

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 542**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2009 PCT/JP2009/058525**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09133943**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2009 E 09738880 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2284255**

54 Título: **Procedimiento de recolección de células funcionales in vivo con alta eficiencia**

30 Prioridad:

30.04.2008 JP 2008119355

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

14.02.2018

73 Titular/es:

**GENOMIX CO., LTD. (50.0%)
3FL, Saito Biotechnology Incubator 7-15, Saito-Asagi 7-chome
Ibaraki-shiOsaka 567-0085, JP y
OSAKA UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 654 542 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

Procedimiento de recolección de células funcionales *in vivo* con alta eficiencia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un recipiente implantable que comprende un material de uno cualquiera de (a) una proteína S100A8; (b) una proteína S100A9; y (c) ácido hialurónico para su uso en un procedimiento de recolección de una célula de médula ósea o una población de células que comprende una célula de médula ósea como se define en la reivindicación 1.

Estado de la técnica

Los procedimientos convencionales de recolección de células altamente funcionales del cuerpo vivo incluyen, por ejemplo, procedimientos de recolección de células madre hematopoyéticas de médula ósea, en los que la recolección de fluido de médula ósea de la médula ósea de un hueso largo o pélvico mediante inserción directa de una aguja en la médula ósea, y para administración a humanos, concentra la población de células madre mediante centrifugación, y recoge y confirma las células marcadas los en forma fluorescente con un clasificador de células que usa marcadores de superficie de células madre como indicador; procedimientos de recolección de células madre de sangre periférica, que movilizan células madre hematopoyéticas a sangre periférica mediante la administración de G-CSF, recolectan sangre periférica y aíslan células madre hematopoyéticas de la sangre; y procedimientos de recolección de células madre mesenquimales, que aíslan células madre mesenquimales mediante recolección de células proliferantes adherentes de un cultivo directo de fluido de médula ósea o aíslan y cultivan células madre mesenquimales de tejidos periféricos recolectados quirúrgicamente tales como tejidos adiposos. Sin embargo, la recolección de fluido de médula ósea de la médula ósea es altamente invasivo y doloroso, y conlleva riesgo de mielitis debido a infección intramedular. Por lo tanto, el tratamiento requiere manejo médico muy estricto por parte de expertos, y no puede realizarse con frecuencia. La recolección quirúrgica de tejidos periféricos también tiene el mismo riesgo. La movilización de células madre hematopoyéticas usando G-CSF plantea una gran carga económica, y tampoco no se puede realizar con frecuencia.

Es evidente que el establecimiento de procedimientos eficientes y seguros de recolección de células biológicamente funcionales será una noticia alentadora para muchos pacientes que padecen enfermedades intratables y que necesitan tales células.

35 **Documentos del estado de la técnica****Documentos no relacionados con patentes**

[Documento 1 no relacionado con patentes] Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Mol Med.* 2005; 9: 37-50

[Documento 2 no relacionado con patentes] Role of mesenchymal stem cells in regenerate medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8: 255-268

[Documento 3 no relacionado con patentes] Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 37(10): 967-976

Divulgación de la invención50 **Problemas a resolver por la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos medios para usar en técnicas altamente eficaces y mínimamente invasivas para recolectar células funcionales tales como células madre, que existen en un número extremadamente pequeño *in vivo*.

Medios para resolver los problemas

La presente invención se basa en técnicas totalmente nuevas y altamente eficientes para cosechar células biológicamente funcionales implantando solamente un tubo en un cuerpo vivo de una manera mínimamente invasiva.

Específicamente, tubos cilíndricos (que tienen una longitud de 10 mm y un área de sección transversal de aproximadamente 2 mm², y están abiertos por un lado y cerrados por el otro lado) elaborados de silicona biológicamente hipoalergénica se llenaron con HMGB1., ácido hialurónico, regulador de fosfato, o similar, y luego se implanta debajo de la piel dorsal de los ratones trasplantados con médula ósea con GFP. Los tubos se recuperaron dos semanas después de la implantación y se recogieron las células movilizadas y acumuladas en los tubos.

Algunas de las células se cultivaron y otras se analizaron para determinar los marcadores de superficie celular mediante FACS. El resultado muestra que, en comparación con los tubos llenos con regulador de fosfato, se recogieron significativamente más células positivas para PDGFR α de tubos llenos con un agente distinto de regulador de fosfato, y estas poblaciones celulares contenían células madre mesenquimales con la capacidad de diferenciarse en hueso y cartílago.

Con base en los hallazgos anteriores, la presente invención proporciona:

[1] Un recipiente implantable que comprende un material de cualquiera de (a) una proteína S100A8; (b) una proteína S100A9; y (c) ácido hialurónico para uso en un procedimiento de (i) o (ii) a continuación:

(i) un procedimiento de recolección de una población de células que comprende una célula de médula ósea, dicho procedimiento comprende las etapas de:

(I) implantar el recipiente que contiene cualquiera de (a) a (c) debajo de la piel; y

(II) recolectar una población de células que comprende una célula de médula ósea del recipiente; o

(ii) un procedimiento de recolección de una célula de médula ósea, dicho procedimiento comprende las etapas de:

(I) implantar el recipiente que contiene cualquiera de (a) a (c) debajo de la piel;

(II) cosechar una población de células que comprende una célula de médula ósea del recipiente; y

(III) aislar una célula de médula ósea de la población de células cosechadas

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra en un diagrama esquemático un procedimiento de alta eficacia de recolección de células biológicamente funcionales. Un tubo hipoalergénico (tubo de silicona o similar) lleno de un factor que moviliza específicamente las células biológicamente funcionales se coloca en el cuerpo. Como resultado, las células funcionales se movilizan selectivamente en el tubo desde la circulación sanguínea periférica o el tejido.

La Fig. 2 muestra en una fotografía que las células acumuladas en un tubo (células atrapadas en un tubo, TEC) son positivas para GFP.

La Fig. 3 muestra en un conjunto de fotografías las TEC 24 horas después del inicio del cultivo. La fotografía de la izquierda muestra una imagen de campo claro de células fibroblásticas proliferativas y células similares a células epiteliales que se adhieren a una placa plástica de cultivo. La fotografía de la derecha muestra una imagen de fluorescencia GFP del campo oscuro.

La Fig. 4 muestra en un conjunto de fotografías la evaluación de las TEC recogidas de un tubo por su capacidad para diferenciarse en osteoblastos. Las células recogidas del tubo se cultivaron en un medio de cultivo inductor de diferenciación de osteoblastos y se confirmó que se diferenciaban en osteoblastos positivos para la tinción con rojo de alizarina en aproximadamente dos semanas.

La Fig. 5 muestra en un conjunto de fotografías la evaluación de TEC recogidas de un tubo por su capacidad para diferenciarse en adipocitos. Las células recogidas del tubo se cultivaron en un medio de cultivo inductor de diferenciación de adipocitos y se confirmó que se diferenciaban en adipocitos positivos para tinción con rojo aceite en aproximadamente dos semanas.

La Fig. 6 muestra en un conjunto de fotografías la evaluación de las TEC recogidas de un tubo por su capacidad para diferenciarse en células epidérmicas. Las células recogidas del tubo se cultivaron en un medio de cultivo inductor de diferenciación de células epidérmicas y se confirmó que se diferenciaban en células epidérmicas que expresan queratina 5 específica de queratinocitos en aproximadamente dos semanas.

La Fig. 7 muestra en un conjunto de diagramas la evaluación de la expresión de PDGFR α y CD44 en TEC. Se confirmó la recolección de células doblemente positivas para PDGFR α y CD44 en el tubo.

La Fig. 8 muestra en un conjunto de fotografías la detección de transferencia de Western de la familia HMGB en extracto de piel de ratón neonatal.

La Fig. 9 muestra en un diagrama un vector de expresión de HMGB1.

La Fig. 10 muestra en un conjunto de fotografías de resultados de transferencia de Western para las proteínas de fusión de Etiqueta Flag-familia HMGB recombinantes purificadas expresadas en células HEK293.

- 5 La Fig. 11 muestra en un conjunto de gráficos, la actividad quimiotáctica de HMGB1/HMGB2/HMGB3 recombinante para células madre mesenquimales de médula ósea usando una cámara de Boyden. Todas las proteínas recombinantes mostraron actividades quimiotácticas superiores en comparación con los grupos de control.
- 10 La Fig. 12 muestra en un conjunto de gráficos el resultado del tratamiento en un modelo de tratamiento de úlceras cutáneas de ratón usando las proteínas de la familia HMGB. HMGB1, HMGB2 y HMGB3 mostraron todos efectos significativos en la reducción del área de la úlcera en comparación con los grupos de control.
- 15 La Fig. 13 muestra en una fotografía la actividad de HMGB1 humana y un extracto de piel humana para inducir la migración de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana como se confirma utilizando una cámara de Boyden.
- 20 La Fig. 14 muestra en un conjunto de fotografías la actividad de activadores purificados en una columna de heparina de extractos de corazón, cerebro y piel de ratón para inducir células madre mesenquimales de médula ósea como se confirmó usando una cámara de Boyden.
- 25 La Fig. 15 muestra en un conjunto de fotografías la actividad de un extracto de la línea celular cultivada HEK293 o HeLa para inducir la migración de células madre mesenquimales de médula ósea humana como se confirma utilizando una cámara de Boyden. Ambas líneas celulares cultivadas mostraron actividad quimiotáctica para células madre mesenquimales de médula ósea humana.
- 30 La Fig. 16A muestra en una fotografía a un ratón fijado a un aparato de cirugía estereotáctica cerebral y sometido a una incisión en la línea media en la cabeza con un bisturí, seguido de trepanación usando un taladro. La Fig. 16B muestra en una fotografía un cerebro al que se aplica una presión negativa usando una jeringa para succionar parte del tejido cerebral. La Fig. 16C es una fotografía de un ratón después de la inyección de 5 µl de fracción purificada en columna de heparina de un extracto de piel disuelto en formulación adhesiva de fibrina (fibrinógeno) y una inyección posterior de 5 µl de formulación de cola de fibrina (trombina). Las Figs. 16D y 16E son fotografías del modelo de lesión cerebral tomadas 2 semanas después del tratamiento. Se observó una mayor acumulación de células positivas para GFP en el grupo de tratamiento usando la fracción purificada en columna de heparina del extracto de piel en E en comparación con el control en D. Las Figs. 16F y 16G son fotografías del modelo de lesión cerebral tomadas 6 semanas después del tratamiento. Se observó una mayor acumulación de células positivas para GFP en el grupo de tratamiento usando la fracción purificada en columna de heparina del extracto de piel en G en comparación con el control en F.
- 35 La Fig. 17 muestra en una fotografía los resultados del ensayo de medición de la actividad migratoria de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea en extractos de piel utilizando una cámara de Boyden. Estas imágenes muestran células madre mesenquimales de médula ósea teñidas de azul, que han migrado desde el compartimiento superior de la cámara de Boyden a través de un filtro de membrana de policarbonato de microporos de 8 µm en el compartimiento inferior que contiene extractos de piel, y adheridas al lado del compartimiento inferior de la membrana. Los extractos de piel recolectados de ratones de dos días o seis semanas de edad se colocaron en las cámaras inferiores.
- 40 La Fig. 18 muestra en un conjunto de fotografías la detección de transferencia de Western de las proteínas S100A8 y S100A9 en extractos de piel.
- 45 La Fig. 19 muestra en una fotografía elución de una proteína de unión a heparina en extractos de piel eluidos de una columna de afinidad de heparina por un gradiente de concentración de NaCl. Las proteínas en cada fracción se separaron mediante SDS-PAGE y se detectaron mediante tinción con plata.
- 50 La Fig. 20 muestra en una fotografía los resultados del ensayo de medición de la actividad migratoria de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea en extractos de piel utilizando una cámara de Boyden. La imagen muestra células madre mesenquimales de médula ósea teñidas de azul, que migraron del compartimiento superior de la cámara de Boyden a través de los microporos de un filtro a cada fracción de unión a heparina en extractos de piel (al compartimiento inferior), y se adhirieron al lado del compartimiento inferior de la membrana.
- 55 La Fig. 21 muestra en un conjunto de fotografías la detección de transferencia de Western de las proteínas S100A8 y S100A9 en cada fracción de extractos de piel que se une a heparina.
- 60 La Fig. 22 muestra en un diagrama el vector de expresión para S100A8 o S100A9.
- 65 La Fig. 23 muestra en una fotografía los resultados del ensayo de medición de la actividad migratoria de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea en extractos de piel usando una cámara de Boyden. Estas imágenes muestran células madre mesenquimales de médula ósea teñidas de azul, que migraron del compartimiento superior de la cámara de Boyden a través de los microporos de un filtro al compartimiento inferior que contiene GST-S100A8, GST-S100A9 recombinantes o extractos de piel, y se adhirieron al lado del

compartimento inferior de la membrana.

