción de extracto de piel purificada mediante columna de heparina; Fig. 23G) después de la administración.

30 Discusión: La administración de la fracción del extracto de piel purificada mediante columna de heparina dio como resultado la acumulación de células derivadas de médula ósea en el sitio de tejido cerebral defectuoso, que mostró una forma de células nerviosas. También se sabe que las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea se diferencian en células nerviosas, y el resultado reveló que la fracción del extracto de piel purificada mediante columna de heparina es capaz de inducir regeneración de células neuronales del sitio lesionado en el cerebro. Además, esto es aplicable a la regeneración neuronal de sitios dañados en tejidos del cerebro en enfermedades isquémicas cerebrales y contusiones cerebrales.

40 Aplicabilidad industrial

Se proporcionan promotores de la regeneración tisular que comprenden HMGB1, HMGB2, o HMGB3. El desarrollo de HMGB1, HMGB2 o HMGB3 en forma de fármacos que movilizan células derivadas de médula ósea permite nuevos medicamentos regenerativos que promueven la regeneración funcional de tejidos dañados intratables. HMGB1, HMGB2, y HMGB3 son liberadas a partir de células/tejidos que se dirigen hacia la necrosis debido a un estado de poco oxígeno provocado por una menor circulación de sangre, y tienen un efecto movilizándolo localmente células derivadas de médula ósea, u otras diversas células derivadas de ellas, hacia tales células/tejidos. Las células movilizadas derivadas de médula ósea se diferencian en estirpes celulares requeridas en cada tejido, y promueven la recuperación de funciones perdidas debido a hipoperfusión/necrosis, principalmente promueven la denominada regeneración de tejido funcional. Por ejemplo, la administración de HMGB1, HMGB2, o HMGB a una úlcera cutánea intratable causada por trastornos de la circulación sanguínea de la piel conduce a la movilización de células derivadas de médula ósea hacia la superficie de la piel. Una vez que las células movilizadas se diferencian en células endoteliales vasculares, se mejoraría la circulación sanguínea local. Al mismo tiempo, la diferenciación en fibroblastos, células nerviosas, células de folículos pilosos, y otras células epidérmicas conduciría a la inducción y promoción de la regeneración funcional de la piel con apéndices dérmicos necesarios, en lugar de solamente curar con tejidos cicatrizales fibrosos. Se espera que HMGB1, HMGB2, y HMGB3 tengan un efecto similar como inductores de la regeneración de tejido funcional para infarto de miocardio, infarto cerebral, y estados de necrosis

ES 2 629 086 T3

hipoperfusiva de otros órganos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENOMIX CO., LTD.

<120> Pharmaceutical for promoting functional regeneration of damaged tissue

5 <130> G 10013 EP

<140> EP 07830867.3

<141> 2007-10-30

<150> JP 2006-293582

<151> 2006-10-30

10 <160> 18

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 215

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1          5          10          15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20          25          30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35          40          45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50          55          60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65          70          75          80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85          90          95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
 100         105         110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 115         120         125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 130         135         140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
  
```



ES 2 629 086 T3

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala  
 50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro  
 65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys  
 100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys  
 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr  
 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val  
 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu  
 180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu  
 195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
 210 215

<210> 4

<211> 648

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 4

atgggcaaag gagatcctaa aaagccgaga ggcaaaatgt cctcatatgc attctttgtg 60

caaacttgcc gggaggagca caagaagaag caccocggatg cttctgtcaa cttctcagag 120

ttctccaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagaaaa ggggaaattt 180

gaagatatgg caaaggctga caaggctcgt tatgaaagag aatgaaaac ctacatcccc 240

cccaaagggg agaccaaaaa gaagttcaag gaccccaatg cacccaagag gcctccttcg 300

ES 2 629 086 T3

gccttcttct tgttctgttc tgagtaccgc cccaaaatca aaggcgagca tcctggctta 360  
 tccattggtg atgttgcaaa gaaactagga gagatgtgga acaacactgc agcagatgac 420  
 aagcagccct atgagaagaa agctgcccaag ctgaaggaga agtatgagaa ggatattgct 480  
 gcctacagag ctaaaggaaa acctgatgca gcgaaaaagg ggggtgtcaa ggctgaaaag 540  
 agcaagaaaa agaaggaaga ggaagatgat gaggaggatg aagaggatga ggaagaggag 600  
 gaagaagagg aagacgaaga tgaagaagaa gatgatgatg atgaataa 648

<210> 5

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 5

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
 1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
 20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala  
 50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro  
 65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys  
 100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys  
 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr  
 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val  
 165 170 175

ES 2 629 086 T3

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu  
 180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu  
 195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
 210 215

<210> 6

<211> 648

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 6

atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt cctcatatgc attctttgtg 60  
 caaacctgcc gggaggagca caagaagaag caccocggatg cttctgtcaa cttctcagag 120  
 ttctccaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagaaaa ggggaaattt 180  
 gaagatatgg caaaggctga caaggctcgt tatgaaagag aatgaaaac ctacatcccc 240  
 cccaaagggg agaccaaaaa gaagttcaag gaccccaatg cccccaagag gcctccttcg 300  
 gccttcttct tgttctgttc tgagtaccgc ccaaaaaatca aaggcgagca tcctggctta 360  
 tcattgggtg atgttgcgaa gaaactagga gagatgtgga acaactgc tgcggatgac 420  
 aagcagccct atgaaaagaa ggccgccaag ctgaaggaga agtatgagaa ggatattgct 480  
 gcctacagag ctaaaggaaa acctgatgca gcgaaaaagg ggggtgtcaa ggctgagaag 540  
 agcaagaaaa agaaggaaga ggaagacgac gaggaggatg aagaggatga ggaagaggag 600  
 gaagaggagg aagacgaaga tgaagaagaa gatgatgatg atgaataa 648

<210> 7

<211> 209

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
 1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
 20 25 30

Asp Ser Ser Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala

ES 2 629 086 T3

50

55

60

Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro  
65 70 75 80

Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His Arg Pro Lys  
100 105 110

Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys Lys  
115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr  
130 135 140

Glu Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly  
165 170 175

Arg Pro Thr Gly Ser Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu  
180 185 190

Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu  
195 200 205

Glu

<210> 8

<211> 630

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

atgggtaaag gagaccccaa caagccgcg ggcaaaatgt cctcgtacgc cttcttcgtg 60  
cagacctgcc gggaagagca caagaagaaa caccgggact cttccgtcaa tttcgcgga 120  
ttctccaaga agtggttcgga gagatggaag accatgtctg caaaggagaa gtcgaagttt 180  
gaagatatgg caaaaagtga caaagctcgc tatgacagg agatgaaaaa ttacgttcct 240  
cccaaaggtg ataagaagg gaagaaaaag gacccaatg ctctaaaag gccaccatct 300  
gccttcttcc tgttttgctc tgaacatcgc ccaaagatca aaagtgaaca ccttggccta 360  
tccattgggg atactgcaaa gaaattgggt gaaatgtggt ctgagcagtc agccaaagat 420

ES 2 629 086 T3

aaacaacccat atgaacagaa agcagctaag ctaaaggaga aatatgaaaa ggatattgct 480  
 gcatatcgtg ccaagggcaa aagtgaagca ggaaagaagg gccctggcag gccaacaggc 540  
 tcaaagaaga agaacgaacc agaagatgag gaggaggagg aggaagaaga agatgaagat 600  
 gaggaggaag aggatgaaga tgaagaataa 630

<210> 9

<211> 210

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 9

Met Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
 20 25 30  
 Asp Ser Ser Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
 35 40 45  
 Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Leu Ala  
 50 55 60  
 Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
 85 90 95  
 Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Asn Arg Pro Lys  
 100 105 110  
 Ile Lys Ile Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys Lys  
 115 120 125  
 Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr  
 130 135 140  
 Glu Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly  
 165 170 175  
 Arg Pro Thr Gly Ser Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu  
 180 185 190

ES 2 629 086 T3

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp  
 195 200 205

Glu Glu  
 210

<210> 10

<211> 633

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 10

```

atgggcaagg gtagcccaa caagccgagg ggcaaaatgt cctcgtacgc cttcttcgtg    60
cagacctgcc gcgaggagca caagaagaag catcccgact cgtcggtgaa cttcgccgag    120
ttctccaaga aatgctccga gagatggaag accatgtctg caaaggaaaa gtccaagttt    180
gaagatttgg ccaagagcga caaagctcgt tatgacaggg agatgaagaa ctatgttcct    240
cccaaagggg ataagaaagg aaagaaaaaa gaccccaatg ctccgaagag accaccgtct    300
gccttcttcc tgttttgctc tgaaaatcgc ccaaagatca aaattgaaca cccaggcctg    360
tctattggag atactgcgaa gaaactgggt gagatgtggt ctgagcaatc tgccaaagat    420
aaacaaccgt atgagcagaa agcagctaaa ctaaaggaga agtatgaaaa ggatattgct    480
gcataaccgtg ccaagggcaa aagtgaagca ggaaagaagg gtctctggtag gccaacaggc    540
tcaaagaaga agaacgaacc agaagatgag gaggaggaag aagaggagga agaggaggaa    600
gatgacgagg aagaagagga ggatgaagaa taa                                633
    
```

<210> 11

<211> 210

10 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 11

```

Met Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1           5           10           15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20           25           30