La Fig. 24A muestra en un conjunto de diagramas los resultados de FACS para CD44, PDGFR α y PDGFR β en la fracción de células negativas para CD45 en sangre periférica 12 horas después de la administración de GST-S100A8 o GST-S100A a través de la vena caudal del ratón.

La Fig. 24B muestra en gráficos el análisis cuantitativo de las poblaciones de células negativas para CD45, positivas para CD44, positivas para PDGFR α , o células negativas para CD45, positivas para CD44 positivas para PDGFR β en sangre periférica 12 horas después de la administración de GST-S100A8 o GST-S100A con base en los resultados de FACS.

La Fig. 25 muestra en un gráfico el efecto terapéutico de S100A8 sobre la úlcera cutánea en ratones normales.

La Fig. 26 muestra en un gráfico el efecto terapéutico de S100A8 sobre la úlcera cutánea en ratones diabéticos.

La Fig. 27 muestra en un gráfico el efecto terapéutico de las células que se movilizan en un dispositivo que usa extractos de piel o extractos de sangre periférica sobre úlcera cutánea.

La Fig. 28 muestra en un conjunto de fotografías la detección por microscopía de fluorescencia de células de médula ósea movilizadas en un dispositivo que usa componentes unión a la columna de afinidad de heparina de extractos de sangre periférica.

La Fig. 29 muestra en un gráfico la detección de células de médula ósea movilizadas en un dispositivo que usa componentes de unión a columna de afinidad de heparina de extractos de sangre periférica mediante microscopía de fluorescencia y cuantificación del número de células de médula ósea usando un software de análisis de imágenes.

La Fig. 30 muestra en un gráfico la detección de células derivadas de médula ósea (células positivas para GFP) movilizadas en un dispositivo que usa S100A8, HMGB1, HMGB2 o HMGB3 (A, S100A8; B, HMGB1; C, HMGB2; D, HMGB3; E, control negativo) por microscopía de fluorescencia.

La Fig. 31 muestra en un conjunto de fotografías el efecto terapéutico sobre la úlcera cutánea desarrollada en ratones BALB/cAlcl-nu/nu, de células derivadas de médula ósea movilizadas en un dispositivo que usa S100A8, HMGB1 o HMGB2.

La Fig. 32 muestra en un diagrama un vector de expresión de HMGB1.

La Fig. 33 muestra en un diagrama la administración de extracto de piel (SE) a un ratón a través de la vena caudal, seguido por recolección de sangre periférica.

La Fig. 34 muestra en un diagrama el fraccionamiento citométrico de flujo de una fracción de células mononucleares de sangre periférica de ratón marcadas en forma fluorescente con anticuerpo anti-PDGFR α de ratón y anticuerpo anti-CD44 de ratón 12 horas después de la administración de extracto de piel (SE). Los tres gráficos superiores corresponden al grupo al que se le administró PBS (n = 3) como control negativo, mientras que los tres gráficos inferiores corresponden al grupo al que se le administró extracto de piel (SE) (n = 3). El eje vertical indica el nivel de expresión de CD44, y el eje horizontal indica el nivel de expresión de PDGFR α . El área en recuadro con línea azul corresponde a una población de células doblemente positivas para CD44 y PDGFR α . La población aumentó en el grupo al que se le administró extracto de piel (SE) en comparación con el grupo al que se le administró PBS.

La Fig. 35 muestra en un diagrama la administración de HMGB1 a un ratón a través de la vena caudal, seguido de la recolección de sangre periférica.

La Fig. 36 muestra en un diagrama el fraccionamiento citométrico de flujo de la fracción de células mononucleares de sangre periférica de ratón marcadas en forma fluorescente con anticuerpo anti-PDGFR α de ratón y anticuerpo anti-CD44 de ratón 12 horas después de la administración de HMGB1. El gráfico de la izquierda corresponde a los ratones a los que se les administró PBS como control negativo, mientras que el gráfico de la derecha corresponde a los ratones a los que se les administró HMGB1. El eje vertical indica el nivel de expresión de CD44, y el eje horizontal indica el nivel de expresión de PDGFR α . El área en recuadro con línea azul corresponde a una población de células doblemente positivas para CD44 y PDGFR α . La población aumentó en los ratones a los que se les administró HMGB1 en comparación con los ratones a los que se les administró PBS.

La Fig. 37A muestra en un diagrama el resultado de citometría de flujo que muestra la presencia de células que tienen CD44 y PDGFR α . La administración de HMGB1 aumentó tanto las poblaciones de células doblemente positivas para PDGFR α y CD44, y células positivas para PDGFR α y negativas para CD44 en sangre periférica.

Las Figs. 37B y 37C muestran los resultados de la comparación entre los grupos a los que se les administró PBS y HMGB1 sobre la presencia de células doblemente positivas para PDGFR α y CD44, y células positivas para PDGFR α y negativas para CD44 en sangre periférica, respectivamente. Ambas poblaciones de células aumentaron estadísticamente de forma significativa en el grupo al que se le administró HMGB1.

5

Modo para llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona un recipiente implantable que comprende un material de cualquiera de (a) una proteína S100A8; (b) una proteína S100A9; y (c) ácido hialurónico para uso en un procedimiento de recolección de una población de células que comprende una célula de médula ósea, que comprende las etapas de:

10

(I) implantar el recipiente que contiene cualquiera de (a) a (c) debajo de la piel; y

(II) recolectar una población de células que comprende una célula de médula ósea del recipiente.

15

Además, la presente invención proporciona un recipiente implantable que comprende un material de cualquiera de (a) una proteína S100A8; (b) una proteína S100A9; y (c) ácido hialurónico para uso en un procedimiento de recolección de una célula de médula ósea, que comprende las etapas de:

20

(I) implantar el recipiente que contiene cualquiera de (a) a (c) debajo de la piel;

(II) cosechar una población de células que comprende una célula de médula ósea del recipiente; y

(III) aislar una célula de médula ósea de la población de células cosechadas.

25

Alternativamente, los procedimientos descritos anteriormente pueden comprender, después de la etapa (I), la etapa de retirar el recipiente de debajo de la piel.

30

Los materiales preferidos para el recipiente descrito anteriormente incluyen, pero no se limitan a, silicona, vinilo, plástico y otros materiales biológicamente hipoalérgicos. Mientras tanto, el tamaño del recipiente utilizado en los Ejemplos era: 10 mm de longitud x 2 mm de área de sección transversal (con un volumen de 20 ml, para ratones); sin embargo, el tamaño no se limita al ejemplo anterior, siempre que el recipiente pueda implantarse debajo de la piel. El espesor de la pared del recipiente utilizado en los Ejemplos fue de aproximadamente 0,5 mm; sin embargo, el espesor no está limitado a los ejemplos anteriores, siempre que sea suficiente para mantener la resistencia adecuada. La forma del recipiente utilizado en los Ejemplos era una forma cilíndrica que está abierta solo en un lado; sin embargo, la forma no está particularmente limitada, siempre que no dañe los tejidos biológicos; y la forma incluye cilíndrica, husillo, esférica y ovoide. Los recipientes utilizados en la presente invención incluyen tubos de silicona, bolsas de vinilo y agujas de inyección permanentes. Los recipientes no están particularmente limitados, siempre que sean materiales o dispositivos médicos implantables *in vivo*.

40

En la presente invención, las poblaciones celulares recogidas del recipiente incluyen células derivadas de médula ósea.

45

Las células de médula ósea de la presente invención 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 hasta ahora se han denominado células madre mesenquimales de médula ósea, células madre pluripotentes estromales de médula ósea, o células madre pluripotentes de médula ósea y poblaciones de células progenitoras de tejido existentes en la médula ósea. Las células de médula ósea de la presente invención se pueden aislar a partir de la recolección de médula ósea (recolección de células de médula ósea) o de la recolección de sangre periférica. Las células madre hematopoyéticas son no adherentes, mientras que las células de médula ósea de la presente invención se obtienen como células adherentes por medio de un cultivo celular de una fracción de células mononucleares de sangre obtenida de la recolección de médula ósea (colección de células de médula ósea) o recolección de sangre periférica. Además, las células de médula ósea de la presente invención incluyen células madre mesenquimales, y tienen un potencial para diferenciarse en, preferiblemente, osteoblastos (la inducción de la diferenciación puede identificarse mediante la observación de calcificación), condrocitos (que pueden identificarse mediante tinción positiva para azul alciano, tinción positiva para safranina O, similares), adipocitos (que pueden identificarse mediante tinción positiva para Sudán III) y otras células mesenquimales tales como fibroblastos, células de músculo liso, células estromales y células de tendón; y otras células nerviosas, células epiteliales (por ejemplo, queratinocitos epidérmicos y células epiteliales intestinales expresan la familia de la citoqueratina) y células endoteliales vasculares. Sin embargo, las células a diferenciar no se limitan a las células anteriores, y también se incluye el potencial para diferenciarse en células de órganos parenquimatosos tales como hígado, riñón y páncreas.

60

En la presente invención, las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, las células madre pluripotentes estromales de médula ósea o las células madre pluripotentes de médula ósea se refieren a células existentes en la médula ósea, que se recogen directamente de la médula ósea o se recogen indirectamente de otros tejidos (sangre, piel, tejido adiposo y otros tejidos) y se pueden cultivar/proliferar como células adherentes en una

65

placa de cultivo (de plástico o vidrio). Estas células se caracterizan por tener la capacidad de diferenciarse en tejidos mesenquimales (células madre mesenquimales) tales como huesos, cartílagos y músculos adiposos o esqueléticos, músculos cardíacos, además, tejidos nerviosos, tejidos epiteliales (células madre pluripotentes) y se pueden obtener a partir de una recolección de sangre de médula ósea, sangre periférica o tejidos mesenquimales tales como tejidos
 5 adiposo, epitelial, tales como piel, tejidos nerviosos, tales como cerebro. Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, las células madre pluripotentes derivadas de médula ósea o las células madre pluripotentes de médula ósea también se caracterizan por tener la capacidad de diferenciarse en tejidos epiteliales como los queratinocitos que constituyen piel o tejidos nerviosos que constituyen el cerebro administrando estas células que una vez se han adherido a una placa de cultivo a un área de lesión del cuerpo vivo.

10 Las células madre mesenquimales de médula ósea, las células madre pluripotentes estromales de médula ósea o las células madre pluripotentes de médula ósea de la presente invención son células madre multipotentes, y tienen la capacidad para diferenciarse preferiblemente en: osteoblastos (la inducción de la diferenciación puede identificarse mediante observación de calcificación), condrocitos (que pueden identificarse por tinción positiva para
 15 azul alciano, tinción positiva para safranina O, etc.), adipocitos (que pueden identificarse por tinción positiva para Sudán III o similar) y otras células mesenquimales tales como fibroblastos, células de músculo liso, células de músculo esquelético, células del estroma y células de tendón; células nerviosas, células pigmentarias, células epidérmicas, células de folículo piloso (que expresan la familia de citoqueratina, familia de queratina capilar o similares), células epiteliales (por ejemplo, queratinocitos epidérmicos y células epiteliales intestinales que expresan familia de citoqueratinas o similares) y células endoteliales; y aún más preferiblemente en células de órganos parenquimatosos tales como hígado, riñón y páncreas. Sin embargo, las células diferenciadas no están limitadas a las células anteriores.

20 Las células progenitoras tisulares se definen como células no diferenciadas que tienen la capacidad unidireccional para diferenciarse en células tisulares específicas distintas del sistema sanguíneo, e incluyen células no diferenciadas que tienen la capacidad de diferenciarse en tejido mesenquimal, tejido epitelial, tejido nervioso, órganos parenquimatosos y endotelio vascular como se mencionó anteriormente.

25 Mientras tanto, las células de médula ósea de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, células de médula ósea positivas para al menos uno de los marcadores de superficie celular: CD44, PDGFR α y PDGFR β .

30 En la presente invención, la etapa de implantar un recipiente debajo de la piel se consigue realizando una incisión en la piel de varios milímetros con un bisturí después de anestesia general (o local); crear un espacio necesario en el tejido adiposo subcutáneo mediante disección roma usando una varilla metálica de punta redonda (pinzas para
 35 mosquitos o similares); implantar un recipiente de cosecha de células tal como un tubo de silicona en el espacio; y finalmente cerrando la incisión por sutura o grapado.