Asp Ser Ser Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35           40           45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Leu Ala
 50           55           60

Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
 65           70           75           80
    
```

ES 2 629 086 T3

Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His Arg Pro Lys  
 100 105 110

Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys Lys  
 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr  
 130 135 140

Glu Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Ser Glu Val Gly Lys Lys Gly Pro Gly  
 165 170 175

Arg Pro Thr Gly Ser Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu  
 180 185 190

Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Asp  
 195 200 205

Glu Glu  
 210

<210> 12

<211> 633

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 12

atgggcaagg gggaccccaa caagccgagg ggcaagatgt cctcgtacgc cttcttcgtg 60  
 cagacctgcc gggaggagca caagaagaag catcccgact cgtcgggtcaa cttcgccgag 120  
 ttctcgaaga aatgttcgga gagatggaag accatgtctg ccaaggaaaa gtcgaagttt 180  
 gaggatttgg ccaagagcga caaagctcgt tatgacaggg agatgaagaa ctatgttcct 240  
 cccaaagggtg ataagaaagg aaagaaaaaa gatccaaatg ctcccaagag accaccgtct 300  
 gccttcttcc tgttttgctc tgaacatcgc ccaaagatca aaagtgaaca ccccggcctg 360  
 tctattggag atactgcaaa gaaactgggg gagatgtggt ctgagcaatc tgccaaagat 420  
 aaacaaccgt atgagcagaa agcagctaaa ctaaaggaga agtatgaaaa ggatattgct 480  
 gcataccgtg ccaagggcaa aagtgaagta ggaaagaagg gtcctggtag gccaacaggc 540  
 tcaaagaaga agaatgaacc agaagatgag gaagaggagg aggaggaaga agatgatgaa 600  
 gatgaagagg aggaagatga ggatgaagaa taa 633

<210> 13

10 <211> 200

ES 2 629 086 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

Met Ala Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Lys Gly Lys Met Ser Ala Tyr
1          5          10          15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys Asn Pro
20          25          30

Glu Val Pro Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35          40          45

Trp Lys Thr Met Ser Gly Lys Glu Lys Ser Lys Phe Asp Glu Met Ala
50          55          60

Lys Ala Asp Lys Val Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asp Tyr Gly Pro
65          70          75          80

Ala Lys Gly Gly Lys Lys Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro
85          90          95

Pro Ser Gly Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys
100         105         110

Ser Thr Asn Pro Gly Ile Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly
115         120         125

Glu Met Trp Asn Asn Leu Asn Asp Ser Glu Lys Gln Pro Tyr Ile Thr
130         135         140

Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Val Ala Asp Tyr
145         150         155         160

Lys Ser Lys Gly Lys Phe Asp Gly Ala Lys Gly Pro Ala Lys Val Ala
165         170         175

Arg Lys Lys Val Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
180         185         190

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu
195         200

```

5 <210> 14

<211> 603

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 629 086 T3

atggctaaag gtgaccccaa gaaaccaaag ggcaagatgt ccgcttatgc cttctttgtg 60  
 cagacatgca gagaagaaca taagaagaaa aaccagagg tccctgtcaa ttttgcgaa 120  
 tttccaaga agtgctctga gaggtggaag acgatgtccg ggaaagagaa atctaaattt 180  
 gatgaaatgg caaaggcaga taaagtgcgc tatgatcggg aatgaagga ttatggacca 240  
 gctaagggag gcaagaagaa gaaggatcct aatgctccca aaaggccacc gtctggattc 300  
 ttctgttct gttcagaatt cgcgcccaag atcaaatcca caaaccccg catctctatt 360  
 ggagacgtgg caaaaaagct gggtgagatg tggaataatt taaatgacag tgaaaagcag 420  
 ccttacatca ctaaggcggc aaagctgaag gagaagtatg agaaggatgt tgctgactat 480  
 aagtcgaaag gaaagtttga tgggtgcaaag ggtcctgcta aagttgcccg gaaaaaggtg 540  
 gaagaggaag atgaagaaga ggaggaggaa gaagaggagg aggaggagga ggaggatgaa 600  
 taa 603

<210> 15

<211> 200

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 15

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

ES 2 629 086 T3

Ser Thr Asn Pro Gly Ile Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly  
 115 120 125

Glu Met Trp Asn Asn Leu Ser Asp Asn Glu Lys Gln Pro Tyr Val Thr  
 130 135 140

Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Val Ala Asp Tyr  
 145 150 155 160

Lys Ser Lys Gly Lys Phe Asp Gly Ala Lys Gly Pro Ala Lys Val Ala  
 165 170 175

Arg Lys Lys Val Glu  
 180 185 190

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu  
 195 200

<210> 16

<211> 603

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 16

atggctaaag gtgaccccaa gaaaccaaag ggcaagatgt ctgcttatgc cttctttgtg 60  
 cagacatgca gggaagaaca taagaagaaa aaccagagg ttcccgtaa ttttgctgag 120  
 ttctccaaga agtgctcga gagtggaag accatgtcta gcaaagagaa atcaaagttt 180  
 gatgaaatgg caaaggcaga taaagtccga tatgatcggg agatgaaaga ttatggacca 240  
 gctaaaggag gcaagaagaa gaaggacca aatgccccca aaagacctcc gtctggattt 300  
 ttcttattct gctctgaatt ccgccccaa atcaaatcca caaacctgg catctccatt 360  
 ggagatgtgg caaaaaagct gggtgagatg tggaataact taagtgacaa tgaaaagcag 420  
 ccttatgtca ccaaggcagc aaagctgaag gagaagatg agaaggatgt tgctgactat 480  
 aagtctaaag ggaagtttga tggtgccaag ggtcctgcta aagttgcccg gaaaaagtg 540  
 gaagaagagg aagaggagga ggaagaggaa gaagaggagg aggaagagga ggaagatgaa 600  
 taa 603

<210> 17

<211> 63

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia nucleotídica sintetizada artificialmente

<400> 17

atgcagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctgt gggttccagg ttccactggt 60

15 gac 63

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 18

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys  
1 5

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un promotor de la regeneración tisular que comprende uno cualquiera de los siguientes componentes (a) a (i) para uso en medicina regenerativa para tejido epitelial o neurológico:

- (a) una proteína HMGB1;
- 5 (b) una célula que segrega una proteína HMGB1;
- (c) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB1;
- (d) una proteína HMGB2;
- (e) una célula que segrega una proteína HMGB2;
- (f) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB2;
- 10 (g) una proteína HMGB3;
- (h) una célula que segrega una proteína HMGB3; y
- (i) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB3;

2. Un kit que comprende uno cualquiera de los siguientes componentes (a) a (i), para uso en medicina regenerativa para tejido epitelial o neurológico:

- 15 (a) una proteína HMGB1;
- (b) una célula que segrega una proteína HMGB1;
- (c) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB1;
- (d) una proteína HMGB2;
- (e) una célula que segrega una proteína HMGB2;
- 20 (f) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB2;
- (g) una proteína HMGB3;
- (h) una célula que segrega una proteína HMGB3; y
- (i) un vector insertado con un ADN que codifica una proteína HMGB3.

FIG. 1

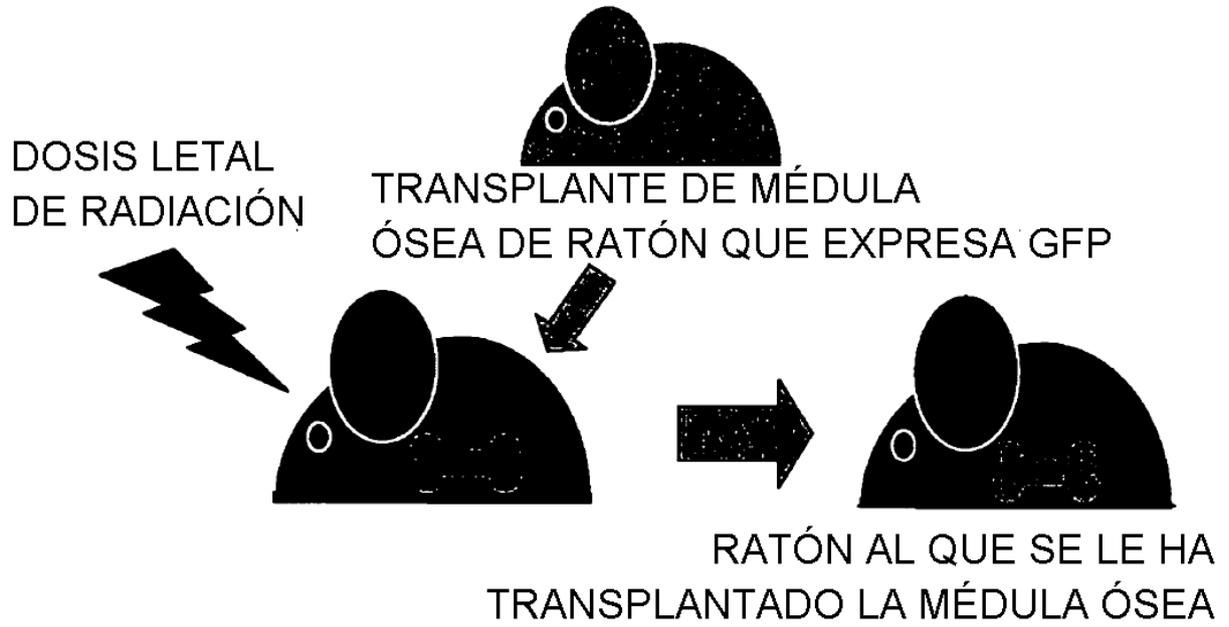


FIG. 2

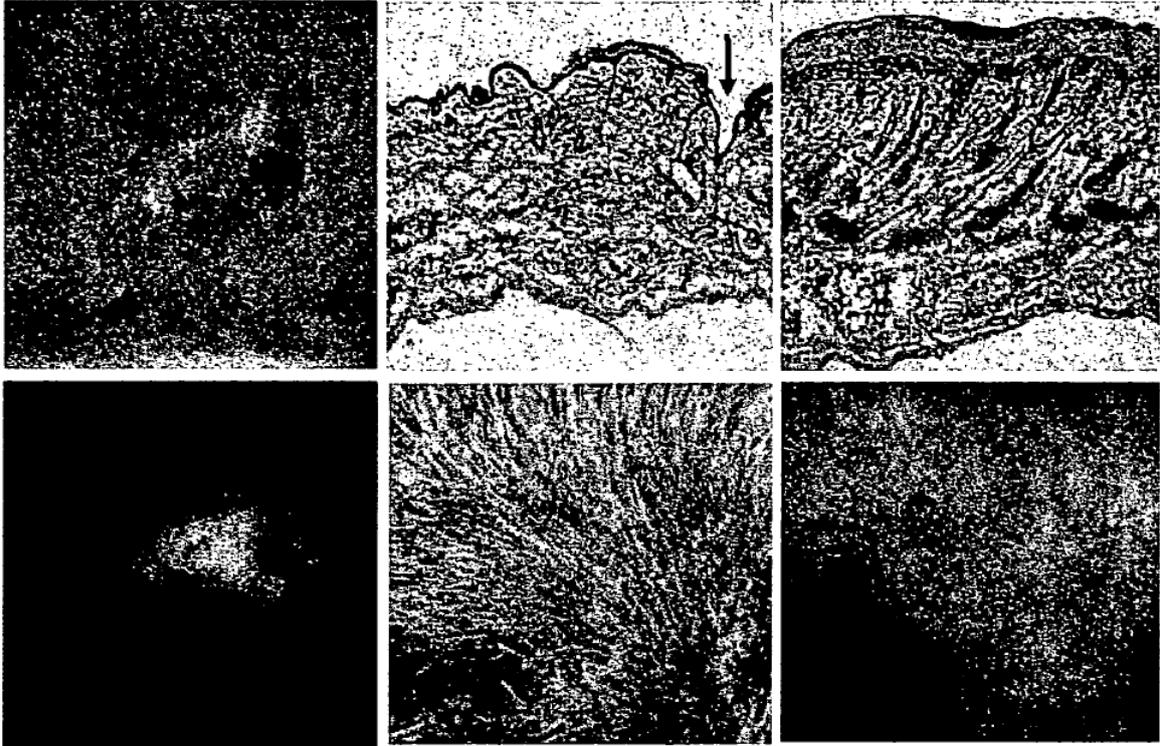
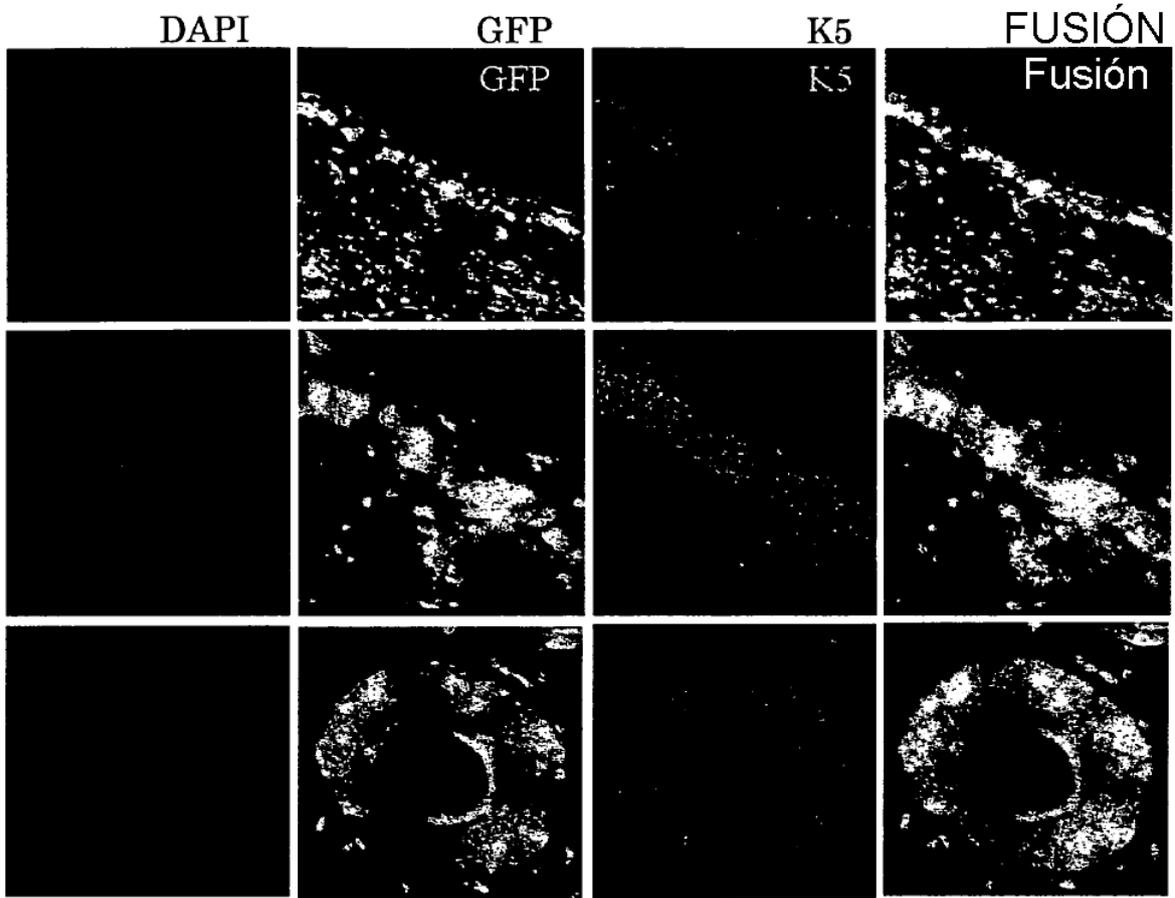