40 Los posibles procedimientos alternativos para alojar recipientes debajo de la piel incluyen procedimientos que insertan las fundas interna y externa de una aguja de inyección debajo de la piel, y luego retirar la funda interna (aguja de inyección) y dejar la funda externa dentro; y procedimientos que insertan un catéter de globo sobre un cable guía debajo de la piel, y la permanencia del catéter después de retirar el cable guía expandiendo su globo con un fluido farmacéutico.

45 Los sujetos de la implantación del recipiente incluyen seres humanos y animales no humanos, que incluyen, por ejemplo, humanos, ratones, ratas, monos, cerdos, perros, conejos, hámsteres y conejillos de Indias. El sujeto preferido es humano.

50 En la presente invención, la etapa de recolectar poblaciones celulares de los recipientes puede ser la etapa de recoger poblaciones celulares de los recipientes implantados debajo de la piel, o la etapa de retirar los recipientes de debajo de la piel, seguido por la recolección de poblaciones celulares de los recipientes extraídos. Por ejemplo, los ejemplos en este documento describen que los tubos de silicona implantados debajo de la piel se recuperaron mediante incisión en la piel y las células se recogieron de los tubos mediante aspiración usando pipetas. Sin embargo, otros procedimientos también están disponibles.

55 Los procedimientos de recolección de poblaciones celulares de recipientes implantados debajo de la piel se llevan a cabo de la siguiente manera: un recipiente a implantar debajo de la piel se modifica para que se alargue para formar un extremo en forma de tubo; la parte similar a un tubo se fija fuera del cuerpo; una jeringa está unida al tubo en el momento de la recogida de las células; y las células se recogen por aspiración al vacío. Luego, una solución inductora de células se reinyecta en el tubo implantado en el cuerpo. Esto permite la recogida repetida de células desde el recipiente implantado debajo de la piel. Los recipientes cuya forma es adecuada para los procedimientos se implantan en el cuerpo.

60 En la presente invención, la etapa de aislar células de médula ósea de las poblaciones de células cosechadas se consigue, por ejemplo, aislando células adherentes adheridas a placas de cultivo de las poblaciones de células cosechadas.

Otro procedimiento, por ejemplo, recoge células pipeteando desde tubos retirados del cuerpo; hace reaccionar al menos uno de los marcadores de superficie celular, CD44, PDGFR α , y PDGFR β usando anticuerpos marcados con diferentes tipos de marcadores fluorescentes; y luego usa un clasificador de células para aislar poblaciones de células que tienen marcadores de superficie celular específicos con la presencia de cada tipo de fluorescencia como indicador.

Existe un procedimiento alternativo (MACS), que se realiza, por ejemplo, de la siguiente manera: los marcadores de superficie celular se hacen reaccionar de la misma manera con anticuerpos marcados con partículas metálicas en lugar de fluorescencia; las células unidas con los anticuerpos unidos a metal se atraen e inmovilizan en la pared interna de un lado del tubo usando fuerza magnética; después de eluir completamente las células no reactivas con los anticuerpos, las células objetivo inmovilizadas en el tubo se recogen liberando la fuerza magnética.

La presente invención proporciona un recipiente implantable para uso en un procedimiento de recolección de una población de células que comprende una célula de médula ósea, que comprende las etapas de:

(I) implantar un recipiente debajo de la piel; y

(II) recolectar una población de células del recipiente;

en donde el recipiente contiene cualquiera de los materiales de (a) a (c) descritos anteriormente, o una mezcla de dos o más de los materiales de (a) a (c) descritos anteriormente.

Para lograr la etapa (II), las poblaciones de células se pueden recoger de un recipiente implantado en el cuerpo o un recipiente retirado del cuerpo.

La presente invención también proporciona un recipiente implantable para uso en un procedimiento de recolección de células de médula ósea, que comprende las etapas de:

(I) implantar un recipiente debajo de la piel;

(II) recolectar una población de células que comprende células de médula ósea del recipiente; y

(III) aislar células de médula ósea de la población de células cosechadas;

en donde el recipiente contiene cualquiera de los materiales de (a) a (c) descritos anteriormente, o una mezcla de dos o más de los materiales de (a) a (c) descritos anteriormente.

Para lograr la etapa (II), se puede recolectar una población de células de un recipiente implantado en el cuerpo o un recipiente retirado del cuerpo.

La proteína HMGB1 puede ejemplificarse, pero no se limita a, proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 3 o 5. Las proteínas HMGB1 también pueden incluir proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 3 o 5. 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 la SEQ ID NO: 1, 3 o 5, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 3 o 5; y 2) proteínas aisladas que están codificadas por ADN que hibridan bajo condiciones rigurosas con ADN que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, 4 o 6, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 1, 3 o 5.

La proteína HMGB2 puede ejemplificarse, pero no se limita a, proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 9 u 11. Las proteínas HMGB2 también pueden incluir proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ 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 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 9 u 11, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 9 u 11; y 2) proteínas aisladas que están codificadas por los ADN que hibridan bajo condiciones rigurosas con los ADN que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 8, 10 o 12, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO : 7, 9 u 11.

La proteína HMGB3 puede ser ejemplificada por, pero no se limita a, proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o 15. Las proteínas HMGB3 también pueden incluir proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o 15. 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 la

SEQ ID NO: 13 o 15, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o 15; y 2) proteínas aisladas que están codificadas por los ADN que hibridan bajo condiciones rigurosas con ADN que comprenden la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 14 o 16, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13 o 15.

La proteína S100A8 empleada de acuerdo con la presente invención puede ejemplificarse por, pero no se limita a, proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19 o 21. Las proteínas S100A8 empleadas de acuerdo con la presente invención también pueden incluir proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19 o 21. Ejemplos de tales proteínas incluyen: 1) proteínas aisladas que comprenden una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones de, supresiones, inserciones y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19 o 21, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19 o 21; y 2) proteínas aisladas que están codificadas por ADN que hibridan bajo condiciones rigurosas con ADN que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 18, 20 o 22, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 17, 19 o 21.

La proteína S100A9 empleada de acuerdo con la presente invención se puede ejemplificar por, pero no se limita a, proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, 25 o 27. Las proteínas S100A9 empleadas de acuerdo con la presente invención también pueden incluir proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, 25 o 27. Ejemplos de tales proteínas incluyen: 1) proteínas aisladas que comprenden una secuencia de aminoácidos con una o más la en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, 25 o 27, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, 25 o 27; y 2) proteínas aisladas que están codificadas por ADN que hibridan en condiciones rigurosas con ADN que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 24, 26 o 28, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 23, 25 o 27.

Las proteínas aisladas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27 pueden ser homólogas o parálogas a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27. Los expertos en la técnica pueden aislar proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, o 27, mediante procedimientos conocidos (volumen suplementario de "Jikken Igaku (Medicina Experimental), Idenshi Kougaku Handbook (Genetic Engineering Handbook)", páginas 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 la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27 incluyen proteínas que tienen actividad inductora de células 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 la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27 incluyen proteínas de origen natural. Generalmente, los genes eucariotas tienen polimorfismo como se conoce en los genes de interferón y similares. Las alteraciones en la secuencia de nucleótidos causadas por el polimorfismo pueden dar como resultado una o más sustituciones, supresiones, inserciones y/o adiciones de aminoácidos. Proteínas de origen natural tales como aquellas que comprenden una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones, supresiones, inserciones y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, o 27 se incluyen en las proteínas S100A8, o S100A9 empleadas de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también incluye proteínas mutantes producidas artificialmente siempre que sean funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27. Procedimientos conocidos que causan mutaciones aleatorias a una secuencia de nucleótidos dada incluyen una sustitución o sustituciones de pares de bases por tratamiento con ácido nitroso de ADN (Hirose, S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79: 7258-7260, mil novecientos ochenta y dos). Este procedimiento permite la introducción aleatoria de una sustitución o sustituciones de pares de base en un segmento específico por tratamiento con ácido nitroso del segmento que se desea mutar. Alternativamente, las tecnologías para direccionamiento al sitio de una mutación objetivo incluyen el procedimiento dúplex con huecos (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 que se va a introducir con una mutación, se separa en hebras individuales. Estas cadenas individuales se hibridan con un oligonucleótido sintético mutado en el sitio objetivo. Un ADN de cadena sencilla complementario derivado de un vector linealizado por una enzima de restricción se aparea con el vector de cadena sencilla cíclico, y el espacio entre el oligonucleótido y el vector se llena usando una ADN polimerasa, que luego se convierte en un vector de doble cadena completo mediante ligadura.

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).

5 Cuando un aminoácido está artificialmente sustituido, la sustitución con un aminoácido que tiene propiedades similares daría como resultado el mantenimiento de la actividad de la proteína original. Las proteínas empleadas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas resultantes de una sustitución conservadora en la sustitución anterior de uno o varios aminoácidos, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27. La sustitución conservadora se considera importante cuando se sustituyen uno o varios aminoácidos de dominios importantes para actividades de la proteína. Tal sustitución conservadora de uno o varios aminoácidos es bien conocida por los expertos en la técnica.

15 Ejemplos de grupos de aminoácidos adecuados para sustitución conservadora incluyen aminoácidos básicos (tales como lisina, arginina e histidina), aminoácidos ácidos (tales como ácido aspártico y ácido glutámico), aminoácidos polares sin carga (tales como glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina y cisteína), aminoácidos no polares (como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano), aminoácidos ramificados β (como treonina, valina e isoleucina) y aminoácidos aromáticos (como tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina).

20 Además, una sustitución no conservadora puede aumentar las actividades de la proteína (por ejemplo, proteínas constitutivamente activadas).

25 Además, las proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27 pueden obtenerse mediante procedimientos que utilizan hibridación. Es decir, un ADN que codifica la proteína S100A8 o S100A9 empleada de acuerdo con la presente invención como se muestra en la SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26 o 28 o un fragmento de la misma se usa como sonda, y entonces los ADN que pueden hibridar con ellos están aislados. Una reacción de hibridación realizada bajo condiciones rigurosas conduce a la selección de ADN altamente homólogo como una secuencia de nucleótidos. Esto aumenta las posibilidades de proteínas aisladas que contienen proteínas que son funcionalmente equivalentes a la proteína S100A8 o S100A9. Los ejemplos de secuencias de nucleótidos altamente homólogas incluyen aquellas que tienen 70 % o más, y deseablemente 90 % o más de identidad.

35 En un ejemplo específico, el término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones de hibridación con 6x SSC, 40 % de formamida a 25°C y posterior lavado con 1x SSC a 55°C. La rigurosidad depende de condiciones tales como la concentración de sal, la concentración de formamida o la temperatura; sin embargo, es obvio para los expertos en la técnica establecer estas condiciones para obtener la rigurosidad necesaria.

40 Con el uso de hibridación, por ejemplo, los ADN que codifican homólogos de las proteínas S100A8 o S100A9 distintas de las proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 17, 19, 21, 23, 25 o 27 pueden aislarse.

45 Las proteínas que son funcionalmente equivalentes a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27 normalmente tienen una alta homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25 o 27. El término "alta homología" 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 de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos se puede determinar usando un sitio de búsqueda de homología a través de Internet (por ejemplo, búsquedas de homología tales como FASTA, BLAST, PSI-BLAST y SSEARCH pueden usarse en el banco de datos de ADN de Japón (DDBJ) [ejemplos de las cuales incluyen la página de búsqueda de homología (Search and Analysis) en el sitio web del Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ); sitio web <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>]). Además, las búsquedas que utilizan BLAST se pueden llevar a cabo a través del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (cuyos ejemplos incluyen la página de BLAST en la página principal del sitio web de NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul, SF et al., J. Mol. Biol., 1990, 215 (3): 403-10; Altschul, SF y Gish, W., Meth. Enzymol., 1996, 266: 460-480; Altschul, SF et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25: 3389-3402)).

55 Por ejemplo, en el cálculo de la identidad de las secuencias de aminoácidos usando Advanced BLAST 2.1, el valor de identidad (%) se puede obtener de la siguiente manera: blastp se usa como el programa, el valor se configura en 10, todos los filtros se configuran en OFF, BLOSUM62 se usa para matriz, y el valor de existencia de huecos, por valor de huecos de residuo y la relación lambda se establecen en 11, 1 y 0,85, respectivamente (parámetros predeterminados) (Karlin, S. y SF Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68; Karlin, S. y SF Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7).

65 Las proteínas empleadas de acuerdo con la presente invención, o proteínas funcionalmente equivalentes a las mismas, pueden ser proteínas sometidas a diversas modificaciones tales como modificación fisiológica con cadenas de azúcar y similares, marcación con sustancias fluorescencia o radiactivas, o fusión con otras proteínas. Particularmente en los recombinantes que se describirán más adelante, la modificación de la cadena de azúcar puede variar dependiendo de los huéspedes utilizados para la expresión. Sin embargo, incluso si hay una diferencia

en las modificaciones de la cadena de azúcar, todas las proteínas que tienen propiedades similares a aquellas de las proteínas S100A8 o S100A9 descritas en este documento son proteínas S100A8, o S100A9 empleadas de acuerdo con la presente invención o proteínas funcionalmente equivalentes a las mismas.

5 Las proteínas S100A8 o S100A9 pueden obtenerse no solo de materiales vivos, sino también en forma de recombinantes incorporando genes que codifican estas proteínas en un sistema de expresión apropiado. Con el fin de obtener proteínas S100A8, o S100A9 mediante técnicas de ingeniería genética, los ADN antes mencionados que codifican las proteínas S100A8 o S100A9 pueden incorporarse en un sistema de expresión apropiado, y luego pueden expresarse. Los ejemplos de sistemas huésped/vector aplicables a la presente invención incluyen el vector de expresión pGEX y *E. coli*. Con pGEX, se pueden expresar los genes foráneos como una proteína de fusión con glutatión S-transferasa (GST) (Gene, 67: 31-40, 1988). pGEX incorporado con un gen que codifica la proteína S100A8 o S100A9 se introduce en una cepa de *E. coli* como BL21 mediante choque térmico, se incuba durante un tiempo apropiado y luego se agrega isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) para inducir la expresión de las proteínas S100A8 fusionadas a GST, S100A9 fusionadas a GST. Dado que GST se adsorbe en Glutatión Sefarosa 4B, el producto de expresión se separa fácilmente y se purifica mediante cromatografía en columna de afinidad.

Además, lo siguiente también puede aplicarse como sistemas de huésped/vector para obtener recombinantes de proteínas S100A8 o S100A9. En primer lugar, cuando las bacterias se usan como huéspedes, los vectores de expresión para las proteínas de fusión que utilizan etiqueta de histidina, etiqueta HA, etiqueta FLAG y similares están disponibles comercialmente. Con respecto a las levaduras, se sabe que las levaduras pertenecientes al género *Pichia* son efectivas para la expresión de proteínas que contienen cadenas de azúcar. En términos de la adición de cadenas de azúcar, los sistemas de expresión que utilizan un vector de baculovirus con células de insecto como huésped también son útiles (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 huésped/vector se puede usar como un sistema de expresión de las proteínas S100A8 o S100A9. Además, los genes también se pueden introducir usando vectores virales tales como vectores de retrovirus, vectores de adenovirus y vectores de virus adenoasociados.

Las proteínas así obtenidas empleadas según la presente invención se pueden aislar intracelular o extracelularmente (medio y similares), y se pueden purificar como proteínas que son sustancialmente puras y homogéneas. Las proteínas se pueden separar y purificar usando procedimientos de separación y purificación que se usan comúnmente en la purificación de proteínas, y no están particularmente limitados. Por ejemplo, las proteínas pueden separarse y purificarse seleccionando y combinando de manera apropiada columnas cromatográficas, filtros, ultrafiltración, precipitación por saturación salina, precipitación con solvente, extracción con solvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis de enfoque isoeléctrico, diálisis, recristalización y similares.

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., A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografías pueden realizarse usando cromatografías en fase líquida tales como HPLC y FPLC.

Además, las proteínas empleadas de acuerdo con la presente invención son preferiblemente proteínas sustancialmente purificadas. En este documento, el término "sustancialmente purificado" significa que la pureza de la proteína de la presente invención (proporción de la proteína de la presente invención en componentes de proteína totales) es 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 100 % o cerca de 100 %. El límite superior para "cerca de 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 similares.

Además, una proteína sustancialmente purificada incluye cualquier proteína purificada por cualquier procedimiento de purificación siempre que la pureza de la proteína sea como se mencionó anteriormente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, proteínas sustancialmente purificadas seleccionando y combinando adecuadamente las columnas de cromatografía, filtros, ultrafiltración, precipitación por saturación salina, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis de enfoque isoeléctrico, diálisis, recristalización y similares.

Las células en las que las proteínas S100A8 o S100A9 empleadas de acuerdo con la presente invención se liberan o secretan incluyen básicamente todos los tipos de células derivadas de tejido *in vivo*. Las células que pueden recolectarse fácilmente y cultivarse se ejemplifican mediante, pero no se limitan a, fibroblastos (tales como fibroblastos normales de la piel y líneas celulares derivadas de los mismos). Además, las células que secretan las proteínas S100A8 o S100A9 también se pueden producir de la siguiente manera. Se produce un vector insertando un ADN que codifica proteína S100A8 o S100A9, o un ADN que codifica proteína S100A8 o S100A9 enlazado a 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; SEQ ID NO: 29), 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 normales de la piel y líneas celulares derivadas de los mismos), células de insectos y otras células. Los ejemplos de

ADN que codifican una señal de secreción incluyen, pero sin limitación, ADN con las secuencias descritas anteriormente. Además, no existen limitaciones particulares en el tipo de animal del que derivan estas células, aunque las células de tipo animal del animal objetivo sometidas a administración del vector, células del propio objetivo o las células derivadas de un pariente consanguíneo del objetivo sometido a administración del vector se usa preferiblemente.

Los ejemplos de los vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de plásmidos, vectores de retrovirus, vectores de lentivirus, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de virus Sendai, vectores de envoltura de virus Sendai y vectores de virus de papiloma. Los vectores 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 siguientes vectores también se pueden usar: péptidos parciales de proteína S100A8, o S100A9 que tienen una actividad de inducción de células derivadas de médula ósea; células que secretan estos péptidos parciales; o vectores insertados con los ADN que codifican estos péptidos parciales.

El ácido hialurónico (también llamado hialuronano) es un glicosaminoglicano (mucopolisacárido) en el que los dos azúcares, N-acetilglucosamina y ácido glucurónico, están conectados y unidos. El nombre químico es:

[\rightarrow 3)-2acetamido-2desoxi-D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4) ácido β -D-glucopiranosilurónico-(1 \rightarrow)_n. La mayoría de los ácidos hialurónicos naturales son ácidos hialurónicos de alto peso molecular con un peso molecular de varios cientos de miles. Mientras tanto, los ácidos hialurónicos de bajo peso molecular con dos a 14 azúcares pueden producirse artificialmente. En el campo de la medicina, por ejemplo, el hialuronato de sodio se ha utilizado para inyección en la cavidad articular. Los procedimientos para producir ácidos hialurónicos incluyen procedimientos en los que los ácidos hialurónicos se extraen y purifican a partir de productos producidos usando *Streptococcus zooepidemicus*, una bacteria del ácido láctico, y procedimientos en los que se extraen y purifican ácidos hialurónicos a partir de la cresta de pollo o similares. Los ácidos hialurónicos pueden modificarse de diversas formas por esterificación, oxidación con peryodato, acoplamiento con isourea, sulfatación y similares. Los ácidos hialurónicos también se pueden entrecruzar a través de puentes de éter o éster. Estas modificaciones estabilizan los ácidos hialurónicos contra la degradación, los insolubilizan, los convierten en una forma esponjosa, o les confiere la propiedad para liberar sustancias de manera sostenida. Mientras tanto, CD44 es un receptor de ácido hialurónico, y los ácidos hialurónicos tienen actividad quimiotáctica para células madre mesenquimales que tienen CD44 en su superficie celular.

Mientras tanto, cualquiera de los materiales de (a) a (c) descritos anteriormente o mezclas de cualquiera de dos o más de los materiales, que se usan de acuerdo con la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, las combinaciones de:

ácido hialurónico y proteína S100A8; ácido hialurónico y proteína S100A9; y ácido hialurónico, y proteínas S100A8 y S100A9. La proporción de mezcla se basa en el volumen de la menor cantidad de ingrediente disuelto en un disolvente que se toma como 1, donde los otros ingredientes se pueden agregar en un volumen hasta 10.000 veces mayor, y preferiblemente, los otros ingredientes se pueden agregar en un volumen igual o hasta 10 veces mayor cuando la menor cantidad de ingrediente se toma como 1.

Los tipos de animales que sirven como fuente para la proteína S100A8, o S100A9 empleados de acuerdo con la presente invención incluyen animales humanos y no humanos, que pueden ser ejemplificados por humanos, ratones, ratas, monos, cerdos, perros, conejos, hámsteres y conejillos de indias, pero el tipo de animal es preferiblemente el mismo que el animal al que se le va a administrar el extracto anterior o similar.

La proteína S100A8 o S100A9 empleada de acuerdo con la presente invención se puede colocar en un recipiente mediante inyección usando el siguiente procedimiento. Específicamente, cada solución o soluto se disuelve en solución salina fisiológica y la solución resultante se inyecta manualmente usando un inyector o pipeta. Alternativamente, la solución se inyecta mecánicamente en un tubo en el momento de la producción del tubo.

Mientras tanto, la cantidad de proteína S100A8 o S100A9 empleada de acuerdo con la presente invención para inyectarse en un recipiente se determina apropiadamente de acuerdo con el volumen del recipiente utilizado para la recolección de células. Por ejemplo, cuando el recipiente se implanta en un tejido adiposo subcutáneo abdominal, es posible inyectar aproximadamente 10 ml de un agente de la presente invención. Alternativamente, cuando el recipiente se implanta bajo una piel no abdominal, se espera que la cantidad de inyección sea de aproximadamente varios mililitros.

Las poblaciones celulares y las células de la médula ósea obtenidas de acuerdo con la presente invención se pueden administrar para tratar enfermedades con daño tisular tales como enfermedades hereditarias, enfermedades de la piel (lesión térmica, úlcera cutánea, etc.), enfermedades cerebrales y nerviosas (infarto cerebral, enfermedad de Alzheimer, lesión de la médula espinal, lesión cerebral, etc.), enfermedades cardiovasculares (infarto de miocardio, miopatía cardíaca, embolia arterial, etc.) y enfermedades osteocartilaginosas (fractura ósea, reumatismo,

etc.). Los tejidos pueden regenerarse mediante la administración directa de las células a la circulación sanguínea a través de una vena o arteria, o mediante la administración directa de las células en los tejidos en el sitio dañado inmediatamente después de la recogida de células. Alternativamente, los tejidos se pueden regenerar administrando células en un estado disperso o agregado, o cuando se forman en forma de lámina después de cultivar las células usando placas de cultivo o matraces. Con respecto a la cantidad de administración, se pueden administrar 1 a 10^{14} células, y preferiblemente 10^2 a 10^{10} células. Por lo tanto, se divulgan agentes regeneradores de tejido que comprenden una población de células cosechadas mediante los procedimientos descritos anteriormente para recoger poblaciones de células o células de médula ósea cosechadas mediante los procedimientos descritos anteriormente para recoger células de médula ósea.

El tipo de tejidos a regenerar no está particularmente limitado. El tejido objetivo puede ser cualquier tejido, siempre que sea un tejido dañado. Dichos tejidos incluyen, por ejemplo, tejidos y tejidos cutáneos vivos obtenidos por biopsia (cirugía) del cuerpo (cerebro, pulmón, corazón, hígado, estómago, intestino delgado y grueso, páncreas, riñón, vejiga urinaria, bazo, útero, testículos, sangre, y similares). En particular, los agentes se usan eficazmente para regenerar tejidos que son difíciles para administración directa de agentes desde el exterior del cuerpo (cerebro, corazón o similares). Los tejidos dañados incluyen tejidos dañados debido a diversas afecciones patológicas tales como aquellas que dan como resultado isquemia, hemostasia o hipoxia, traumatismo, quemaduras, inflamación, autoinmunidad, anomalías genéticas, etc., pero no se limitan a estos ejemplos. Además, los tejidos dañados incluyen tejidos necróticos.