FIG. 3



**FIG. 4**

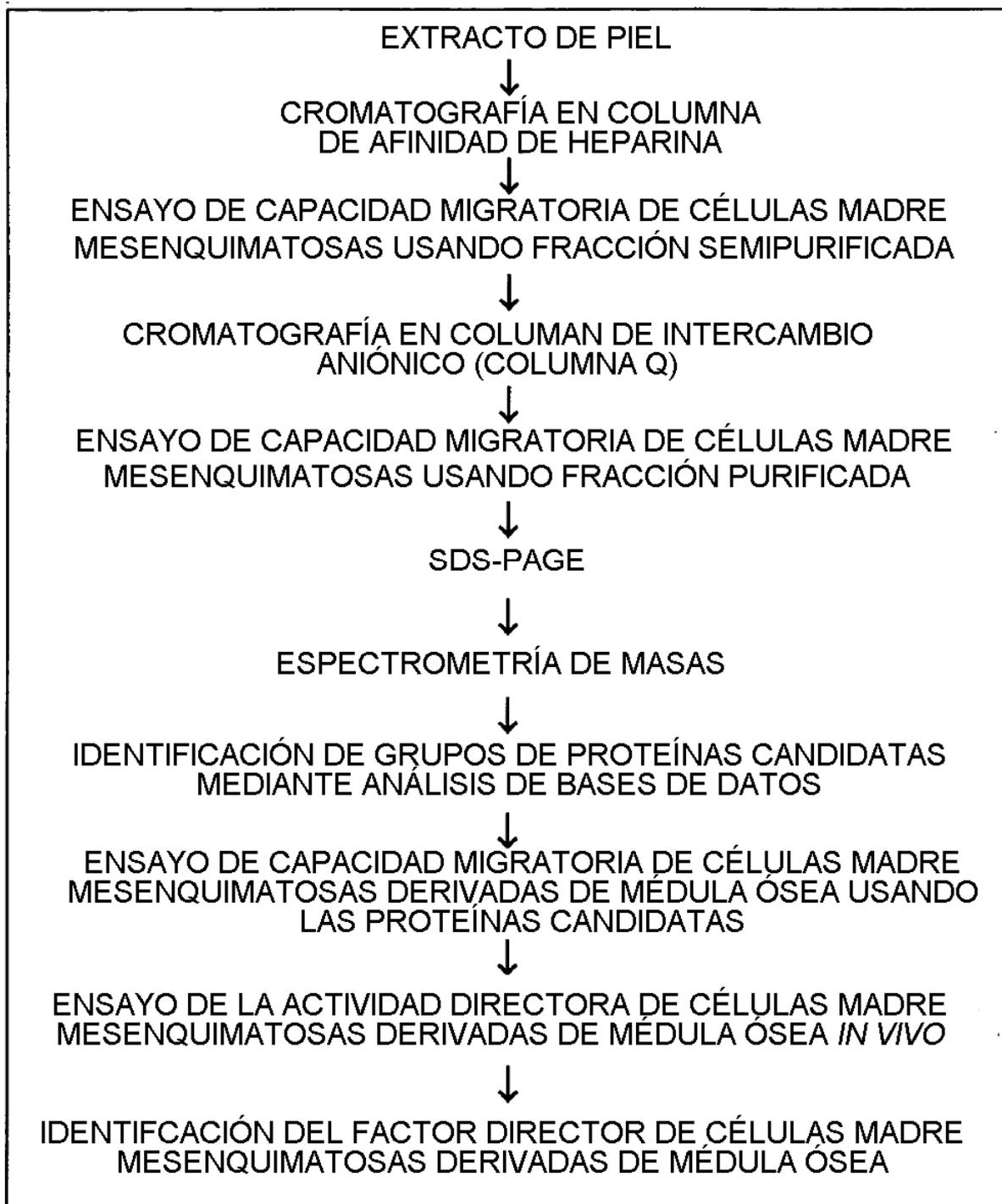


FIG. 5

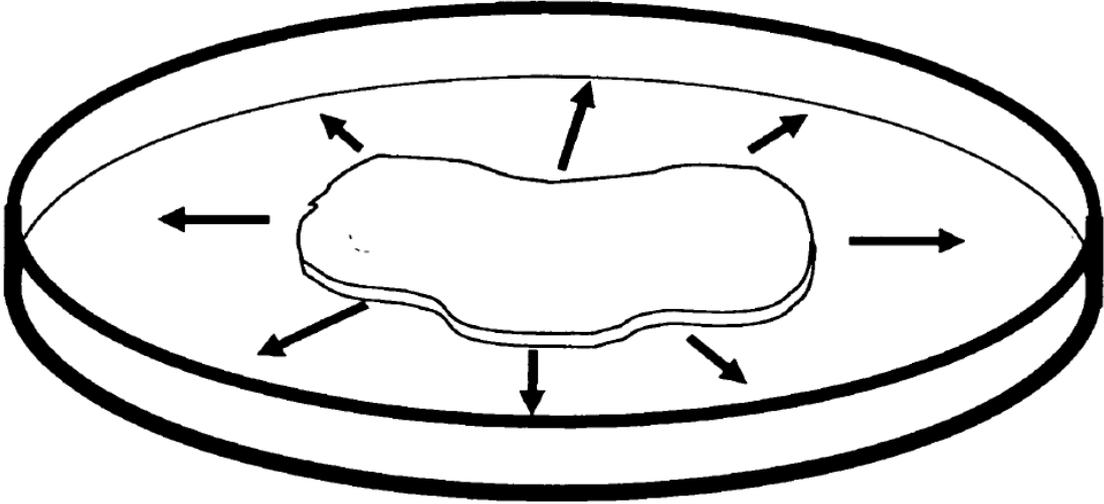
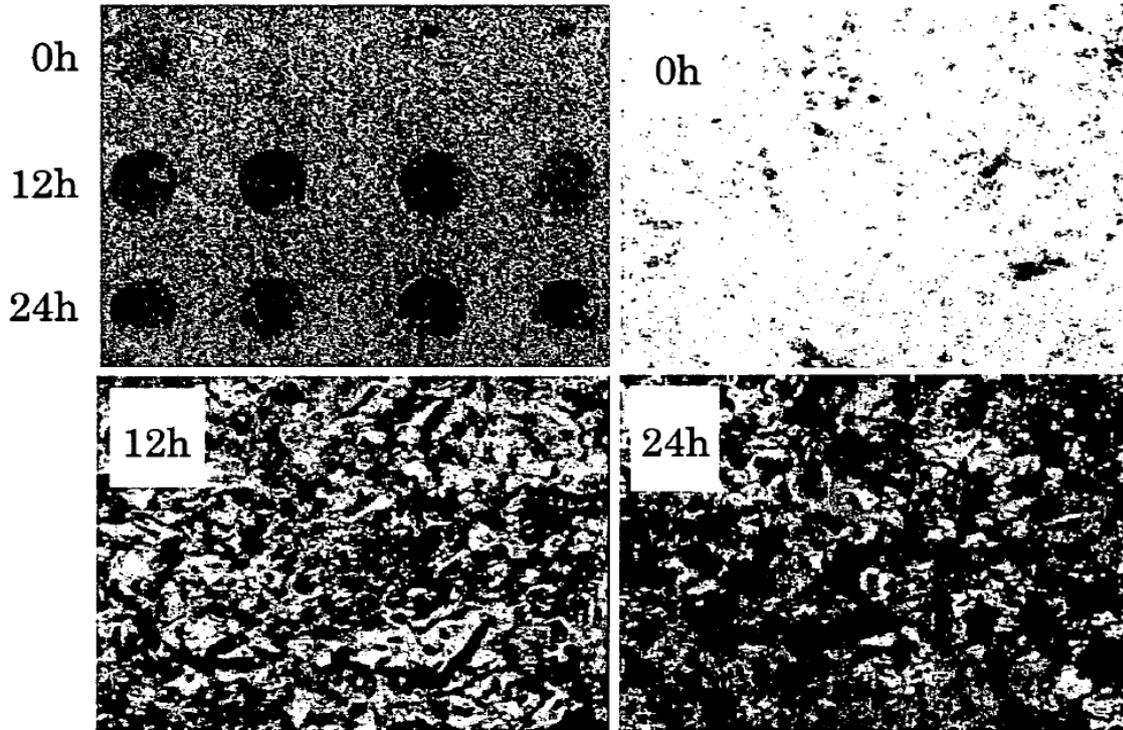


FIG. 6



# FIG. 7

**M.W.** : MARCADOR DE PESO MOLECULAR  
**C.E.** : EXTRACTO DE PIEL SIN PURIFICAR (BRUTO)  
**H.A.** : CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE HEPARINA  
**A.E.** : CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIONICO

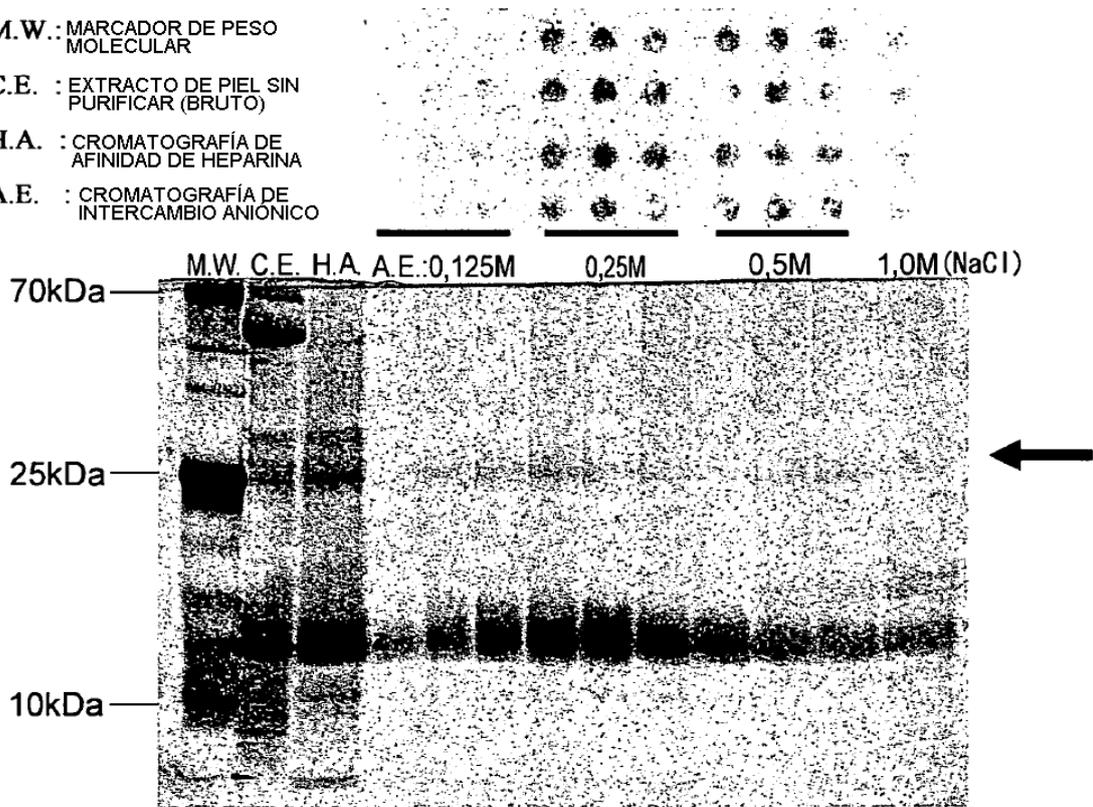
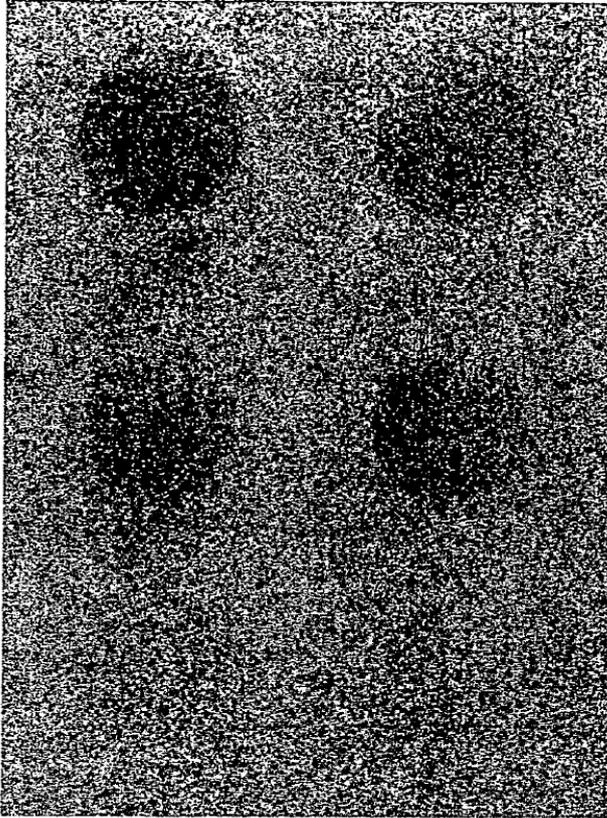