Los tejidos no están particularmente limitados, siempre que sean diferenciables de las células de la médula ósea. Tales tejidos incluyen, por ejemplo, todos los tejidos biológicos tales como tejidos cutáneos, tejidos óseos, tejidos cartilaginosos, tejidos musculares, tejidos adiposos, tejidos miocárdicos, tejidos nerviosos, tejidos pulmonares, tejidos gastrointestinales, tejidos hepáticos, tejidos de vesícula biliar, tejidos pancreáticos y sistema urogenitale. Además, los agentes regeneradores de tejidos descritos anteriormente pueden usarse para tratar no solo enfermedades de la piel tales como úlceras cutáneas intratables, heridas de la piel, bullosis y alopecia, sino también daños en los tejidos tales como los causados por infarto cerebral, infarto de miocardio, fractura ósea, infarto pulmonar, úlcera gástrica y enteritis. Las especies de animales a administrar con los agentes regeneradores de tejido descritos anteriormente incluyen, pero no se limitan a, animales humanos y no humanos, por ejemplo, humanos, ratones, ratas, monos, cerdos, perros, conejos, hámsteres y conejillos de indias. Además, los agentes se pueden administrar a pacientes con diabetes. Se sabe que la úlcera cutánea intratable que es una complicación de la diabetes es difícil de tratar en comparación con la úlcera cutánea en personas normales. Los agentes también se usan efectivamente para tales pacientes con diabetes.

Después de la recogida de células, las células se difunden en solución salina fisiológica, y la suspensión celular resultante se puede administrar como un agente regenerador de tejido en el flujo sanguíneo circulatorio tal como una vena o arteria para lograr la regeneración tisular. Alternativamente, el agente regenerador de tejido se puede aplicar o fijar sobre la superficie de un sitio de daño tisular para lograr la regeneración tisular. Alternativamente, el agente se puede inyectar en el sitio dañado usando una jeringa o similar para lograr la regeneración del tejido. Alternativamente, las células se pueden cultivar usando placas de cultivo o matraces, y luego se pueden administrar al sitio dañado en un estado difuso o agregado, o cuando se forman en forma de lámina, para lograr la regeneración del tejido. Con respecto a la cantidad de administración, se pueden administrar 1 a 10^{14} células, y preferiblemente 10^2 a 10^{10} células.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

Ejemplo 1

Objeto: Desarrollar nuevas técnicas altamente eficaces y mínimamente invasivas para recolectar células funcionales tales como células madre que existen en un número extremadamente bajo *in vivo*.

Procedimientos: Se llevaron a cabo estudios para lograr el objetivo anterior.

(1) Después de irradiar a 10 Gy, se trasplantaron ratones (macho) de ocho semanas a través de la vena caudal con células de médula ósea (5×10^6 células/0,1 ml de solución salina regulada con fosfato, pH 7,4) derivadas de ratones transgénicos con proteína fluorescente verde (GFP) para preparar ratones trasplantados con médula ósea con GFP.

(2) Los tubos hechos de material biológicamente hipoalergénico (silicona) se rellenaron con HMGB1, ácido hialurónico, extracto de piel o solución salina regulada con fosfato (pH 7,4) y luego se implantaron bajo la piel dorsal de ratones trasplantados con médula ósea con GFP (Fig. 1)

(3) Los tubos implantados se retiraron dos semanas después de la implantación (Fig. 2). Las células acumuladas en los tubos (células atrapadas en el tubo (TEC) se recogieron y luego se cultivaron en medio de Dulbecco (D-MEM)

complementado con suero bovino fetal al 10 % a 37°C bajo 5 % de gas de dióxido de carbono.

(4) Cuando la densidad de cultivo de TEC alcanzó aproximadamente 80 % de confluencia en la superficie inferior de la placa de cultivo, el medio de cultivo se cambió con un medio inductor de diferenciación ósea, medio inductor de diferenciación adiposa o medio inductor de diferenciación de epidermis. Luego, las células se cultivaron aún más. Dos semanas después del inicio del cultivo en cada medio inductor de diferenciación, la diferenciación en hueso, tejido adiposo y epidermis se evaluó mediante tinción con rojo de alizarina, tinción con rojo aceite e inmunotinción con queratina 5, respectivamente.

(5) La proporción del receptor del factor α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α) y células doblemente positivas CD44 con respecto a TEC se analizó mediante citometría de flujo.

Resultados: tubos de silicona rellenos con HMGB1, ácido hialurónico o extracto de piel se implantaron bajo la piel de ratones trasplantados con médula ósea con GFP. Como resultado, cuando los tubos se llenaron con cualquiera de estas soluciones, se acumularon una gran cantidad de células derivadas de médula ósea positivas para GFP (TEC) en los tubos en una semana. En la Fig. 2 se muestra una imagen de células positivas para GFP acumuladas en un tubo de silicona lleno de HMGB1. Mientras tanto, el número de TEC adhesivas en los tubos de silicona llenos con regulador de fosfato fue significativamente menor. Cuando se cultivaron células recogidas de tubos de silicona llenos con HMGB1, se observó que las TEC adherentes en proliferación se adherían a la placa de cultivo 24 horas después del inicio del cultivo (Fig. 3). Las TEC adherentes que habían migrado a tubos de silicona llenos con HMGB1 se cultivaron en un medio inductor de diferenciación ósea, medio inductor de diferenciación adiposa o medio inductor de diferenciación de epidermis. El resultado mostró que las células tenían la capacidad de diferenciarse en osteoblastos positivos para rojo de alizarina, adipocitos positivos para rojo aceite y células epidérmicas positivas para queratina 5 y, por lo tanto, entre TEC adherentes existen poblaciones de células capaces de diferenciación mesenquimal y epitelial (Figs. 4 a 6). Además, la expresión de PDGFR α y CD44 en TEC se evaluó mediante citometría de flujo. Se sabe que PDGFR α y CD44 se expresan en la superficie de células madre mesenquimales. El resultado mostró que aproximadamente el 60 % de las TEC eran positivas tanto para PDGFR α como para CD44 (Fig. 7).

Además, se implantaron tubos llenos de ácido hialurónico a razón de 100 ng/ml (en PBS) bajo la piel dorsal de ratones trasplantados con médula ósea con GFP. Después de dos semanas, los tubos se retiraron y las células movilizadas en los tubos se analizaron por sus marcadores de superficie mediante FACS. Los resultados fueron similares a los obtenidos con TEC aisladas de tubos de HMGB1, y demostraron que aproximadamente el 60 % de las células eran células P44 positivas tanto para CD44 como para PDGFR α y tenían la capacidad de diferenciarse en células mesenquimales y células epiteliales tales como osteoblastos y adipocitos.

Discusión: En la presente invención, los presentes inventores revelaron que las TEC derivados de médula ósea que tienen la capacidad de diferenciarse en hueso, tejido adiposo y epidermis podrían recolectarse muy eficientemente mediante la implantación debajo de la piel, de tubos de silicona llenos de HMGB1, ácido hialurónico o extracto de piel. Los siguientes hallazgos sugieren que las células madre mesenquimales se movilizan selectivamente a las TEC: la mayoría de las TEC derivadas de médula ósea expresan PDGFR α y CD44 que se sabe que se expresan en la superficie de las células madre mesenquimales; y HMGB1, ácido hialurónico y extracto de piel tienen todos la actividad de movilizar células madre mesenquimales. Al seleccionar una solución para llenar el tubo de silicona, se pueden recoger selectivamente células específicas biológicamente funcionales con alta eficacia de acuerdo con la sustancia contenida en la solución, que es responsable de movilizar las células biológicamente funcionales específicas. Esta nueva técnica de la presente invención permite recolectar las células biológicamente funcionales deseadas sin usar procedimientos altamente invasivos tales como insertar una aguja en la médula ósea. Por lo tanto, se espera que la técnica permita el diseño de técnicas médicas regenerativas hechas de acuerdo con el propósito. Además, las células recolectadas pueden proporcionarse como materiales para diversos tipos de estudios básicos, incluida la investigación con células madre. Por lo tanto, los presentes inventores creen que la presente invención contribuye en gran medida al desarrollo de estudios básicos y clínicos, así como al descubrimiento de fármacos y al progreso de las tecnologías médicas.

Ejemplo 2

Propósito: Evaluar el efecto terapéutico de las células derivadas de la médula ósea movilizadas en el dispositivo hipodérmico sobre la úlcera de la piel

Procedimientos:

(1) Se prepararon dispositivos para implantar en el cuerpo.

(2) Para preparar extracto de tejido cutáneo que contiene factores que movilizan células madre pluripotentes de médula ósea, se aislaron piezas de piel libres de dos cabezas de ratones neonatales C57/BL6 (de dos días de edad) y se sumergieron en 2 ml de solución salina regulada con fosfato (PBS), pH 7,4. Después de 24 horas de incubación a 4°C, la muestra se centrifugó a 440 G y 4°C durante diez minutos para eliminar los tejidos. El sobrenadante

resultante se recogió como extracto de piel. Además, para preparar extracto de células mononucleares de sangre periférica, se recogió sangre periférica completa de dos cabezas de ratones C57/BL6 de 4 semanas y luego se diluyó con PBS hasta un volumen total de 4 ml. Después de colocar 3 ml de Ficoll-Paque Plus (GE) en un tubo de centrífuga, la sangre diluida se superpuso sobre la capa de Ficoll. El tubo se centrifugó a 100 G a 18°C durante diez minutos. La capa intermedia resultante que contenía células mononucleares se transfirió a un tubo de centrífuga nuevo. Para eliminar Ficoll-Paque Plus de la capa intermedia recogida, se añadieron 45 ml de PBS y la mezcla resultante se centrifugó a 440 G a 18°C durante cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante, y de nuevo se añadieron 45 ml de PBS, y la suspensión se centrifugó a 440 G a 18°C durante cinco minutos. El sobrenadante se eliminó, y las células precipitadas se suspendieron en 200 µl de PBS. La suspensión celular se congeló en un congelador a -80°C durante 30 minutos, y luego se transfirió a hielo para descongelar. Este tratamiento de congelación-descongelación se repitió tres veces. La muestra se centrifugó a 440 G a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se recogió (extracto de sangre periférica).

(3) Se irradiaron ratones machos C57/BL6 (de seis a ocho semanas de edad) a una dosis letal (10 Gy). Inmediatamente después de la irradiación, se trasplantaron células de médula ósea derivadas de ratón transgénico de proteína fluorescente verde (GFP) (5×10^6 células/0,1 ml de solución salina regulada con fosfato, pH 7,4) a los ratones a través de la vena caudal. Solo los ratones que habían sobrevivido durante ocho semanas después del trasplante se usaron en experimentos posteriores.

(4) Se insertaron en los dispositivos 40 µl del extracto de piel y extracto de sangre periférica preparados como se describe en (2), o PBS como control negativo. Se implantó un par de dispositivos en los ratones tal como se preparó en (3) (un total de dos dispositivos por cabeza). Los dispositivos se colocaron debajo de la piel dorsal: uno se colocó a la derecha y el otro a la izquierda, dispuestos de modo que sus aberturas estuvieran en contacto con la fascia. Dos semanas después de la implantación, los dispositivos se removieron de los ratones.

(5) Después de eliminar el pelo dorsal de ratones C.B-17/lcr-scid/scidJcl de ocho semanas (Charles River Japan, Inc), se formaron úlceras cutáneas de forma redonda con un diámetro de 6 mm a cada lado de la espalda. Para evitar la contracción de la piel del ratón, se adhirió un disco de silicona con un diámetro exterior de 10 mm, un diámetro interno de 6 mm y un grosor de 1 mm al sitio de la úlcera mediante adhesivo médico y cinta adhesiva de doble faz, Aron alpha A (Sankyo). Las células se recogieron desde el interior de cualquiera de los dispositivos izquierdo y derecho retirados como se describe en (3) y se administraron a la úlcera cutánea. Se colocó un disco de silicona con un diámetro de 10 mm y un grosor de 1 mm sobre la úlcera para evitar la desecación y la infección bacteriana. Luego, la úlcera se cubrió con Tegaderm (3M) para protección. El área de la úlcera se midió después de siete días (Fig. 27).

Como resultado, la úlcera de control negativo no se cerró en la superficie incluso después de siete días. Mientras tanto, en la úlcera administrada con células recolectadas con el extracto de sangre, se observó una reducción del área superficial de la úlcera el día 5. Por otro lado, cuando se administró con células recolectadas utilizando el extracto de piel, se encontró que la úlcera estaba cerrada en la superficie en el día 7 (Fig. 27).

Este ejemplo demostró que cuando se administraba a lesiones de úlcera cutánea, las células derivadas de médula ósea movilizadas en un dispositivo de implantación *in vivo* que contenía extracto de tejido producían un efecto terapéutico sobre la úlcera. El procedimiento terapéutico de la presente invención que usa células de médula ósea movilizadas en dispositivos implantados pero que no recoge células de médula ósea de la médula ósea es un procedimiento terapéutico completamente nuevo.

Ejemplo 3

(1) Se prepararon un extracto de piel y un extracto de sangre periférica mediante el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

Se equilibraron columnas HP de 1 ml HiTrap con Heparina (GE) con 10 ml de regulador de fosfato 10 mM (pH 7,5). Cada extracto de piel y extracto de sangre periférica se diluyó con diez volúmenes de regulador de fosfato 10 mM (pH 7,5) y se cargaron en columnas equilibradas. Para lavar los materiales no adsorbidos específicamente, las columnas se lavaron con 10 ml de regulador de fosfato 10 mM (pH 7,5). Los componentes adsorbidos se eluyeron con regulador de fosfato 10 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 1.000 mM, y se tomaron alícuotas (120 µl) en tubos de plástico. Los contenidos de proteína se determinaron usando un kit de ensayo de proteínas (Bio-Rad), y se recuperaron tres fracciones con la mayor concentración de proteína (extracto de tejido adsorbido en heparina).

(2) Se combinaron 10 µl de PBS que contenía 0,1 % de ácido hialurónico con 40 µl del extracto de tejido. La mezcla resultante se añadió a los dispositivos descritos en el Ejemplo 2. Se usó una mezcla de ácido hialurónico y regulador de fosfato 10 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 1.000 mM como control negativo.çj

(3) Los ratones trasplantados con médula ósea con GFP se prepararon por el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 2. Los dispositivos preparados como se describe en (2) se implantaron bajo la piel dorsal de los ratones. Diez días después de la implantación, los dispositivos se retiraron de debajo de la piel y las células se

recogieron de los dispositivos. Las células recogidas se cultivaron en placas de cultivo que contenían IMDM (Invitrogen) suplementado con 10 % de suero bovino fetal a 37°C bajo una atmósfera de 5 % de CO₂. Para eliminar las células no adherentes, el medio se cambió un día después del inicio del cultivo. Luego, el medio se cambió cada tres días. Una semana después de la cosecha de células, las células se observaron bajo un microscopio de fluorescencia para detectar células derivadas de médula ósea (células positivas para GFP) (Fig. 28). Además, se determinó el número de células positivas para GFP usando un software de análisis de imágenes (Imagen J) (Fig. 29).

La mezcla de ácido hialurónico y fracción de unión a heparina del extracto de tejido (extracto de sangre (Fig. 28C) y extracto de piel (Fig. 28D)) mostró una fuerte actividad de movilización de células adherentes derivadas de médula ósea en el dispositivo (Figs. 28 y 29), en comparación con PBS (Fig. 28A) o ácido hialurónico solos (Fig. 28B).

Este ejemplo demuestra que los factores movilizadores de células de la médula ósea se pueden purificar a partir de extractos de tejidos usando columnas de heparina. El extracto de piel contiene HMGB1, HMGB2, HMGB3, S100A8 y S100A9. Estos componentes se unen a las columnas de heparina, lo que sugiere la posibilidad de que estas células estén involucradas en la movilización de las células de la médula ósea. Alternativamente, dado que varias citoquinas tales como factores de crecimiento también se unen a columnas de heparina, se cree que el efecto neto de los diversos factores es responsable de la movilización de las células de la médula ósea.

Ejemplo 4

(1) Se extrajo ARN de piel de ratón neonatal usando Trizol (Invitrogen), y luego se sintetizó ADNc a partir del ARN usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript III (Invitrogen). El ADNc de S100A8 se amplificó mediante el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ADNc sintetizado como molde. Para la purificación, se insertó ADNc de S100A8 en el vector del plásmido de expresión de proteína de células de mamífero pCAGGS para que se exprese como una proteína que tiene las secuencias de la etiqueta Flag y la etiqueta de 6x His en el extremo terminal N de la secuencia de aminoácidos. Se transfectó pCAGGS-Flag-His-S100A8 en una línea celular cultivada HEK293 derivada de células de riñón fetal humano usando polietilenimina (PEI). Después de 48 horas, las células y el sobrenadante del cultivo se recogieron por separado mediante centrifugación a 4.400 G y 4°C durante cinco minutos. Luego, el sobrenadante recogido se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa que tenía poros con un diámetro de 0,8 µm (Nalgene) y luego a través de un filtro de nitrocelulosa que tenía poros con un diámetro de 0,45 µm (Corning) para preparar una muestra removida de fracciones insolubles. La muestra se cargó en una columna de 5 ml HisTrap FF (GE) equilibrada con 50 ml de Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM, y luego los componentes adsorbidos se lavaron con Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM e imidazol 10 mM para remover los componentes adsorbidos inespecíficamente. Los componentes específicos adsorbidos se eluyeron de la columna usando Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM e imidazol 100 mM. Las fracciones adsorbidas se fraccionaron en tubos de plástico revestidos de silicona (500 µl/tubo). Las fracciones que contenían proteína se combinaron juntas y se mezclaron con perlas de Anticuerpo M2 anti-Flag (Sigma). Las mezclas se incubaron a 4°C durante 12 horas con mezcla suave. Después de la incubación, las perlas se centrifugaron a 440 G durante cinco minutos. Después de eliminar el sobrenadante, las perlas se resuspendieron en PBS y se centrifugaron de la misma manera. El sobrenadante fue eliminado. Las perlas se cargaron en una columna de 3 ml con un diámetro interno de 1 cm, y la proteína adsorbida se eluyó de la columna usando glicina 100 mM (pH 3,5). El eluato se neutralizó con un volumen 1/10 de Tris HCl 500 mM (pH 7,5). La proteína purificada se cuantificó usando un kit de ensayo de proteínas (Bio-Rad).

(2) Se extrajo ARN de piel de ratón neonatal usando Trizol (Invitrogen), y luego se sintetizó ADNc a partir del ARN usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript III (Invitrogen). El ADNc de HMGB1 se amplificó mediante el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ADNc sintetizado como molde. Para la purificación, se insertó ADNc de HMGB1 en el vector del plásmido de expresión de proteína de células de mamífero pCAGGS para que se exprese como una proteína que tiene las secuencias de la etiqueta Flag y la etiqueta 6x His en el extremo terminal N de la secuencia de aminoácidos. Se transfectó pCAGGS-Flag-His-S100A8 en una línea celular cultivada derivada de células de riñón fetal humano HEK 293 usando polietilenimina (PEI). Después de 48 horas, las células y el sobrenadante del cultivo se recogieron por separado centrifugando a 4.400 G a 4°C durante cinco minutos. Luego, el sobrenadante recogido se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa que tenía poros con un diámetro de 0,8 µm (Nalgene) y luego a través de un filtro de nitrocelulosa que tenía poros con un diámetro de 0,45 µm (Corning) para preparar una muestra removida de fracciones insolubles. La muestra se cargó en una columna HisTrap FF de 5 ml (GE) equilibrada con 50 ml de Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM, y luego los componentes adsorbidos se lavaron con Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM e imidazol 10 mM para eliminar los componentes adsorbidos inespecíficamente. Los componentes específicos adsorbidos se eluyeron de la columna usando Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM e imidazol 100 mM. Las fracciones adsorbidas se fraccionaron en tubos de plástico revestidos de silicona (500 µl/tubo). Las fracciones que contenían proteína se combinaron juntas, y luego se eliminó el imidazol usando una columna de desalado PD10 (GE). Las fracciones se eluyeron usando Tris HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM. Se añadió HRV3C (Novagen) a las muestras eluidas y la mezcla se incubó a 4°C durante tres horas. Después de la escisión, la muestra se cargó en una columna 1 ml HiTrap con Heparina (GE) equilibrada con Tris HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM. El interior de la columna se lavó con Tris HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM.

La proteína unida a la columna se eluyó con Tris HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 1.000 mM. La muestra eluida se dividió en alícuotas en tubos de plástico recubiertos de silicona (500 µl/tubo).

5 (3) Se añadieron 40 µg de S100A8, HMGB1, HMGB2 y HMGB3 en dispositivos de silicona. Los dispositivos se implantaron debajo de la piel dorsal derecha e izquierda para que las aberturas de los dispositivos estuvieran en contacto con la fascia. Diez días después de la implantación, los dispositivos se retiraron de debajo de la piel y las células acumuladas en los dispositivos se recogieron de los dispositivos. Las células se cultivaron en placas de cultivo que contenían IMDM (Invitrogen) suplementado con 10 % de suero bovino fetal a 37°C bajo una atmósfera de 5 % de CO₂. Para eliminar las células no adherentes, el medio se cambió un día después del inicio del cultivo. 10 Luego, el medio se cambió cada tres días. Una semana después de la recolección de células, las células se observaron bajo un microscopio de fluorescencia para detectar células derivadas de médula ósea (células positivas para GFP) (Fig. 30).

15 (4) Se formaron úlceras cutáneas de forma redonda con un diámetro de 6 mm en el lomo (costados izquierdo y derecho) de ratones BALB/cAJcl-nu/nu de ocho semanas de edad (Charles River Japan, Inc). Para evitar la contracción de la piel del ratón, se adhirió un disco de silicona con un diámetro exterior de 10 mm, un diámetro interno de 6 mm y un grosor de 1 mm al sitio de la úlcera utilizando cinta adhesiva de doble faz y adhesivo médico, Aron alpha A (Sankyo).

20 (5) Las células descritas en (3) se desprendieron de las placas de cultivo por tratamiento con una solución que contenía 0,5 g/L de tripsina y 0,53 mmol/L de EDTA (Nacalai Tesque). Después de inactivar la tripsina con IMDM que contenía 10 % de SFB, las células se centrifugaron a 440 G a 4°C durante cinco minutos. Después de eliminar el sobrenadante, las células se administraron a la úlcera formada como se describe en (4). Se colocó un disco de silicona con un diámetro de 10 mm y un grosor de 1 mm sobre la úlcera para evitar la desecación y la infección bacteriana en el sitio. Luego, la úlcera también se cubrió con Tegaderm (3M) para protección. El área de la úlcera se midió siete días después de la administración (Fig. 31). 25

30 Todos S100A8, HMGB1, HMGB2 y HMGB3 mostraron la actividad de movilizar células de médula ósea (Fig. 30; A, S100A8; B, HMGB1; C, HMGB2; D, HMGB3) en comparación con el control negativo (E). En particular, HMGB1 y HMGB2 mostraron una actividad de movilización más fuerte.

Además, la úlcera cutánea se trató administrando células derivadas de médula ósea movilizadas por HMGB1, HMGB2 o S100A8. Se observó el efecto de la reducción de la úlcera (Fig. 31) en comparación con el control negativo (administrado con PBS). 35

Este ejemplo demostró que todos S100A8, HMGB1, HMGB2 y HMGB3 exhibían la actividad de movilizar células adherentes derivadas de médula ósea en el dispositivo. Las células principales en la médula ósea son células hematopoyéticas tales como eritrocitos y hemocitos y la mayoría de las células son células no adherentes. Mientras tanto, células mesenquimales, tales como las células madre mesenquimales, se conocen como células adherentes. 40 Se especula que tales células incluyen células pluripotentes capaces de diferenciarse en células epiteliales y nerviosas. Dado que este ejemplo demostró que las células movilizadas en el dispositivo usando S100A8, HMGB1 o HMGB2 ejercían un efecto terapéutico sobre la úlcera cutánea, las células movilizadas en los dispositivos son células derivadas de médula ósea capaces de inducir la cicatrización de daños tisulares. Se ha informado que las células madre mesenquimales de la médula ósea producen efecto terapéutico cuando se administran a lesiones de 45 úlcera cutánea (Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Stem Cells 2007 Oct; 25 (10): 2648-59; Epub 2007 Julio 5). Por lo tanto, se sugiere que las células madre mesenquimales de médula ósea están implicadas en el efecto terapéutico descrito en este ejemplo. Además, se sabe que las células derivadas de médula ósea, tales como las células madre mesenquimales de médula ósea, se diferencian en células nerviosas, adipocitos, osteocitos, condrocitos y células epiteliales. Las células recogidas usando los dispositivos de la presente invención son aplicables a nuevos medicamentos que inducen la regeneración en los que los tejidos dañados se tratan suministrando los tejidos con las células. 50

Ejemplo de referencia 1

55 **Objetivo:** identificación de la familia HMGB1 en el extracto de piel y examen de la actividad inductora de células madre mesenquimales de médula ósea

Procedimientos: Si un extracto de piel de ratón neonatal contenía o no la familia de proteínas HMGB se confirmó usando el procedimiento de transferencia de Western. Se sumergieron piezas de piel libres de 400 ratones neonatales en 400 ml de solución fisiológica de regulador de fosfato (PBS, pH 7,4) y la solución se incubó a 4°C durante 24 horas. Para remover los tejidos, las muestras se centrifugaron a 440 G a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante se recogió como extracto de piel. Se usaron diez µl del extracto de piel obtenido como muestra y se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE. Las proteínas separadas dentro del gel se transfirieron a una membrana de PVDF usando un dispositivo de transferencia (ATTO). La membrana se incubó con PBS que contenía leche desnatada al 3 % y Tween20 al 0,1 % (ST-PBS) a temperatura ambiente durante una hora, y luego se dejó reaccionar con cada anticuerpo de conejo anti-HMGB1 de ratón, anticuerpo de conejo anti-HMGB2 de ratón, o 65

anticuerpo de conejo anti-HMGB3 de ratón que se diluyó 1.000 veces con ST-PBS, a 4°C durante 16 horas. Después de la reacción, la membrana de PVDF se lavó con S-T-PBS cinco veces durante 5 minutos. A continuación, la membrana de PVDF se incubó con anticuerpo de cabra anti IgG de conejo marcado con peroxidasa (GE Healthcare) diluido 2.000 veces (diluido con S-T-PBS) a 25°C durante 1 hora. Además, después de lavar con S-T-PBS cinco veces durante 5 minutos, la membrana de PVDF se dejó reaccionar con el sistema de detección de transferencia de Western ECL (GE Healthcare). La película de ECL se expuso y desarrolló para detectar la presencia de proteínas HMGB1, HMGB2 y HMGB3.