FIG. 8



EXTRACTO DE PIEL

FRACCIÓN PURIFICADA  
DE HMGB1

INHIBICIÓN MEDIANTE  
ANTICUERPO ANTI-HMGB1

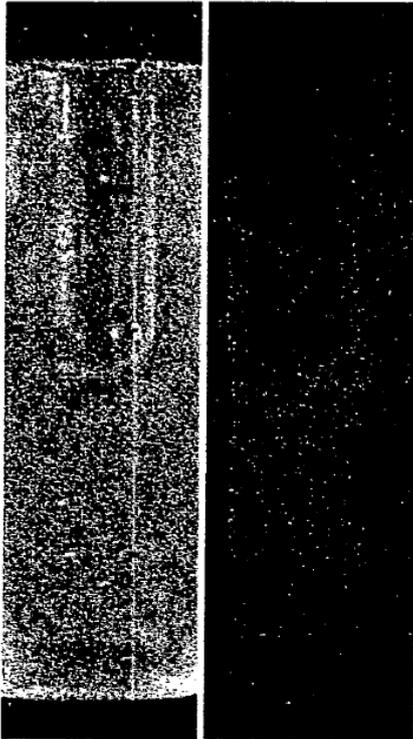
FIG. 9



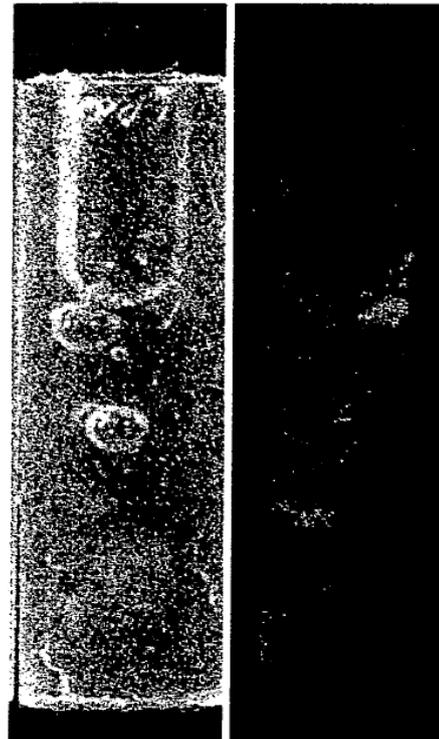
# FIG. 10

CONTROL COMPARATIVO  
(FRACCIÓN PURIFICADA NO.1)

HMGB1  
(FRACCIÓN PURIFICADA NO.4)



INTENSIDAD DE LA  
FLUORESCENCIA DE GFP:  
10440



INTENSIDAD DE LA  
FLUORESCENCIA DE GFP:  
30430

**FIG. 11**

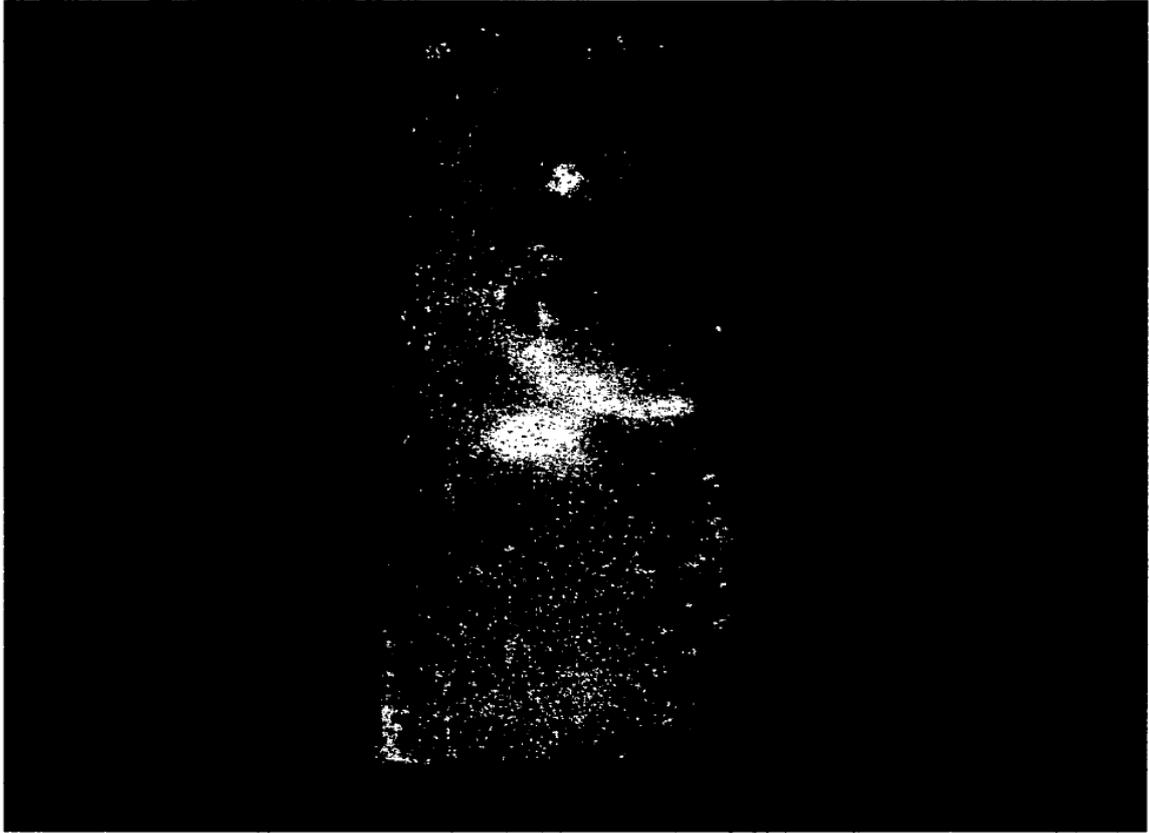
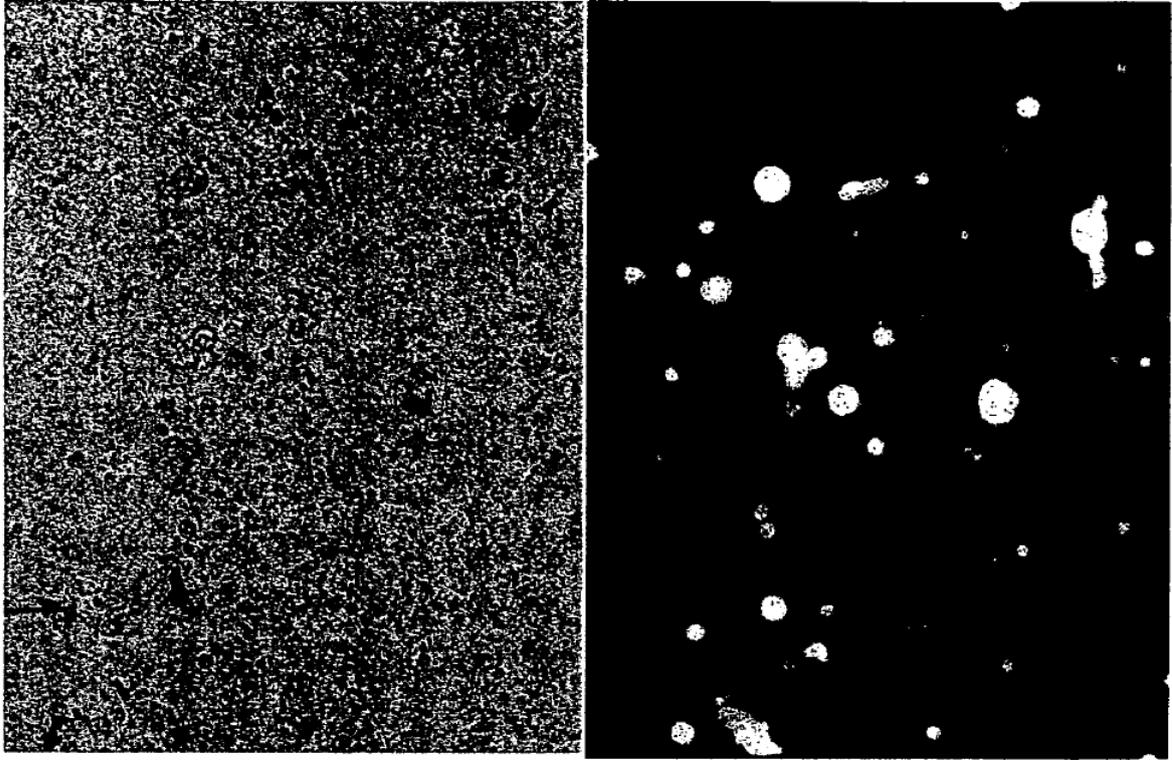


FIG. 12



**FIG. 13**

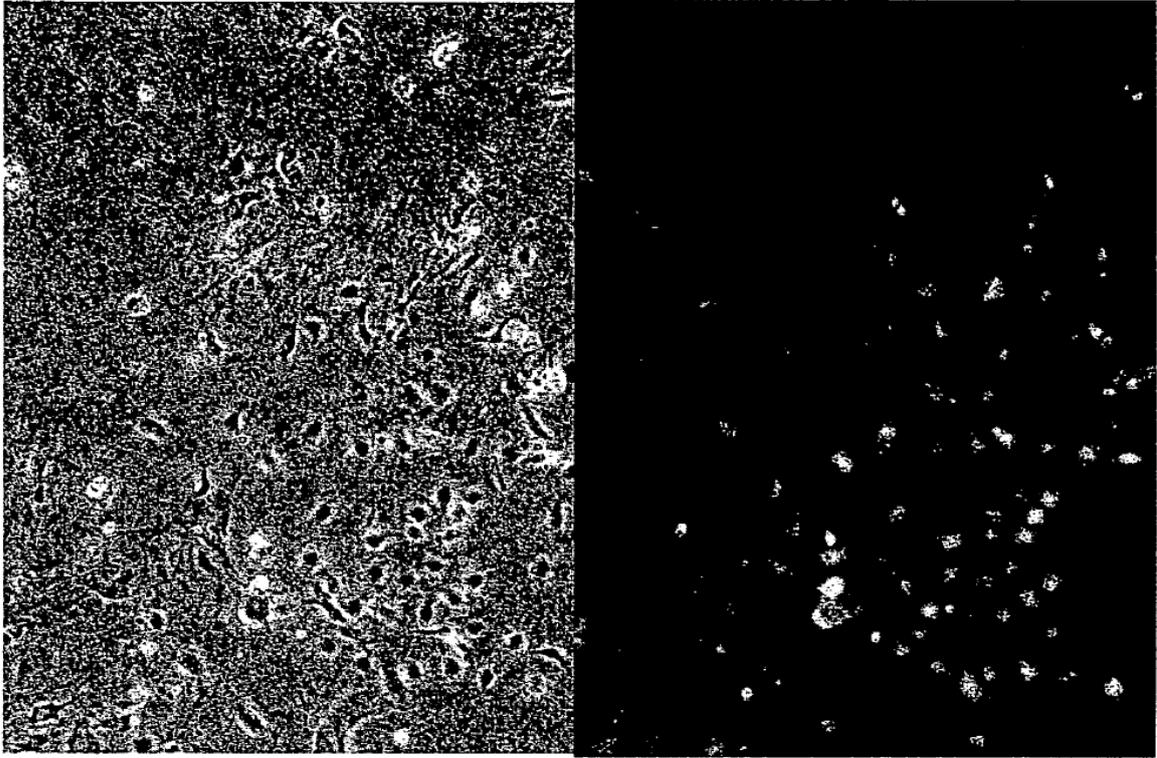


FIG. 14

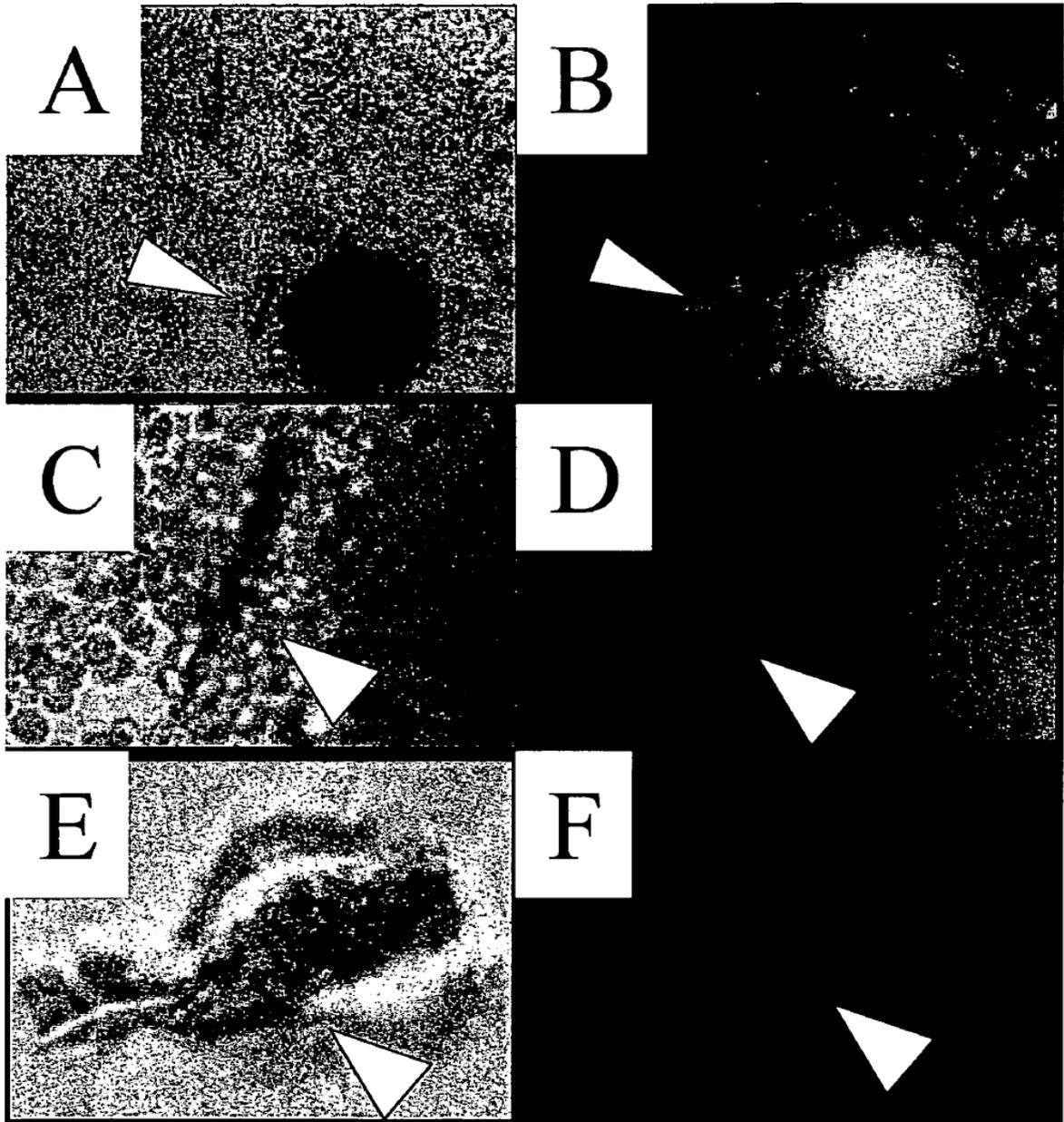


FIG. 15

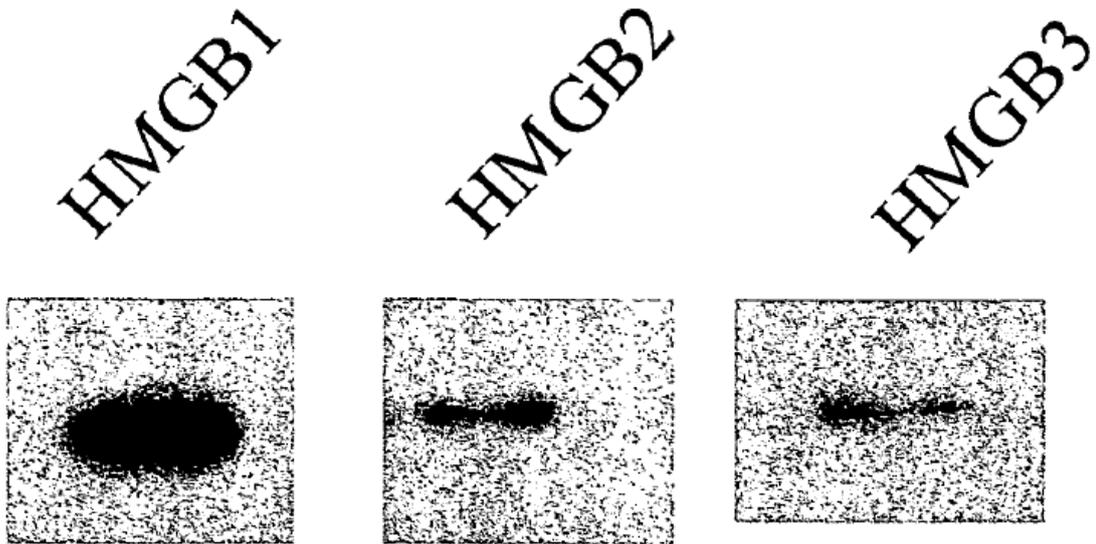


FIG. 16

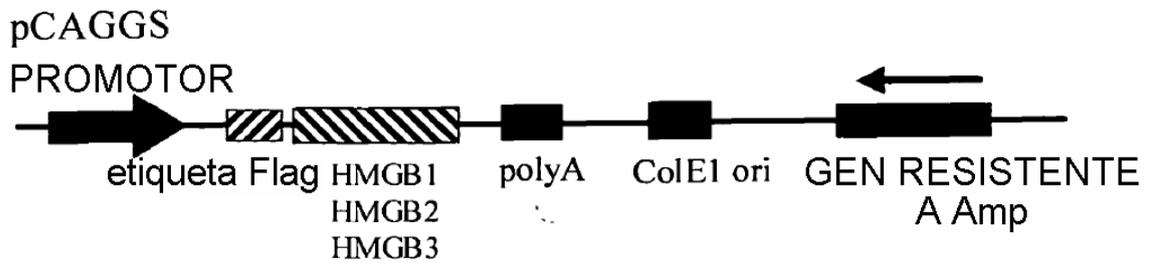
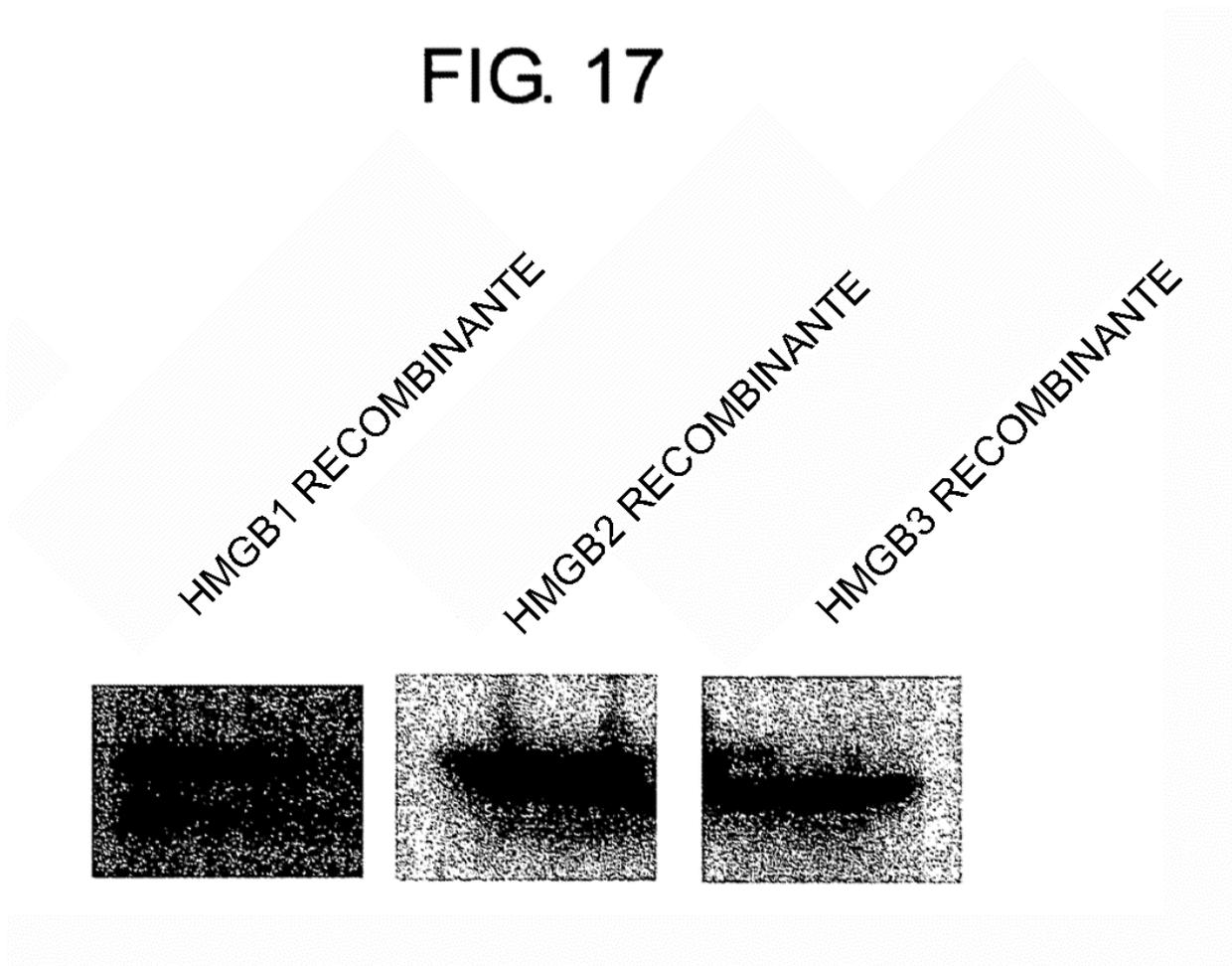