Se extrajo el ARN de la piel del ratón neonatal usando Trizol (Invitrogen), y se sintetizó ADNc adicional usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript III (Invitrogen). Usando este ADNc como molde, los ADNc de HMGB1, HMGB2 y HMGB3 se amplificaron usando el procedimiento de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los ADNc se insertaron en el vector plásmido pCAGGS para expresar proteínas en células de mamífero, de manera que las proteínas con una secuencia de etiqueta Flag adicional (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Lys, SEQ ID: 30) en el extremo terminal N de la secuencia de aminoácidos podría expresarse. Estos vectores plasmídicos se transfirieron en HEK293 (línea celular de cultivo derivada 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 luego se centrifugó a 4.400 g durante 5 minutos para recolectar el sobrenadante. Se mezclaron 100 µl del anticuerpo anti-Flag Gel (Sigma) en 50 ml de este sobrenadante, y luego se incubó a 4°C durante 16 horas. Luego se realizó una centrifugación para recolectar el gel, y se lavó con PBS cinco veces. Además, la proteína se eluyó usando péptido Flag 3x (final 100 µg/ml). La expresión de proteínas recombinantes se observó mediante el procedimiento de transferencia de Western utilizando un anticuerpo anti-Flag de ratón diluido 1000 veces (diluido con ST-PBS) y anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (GE Healthcare) (diluido 2.000 veces) (diluido con ST-PBS). La actividad de migración de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón en estas proteínas recombinantes purificadas se evaluó usando una cámara de Boyden. Además, para observar la eficacia del fármaco *in vivo* de la familia HMGB, se cortó la piel dorsal de ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad en un círculo que tenía un diámetro de 8 µm para preparar modelos de úlcera cutánea. HMGB1, HMGB2 y HMGB3 purificados (100 ng/µl) se mezclaron cada uno con la misma cantidad de solución de ácido hialurónico que tenía una concentración de 1 g/100 ml de PBS, y se administraron 100 µl de la misma a la superficie de la úlcera. La superficie de la úlcera se cubrió con un vendaje adhesivo transparente/material de protección Tegaderm (3M Healthcare) para evitar el secado, y el área 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 el HMGB1 humano purificado tienen o no una actividad para permitir la migración de células madre mesenquimales de médula ósea humana, se usó una cámara de Boyden para evaluación. Una piel humana que tenía un área de 1 cm² se sumergió en 1 ml de PBS, y luego se incubó a 4°C durante 16 horas y posteriormente se centrifugó a 440 G a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante solo se recogió para usarlo como extracto de piel humana. Además, se utilizaron células madre mesenquimales de médula ósea humana (Cambrex) como las células que se colocaron en la cámara superior de la cámara de Boyden (como resultado del análisis de antígeno de superficie por citometría de flujo, se ha confirmado que estas células son positivas para CD105, positivas para CD166, positivas para CD29, C positivas para D44, negativas para CD34 y negativas para CD45. También se ha encontrado que se diferencian en adipocitos, condrocitos y osteocitos mediante pruebas de inducción de diferenciación). Además, 100 ng/pozo de HMGB1 (R&D) humano y extracto de piel humana diluida 10 veces con PBS se colocaron en la cámara inferior. Se usó PBS como control.

Resultados: Como resultado de la transferencia de Western, se detectaron bandas de HMGB2 y HMGB3, así como la banda HMGB1. Por lo tanto, se confirmó que el extracto de piel de ratón neonatal contenía las proteínas de la familia, HMGB2 y HMGB3, además de HMGB1 (Fig. 8). Se prepararon los vectores de expresión de HMGB1/HMGB2/HMGB3 que tenían una etiqueta Flag añadida en el extremo terminal N de cada proteína (Fig. 9). Estos vectores de expresión se transfirieron en células HEK293, y las proteínas expresadas se purificaron usando la etiqueta Flag, y se llevó a cabo transferencia de Western para observar estas proteínas (Fig. 10). La actividad de migración de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón se midió usando estas proteínas purificadas, y la actividad se confirmó en todas las proteínas (Fig. 11). El área de la úlcera producida en el lomo del ratón se midió cada 7 días, y se confirmó un efecto significativo sobre la reducción del área de la úlcera en los grupos de tratamiento HMGB 1, 2 y 3, en comparación con el grupo no tratado (Fig. 12). De manera similar al caso del ratón, se descubrió que la HMGB1 humana y el extracto de piel humana tienen la actividad de inducir la migración de células madre mesenquimales de médula ósea humana (Fig. 13).

Discusión: HMGB2 y HMGB3 se conocen como proteínas que tienen homologías altas con HMGB1. También se espera que estas proteínas tengan propiedades similares a HMGB1. Se confirmó que HMGB2 y HMGB3 de la familia HMGB1 también se producen a partir del extracto de la sección de piel libre. Además, se produjeron proteínas recombinantes HMGB1/HMGB2/HMGB3, y también se confirmó su actividad de migración de células madre mesenquimales de médula ósea *in vitro* y el efecto terapéutico *in vivo* sobre una úlcera cutánea. Se reveló que la familia HMGB (HMGB1/HMGB2/HMGB3) y la familia HMGB recombinante en la sección de piel libre de ratón neonatal tienen una actividad mesenquimal inductora de células madre y una actividad de inducción local de células madre derivadas de médula ósea que son diferenciables en epitelio, y que el grupo celular derivado de médula ósea así inducido se diferencia en varias células tales como queratinocitos epidérmicos, folículos pilosos y fibroblastos en

el tejido dañado para promover la recuperación del tejido dañado. Además, dado que las células madre mesenquimales de médula ósea son células madre multipotentes, los presentes inventores creen que también se pueden esperar efectos terapéuticos de la misma manera mediante administración sistemática o administración local de la familia HMGB para tratar estados dañados en otros tejidos, por ejemplo, daños de tejido tales como lesión cerebral, infarto de miocardio y fractura ósea.

Además, se sabe que, entre humanos y ratones, la homología de secuencia 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 humano y HMGB de ratón tienen actividades similares y los resultados revelaron que el extracto de piel humana y la HMGB1 humana tienen actividades inductoras de células madre mesenquimales de médula ósea de la misma forma que el extracto de piel de ratón y HMGB1 de ratón.

Ejemplo de referencia 2

Objetivo: establecer un procedimiento para la producción de un extracto de tejido que contenga factores inductores de células madre mesenquimales de médula ósea.

Procedimientos: se sumergieron cerebro, corazón, intestino, riñón e hígado de un ratón C57BL6 de 6 semanas de edad y piel de un ratón neonatal en 1 ml de solución fisiológica con regulador de fosfato (PBS) a pH 7,4. Las soluciones se incubaron a 4°C durante 24 horas, y luego se centrifugaron a 440 G a 4°C durante 10 minutos para eliminar los tejidos. Los sobrenadantes se recogieron para preparar extractos de tejidos. Para confirmar si el extracto así obtenido tiene una actividad inductora de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, se examinó la actividad de migración de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea usando una cámara de Boyden. Además, la concentración de HMGB1 contenida en estas muestras se midió usando un kit ELISA para HMGB1 (prueba de Shino). Además, los extractos de tejido del cerebro, corazón y piel se les permitió enlazarse a una columna de afinidad de heparina, y se confirmó la actividad inductora de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea en la fracción unida a proteína usando la cámara de Boyden.

Resultados: el extracto de cerebro de ratón contenía una cantidad de HMGB1 equivalente al extracto de piel de ratón neonatal. Además, también se observó actividad inductora de células madre mesenquimales de médula ósea en el cerebro del ratón así como también en la piel. Aunque el extracto de intestino de ratón y el extracto de corazón de ratón contenían poco HMGB1, se observaron actividades de inducción de células madre mesenquimales de médula ósea. Además, las fracciones unidas a columna de heparina de cerebro de ratón y corazón de ratón, así como la fracción de piel de ratón unida a la columna de heparina, mostraron actividades inductoras de células madre mesenquimales de médula ósea (Fig. 14). La Tabla 1 muestra los resultados de medición de la concentración de HMGB1 y la actividad inductora de células madre mesenquimales de médula ósea en cada uno de los extractos de tejido de ratón.

Tabla 1

	concentración de HMGB1 (ng/ml)	Actividad inductora de células madre mesenquimales de médula ósea
Piel	110	Presente
Cerebro	140	Presente
Corazón	4	Presente
Intestino	0	Presente
Riñón	115	ND
Hígado	61	ND
ND: No Determinado		

Discusión: Un procedimiento en el que HMGB1 se puede extraer convenientemente no solo de la piel sino también del cerebro se desarrolló simplemente sumergiendo estos órganos en un regulador fisiológico. Este procedimiento también se aplica a otros órganos como el hígado y el riñón. Además, aunque los extractos de intestino y corazón contienen poco HMGB1, se observó una actividad inductora de células madre mesenquimales de médula ósea. Esto sugiere que estos extractos contienen otra sustancia o sustancias que inducen células madre mesenquimales de médula ósea a parte de HMGB1. Tales sustancias contenidas en estos extractos están originalmente presentes en cada tejido, y se considera que inducen fisiológicamente células madre mesenquimales de médula ósea al tejido dañado cuando el tejido está dañado. La presente invención desarrolló un nuevo procedimiento para extraer de manera conveniente y funcional de diversos órganos múltiples sustancias inductoras de células madre mesenquimales de médula ósea, incluyendo HMGB1. Además, también se desarrolló un procedimiento para purificar sustancias inductoras de células madre mesenquimales de médula ósea a partir de un extracto de tejido usando la

unión a la columna de heparina. Estas sustancias que tienen actividades inductoras de células madre mesenquimales de médula ósea pueden purificarse del cerebro y el corazón de la misma manera que en la piel usando una columna de heparina.

5 **Ejemplo de referencia 3**

Objetivo: establecer un procedimiento para extraer activadores de migración de células madre mesenquimales de células cultivadas.

10 Procedimientos: La línea celular cultivada derivada de riñón embrionario humano HEK293 y la línea celular de carcinoma de cuello uterino humano HeLa se cultivaron cada una en D-MEM que contiene suero bovino fetal al 10 % (Nacalai). Estas células se lavaron cada una con PBS, y luego se sumergieron 10^7 células en 5 ml de PBS (Nacalai) a 4°C durante 16 horas. La solución se centrifugó a 440 G (aceleración de la gravedad) a 4°C durante 5 minutos, y luego se recogió el sobrenadante. Se colocaron células madre mesenquimales de médula ósea humana en la
15 cámara superior de una cámara de Boyden, y se colocó un extracto de células diluido 5 veces (con DMEM) en la cámara inferior, para confirmar la actividad de migración de células madre mesenquimales de médula ósea humana.

Resultados: el extracto de HEK293 y el extracto de HeLa mostraron ambos actividad de migración de células madre mesenquimales de médula ósea similares (Fig. 15).

20 Discusión: Los activadores de migración de células madre mesenquimales de médula ósea se extrajeron con éxito mediante el procedimiento conveniente de sumergir células cultivadas en PBS.