FIG. 17



# FIG. 18

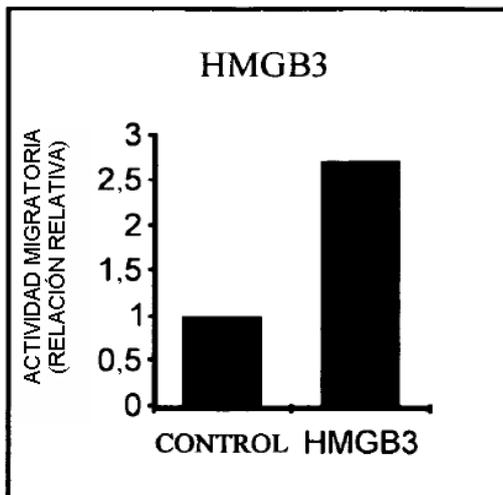
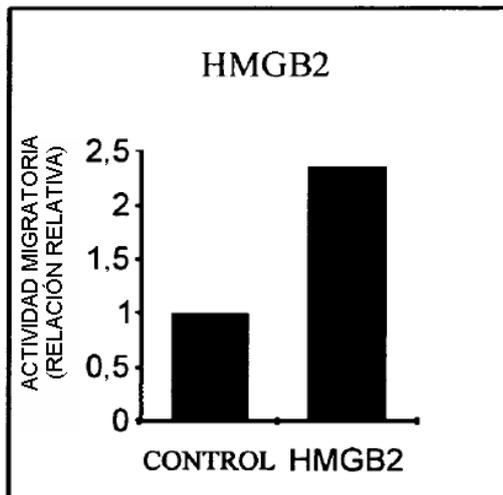
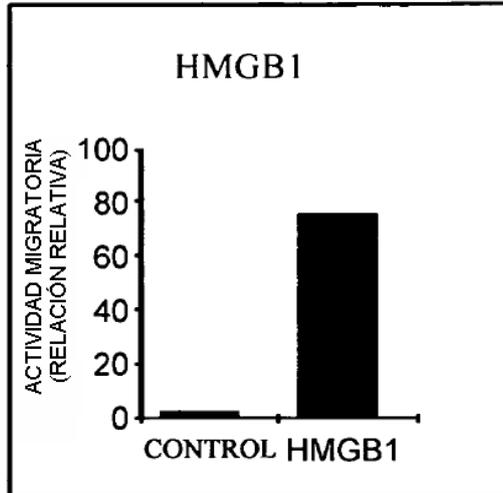
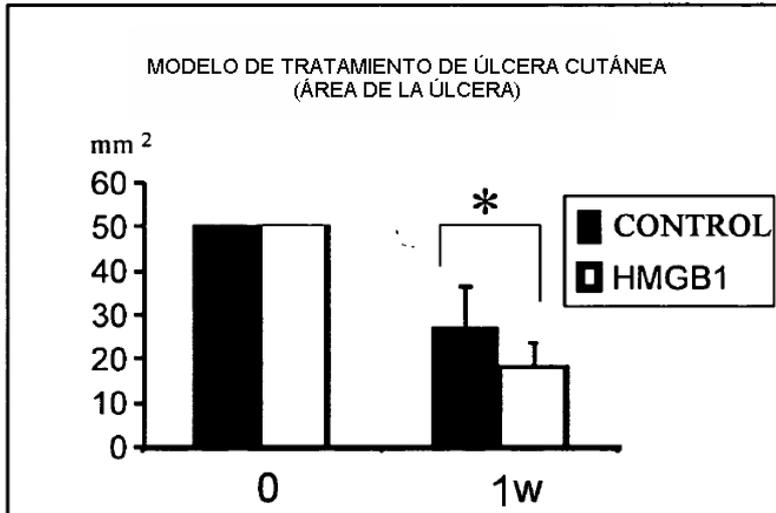
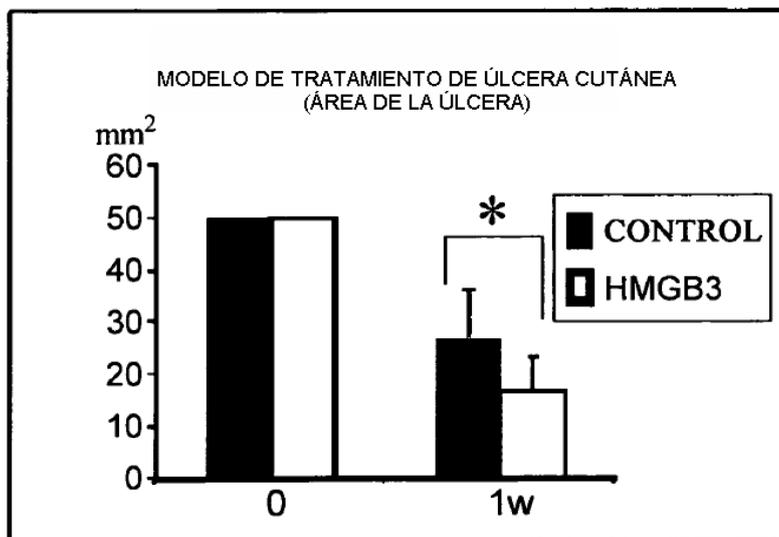
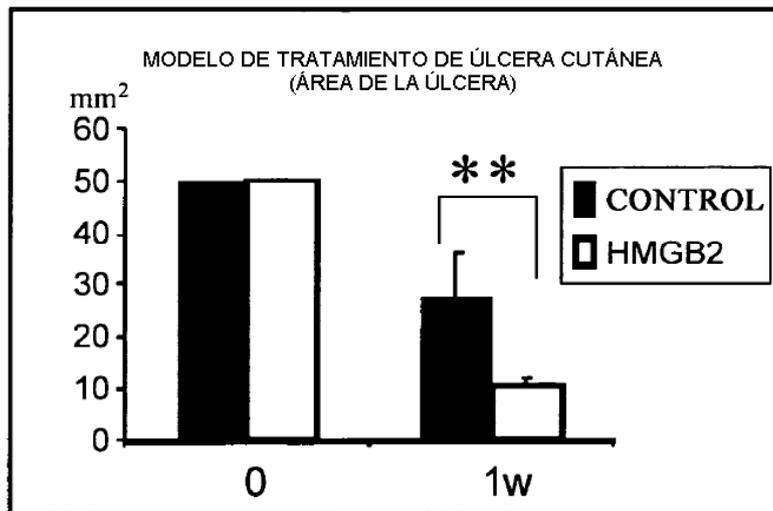


FIG. 19



\*) P<0,05  
\*\*) P<0,001

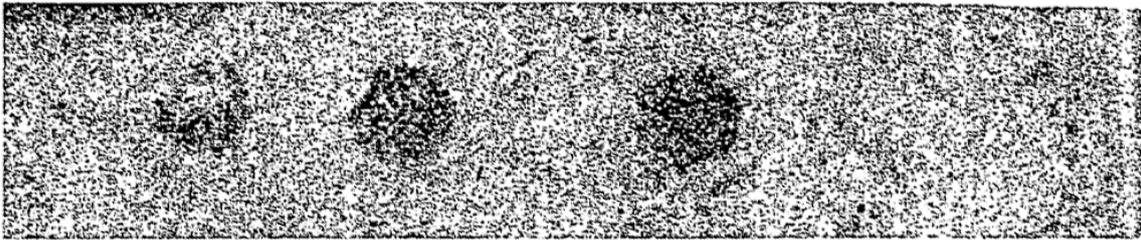


# FIG. 20

HMGB1 HUMANA

EXTRATO DE  
PIEL HUMANA

CONTROL  
NEGATIVO

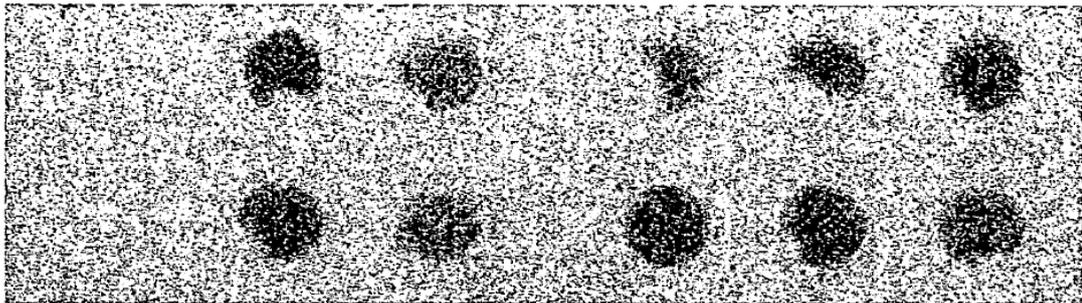


**FIG. 21**

**CONTROL**

**CORAZÓN  
DE RATÓN**

**PIEL DE  
RATÓN**



**CONTROL**

**CEREBRO  
DE RATÓN**

**PIEL DE  
RATÓN**

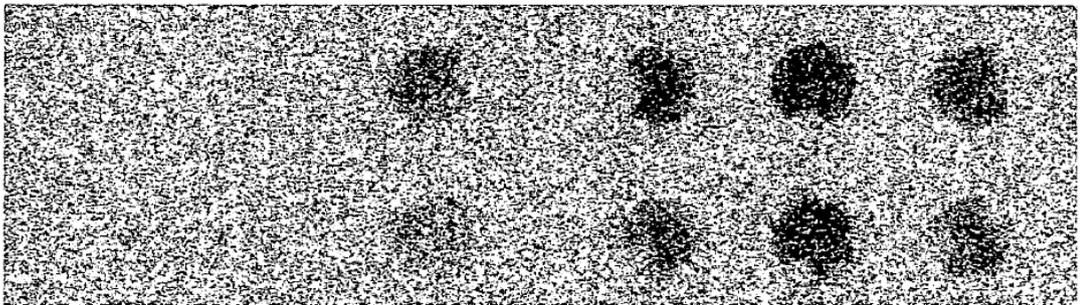


FIG. 22

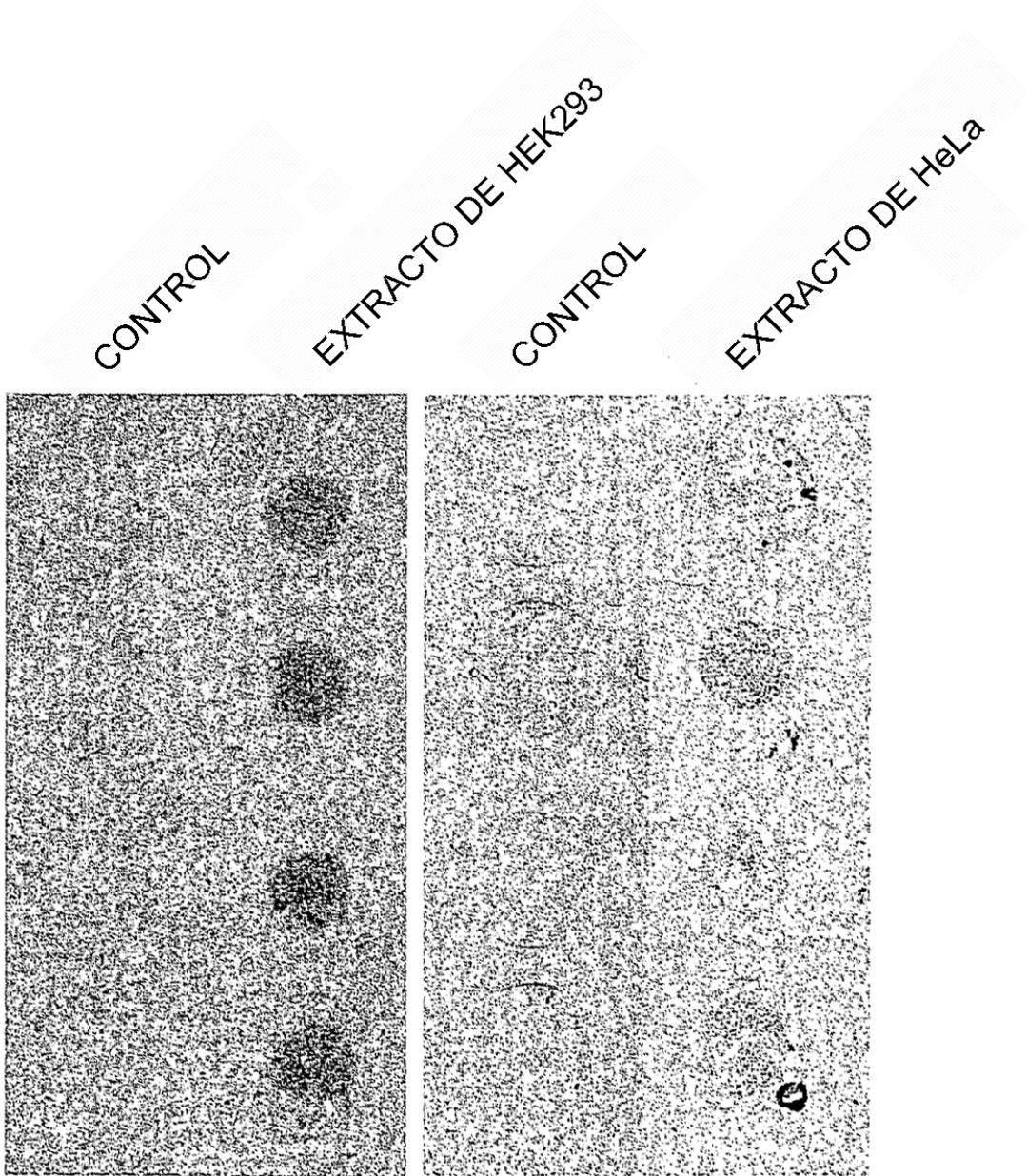


FIG. 23