25 **Ejemplo de referencia 4**

Objetivo: Si se puede inducir o no la regeneración de células neuronales se examina produciendo modelos defectuosos de cerebro de ratón, a los que se administra una fracción purificada en columna de heparina de extracto de piel de manera sostenida en el sitio de lesión local, mediante el cual las células madre contenidas en un sistema
30 mielóide de ratón pueden migrar al sitio local de la lesión.

Procedimientos:

(1) Preparación de la fracción purificada en columna de heparina de extracto de piel

35 Se incubó una sección de piel extirpada de un ratón neonatal 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 regulador de fosfato 20 mM a pH 7,5 a 4°C. Se vertió regulador de fosfato 20 mM a pH 7,5 (30 ml) en una columna HP HiTrap con Heparina (volumen de columna: 5 ml, GE Healthcare) con antelación para equilibrar la columna. La solución diluida se dejó entonces unir a la columna. Después de eso, la columna se lavó con regulador de fosfato 20 mM a pH 7,5 y NaCl 100 mM (30 ml).
40 Para eluir las proteínas adsorbidas, se vertieron en la columna regulador de fosfato 20 mM a pH 7,5 y NaCl 1.000 mM, y las fracciones se eluyeron en los tubos. Cada una de las fracciones adsorbidas se evaluó de acuerdo con la evaluación de la actividad de migración de células derivadas de médula ósea de ratón usando el procedimiento de la cámara de Boyden, y se recogieron la fracción o fracciones que tenían actividad migratoria. Se usaron la solución o soluciones que tienen la actividad como una fracción o fracciones purificadas con heparina del extracto de piel en el
45 siguiente ejemplo de referencia.

(2) Producción de ratones mielosupresores

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

(3) Trasplante de médula ósea de ratón con GFP a ratones mielosupresores

Se recogieron células de médula ósea de ambos fémures y huesos crus de ratones con GFP. Estas células se administraron a los ratones mielosupresores a través de la vena caudal 24 horas después de la irradiación. La
55 administración se llevó a cabo bajo anestesia inhalatoria usando isoflurano.

(4) Producción de un modelo de ratón con defectos cerebrales (tejido cerebral defectuoso)

Los ratones mielosupresores trasplantados con células de médula ósea de ratón con GFP se sometieron a anestesia inhalatoria usando isoflurano, y se inyectó en forma intraperitoneal pentobarbital (45 mg/kg) a los ratones. Los
60 ratones se fijaron en un aparato de cirugía estereotáxica cerebral y se sometieron a una incisión en la línea media en la cabeza con un bisturí. La trepanación se llevó a cabo a 2,5 mm del costado lateral derecho y 12,5 mm anterior al bregma usando un taladro (Fig. 16A). A una profundidad de 3 mm de este sitio, se insertó y fijó una aguja 20G Surfllow. Luego, se aplicó una presión negativa usando una jeringa para succionar parte del tejido cerebral (Fig.
65 16B).

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

5 Se inyectaron cinco microlitros de una fracción purificada en columna de heparina de extracto de piel disuelto en una formulación adhesiva de tejido de fibrina (fibrinógeno) (Bolheal (Kaketsuken)) en el sitio anterior, y posteriormente, se inyectaron 5 µl de una formulación adhesiva de tejido de fibrina (trombina) (Bolheal (Kaketsuken)) utilizando una jeringa Hamilton y una jeringa 26G (Fig. 16C). El objetivo de esta operación fue ejercer el efecto del agente de liberación sostenida de una fracción del extracto de piel purificada en columna de heparina.

10 (6) Evaluación de los efectos de la regeneración de células neuronales en sitios defectuosos de tejido cerebral

Los ratones del grupo de control y el grupo de tratamiento se usaron para la evaluación. Se determinó un ajuste apropiado del tiempo transcurrido (a lo largo del tiempo), los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4 % y se fijaron y luego se cortó el cerebro. Además, la fijación externa se realizó con paraformaldehído al 4 %. Estos se deshidrataron luego en un gradiente de sacarosa del 15 % y 30 % para producir secciones congeladas.

20 El núcleo se tiñó con una solución DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) y la sección se selló usando un inhibidor de fotoblanqueo. La acumulación de células positivas para GFP en el sitio de la lesión (sitio defectuoso de tejido cerebral) se evaluó usando un microscopio láser confocal.

25 Resultados: la acumulación de células positivas para GFP se muestra cualitativamente durante 2 semanas y 6 semanas después de la administración. La acumulación de células positivas para GFP tiende a ser mayor en los sitios de lesión del grupo de tratamiento en lugar del grupo de control, tanto para ambas 2 semanas (control, Fig. 16D, fracción purificada en columna de heparina de extracto de piel, Fig. 16E) como para 6 semanas (control, Fig. 16F, fracción purificada en columna de heparina con extracto de piel, Fig. 16G) después de la administración.

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

35 **Ejemplo de referencia 5**

Propósito: Identificar factores inductores de células madre de tejido derivado de médula ósea en extractos de tejido de piel

40 Procedimientos: mediante el procedimiento descrito a continuación, se realizó un estudio para identificar los factores responsables de la movilización de células madre mesenquimales de médula ósea, que se predijo que se liberarían de la piel extirpada en condiciones hemostáticas.

45 (1) Las células de médula ósea se recogieron de los huesos de los muslos o crurales de ratones C57BL/6 para obtener células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de ratón. Las células se sembraron en una placa de cultivo celular con D-MEM (Nacalai) complementado con 10 % de suero bovino fetal como medio de cultivo y se cultivaron a 37°C bajo 5 % de gas dióxido de carbono. Cuando las células se cultivaron para ocupar un área de 70 a 100 % con respecto al fondo de la placa de cultivo, las células se desprendieron de la placa de cultivo usando tripsina al 0,25 %/EDTA 1 mM (Nacalai). Las células se pasaron a continuación en las mismas condiciones de cultivo. Después de al menos cinco pasadas, las células adherentes se aislaron y se cultivaron adicionalmente, y se analizaron para detectar antígenos de la superficie celular mediante citometría de flujo. El resultado mostró que las células eran positivas para CD44 y Sca-1, y negativas para Lin, CD45 y c-kit. Se confirmó que las células pueden diferenciarse en osteocitos y adipocitos y, por lo tanto, tienen las características de las células madre mesenquimales de la médula ósea.

55 (2) Se sumergieron piezas de piel libres aisladas de cinco cabezas de ratones neonatales (dos días de vida) en 5 ml de solución salina fisiológica regulada con fosfato (PBS, pH 7,4). Después de 24 horas de incubación a 4°C, la muestra se centrifugó a 440 G a 4°C durante diez minutos para remover los tejidos. El sobrenadante se recogió como extracto de piel. Además, de la misma manera, las piezas de piel libres aisladas de un ratón de seis semanas de edad se sumergieron en 5 ml de solución salina fisiológica regulada con fosfato (PBS, pH 7,4). Después de la incubación a 4°C durante 24 horas, las muestras se centrifugaron a 440 G a 4°C durante diez minutos para remover los tejidos. Los sobrenadantes fueron recolectados como extracto de piel.

65 (3) Para confirmar si el extracto de piel preparado tiene la actividad de inducir células madre mesenquimales de médula ósea, los presentes inventores usaron la cámara de Boyden para examinar la actividad quimiotáctica para células mesenquimales derivadas de médula ósea previamente clonadas derivadas de ratones C57BL/6.

Específicamente, se añadió una mezcla de DMEM (20 μ l) y extracto de piel (5 μ l) de ratones de dos días o seis semanas de edad en el compartimiento inferior (un volumen de 25 μ l) de una cámara de Boyden, y se colocó en la parte superior de una membrana de policarbonato con microporos de 8 μ m. Luego, el compartimiento superior (un volumen de 50 μ l) de la cámara de Boyden se puso en contacto con la membrana y una suspensión de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (5 x 10⁴ células/50 ml de medio de cultivo (DMEM complementado con 10 % de suero bovino fetal)) en el compartimiento superior. La cámara se incubó en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 4 a 24 horas. Después de la incubación, se eliminó la unidad superior de la cámara. La película delgada de silicona se separó y el número de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea que migraron al compartimiento inferior a través de los microporos se determinó cuantitativamente mediante tinción de las células (Fig. 17).

(4) Se extrajeron muestras de piel de aproximadamente 2 cm² de ratones de dos días y seis semanas y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras de piel fueron molidas en un mortero. Los ARN se extrajeron y purificaron de las muestras usando RNeasy (Qiagen). Utilizando los ARN purificados, se llevó a cabo un ensayo de microarreglos para seleccionar el ARNm expresado a niveles más altos en los ratones de dos días de vida. 767 genes mostraron dos o más veces puntajes mayores en los ratones de dos días. De estos genes, se examinaron proteínas con alta afinidad por la heparina, proteínas secretoras potenciales y genes cuyas puntuaciones fueron seis o más veces mayores en los ratones de dos días de vida y se encontró S100A9 como el gen 57 de la parte superior. Por lo tanto, se detectó S100A8 que se sabe que forma un heterodímero con S100A9 en el extracto de piel de ratones de dos días de edad mediante transferencia de Western. Específicamente, se combinaron 5 μ l del extracto de piel de los ratones de dos días con 5 μ l de regulador de muestra SDS-PAGE (Bio-Rad). La mezcla se calentó en un bloque de calentamiento a 98°C durante cinco minutos, y luego se enfrió a 25°C. La muestra resultante se aplicó sobre gel de acrilamida al 12,5 % e-PAGEL (ATTO) y se sometió a electroforesis a 40 mA durante 75 minutos usando un dispositivo electroforético (ATTO). El gel se recogió después de la electroforesis. Usando un dispositivo de transferencia (ATTO), las proteínas en el gel se transfirieron a membrana de PVDF (7 cm por 9 cm, Millipore) pretratada con metanol al 100 %. Después de 75 minutos de transferencia de proteína a 120 mA, la membrana de PVDF se retiró y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos en PBS (Nacalai) que contenía leche desnatada al 4 %. Luego, la membrana de PVDF removida se remojó en 5 μ l de anticuerpo anti-S100A8 (R&D) o anticuerpo anti-S100A9 (R&D), cada uno diluido con 10 ml de PBS que contenía leche desnatada al 4 %, y se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de eliminar la solución de anticuerpo, la membrana se agitó en 30 ml de PBS que contenía Tween20 al 0,1 % a temperatura ambiente durante cinco minutos. Este lavado fue repetido cinco veces. Luego, la membrana se empapó en 5 μ l de anticuerpo anti-IgG de cabra marcado con HRP (GE Healthcare) diluido con 10 ml de PBS que contenía leche desnatada al 4 %, y se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después de eliminar la solución de anticuerpo, la membrana se lavó con 30 ml de PBS que contenía Tween20 al 0,1 % a temperatura ambiente durante cinco minutos mientras se agitaba. Este lavado fue repetido cinco veces. La membrana se trató por luminiscencia usando el kit de detección ECL (GE Healthcare), y luego se expuso en una película. Las señales para las proteínas S100A8 y S100A9 se obtuvieron desarrollando la película en un aparato de revelado (Fig. 18).

(5) Los factores que tienen la actividad de movilizar células madre mesenquimales derivadas de médula ósea en extractos de piel se purificaron por cromatografía en columna de afinidad con heparina. El experimento descrito a continuación se llevó a cabo usando un dispositivo de FPLC (GE Healthcare). Primero, el extracto de piel de ratones de dos días se diluyó 10 veces con nueve volúmenes de regulador de fosfato 20 mM (pH 7,5) a 4°C (solución A de dilución). Se pasaron 300 ml de regulador de fosfato 20 mM (pH 7,5) a través de una columna HiPrep 16/10 de Heparina FF (GE Healthcare) para equilibrar la columna con antelación, y se cargó la solución A de dilución en la columna. Luego, la columna se lavó con 300 ml de regulador de fosfato 20 mM (pH 7,5). Se prepararon regulador de fosfato 20 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 10 mM (solución A) y regulador de fosfato 20 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 500 mM (solución B) para eluir la proteína adsorbida. La elución se inició con [100 % de solución A + 100 % de solución B], y luego la proporción de solución B aumentó gradualmente. Finalmente, la columna se eluyó con [0 % de solución A + 100 % de solución B]. El volumen total de elución fue de 150 ml. El eluato se fraccionó en tubos revestidos de silicona (3 ml/tubo). Se mezclaron 5 μ l de cada una de las muestras fraccionadas con 5 μ l de regulador de muestra SDS-PAGE (Bio-Rad). Las mezclas se calentaron en un bloque de calentamiento a 98°C durante cinco minutos, y luego se enfriaron a 25°C. Las muestras se aplicaron sobre un gel de acrilamida e-PAGEL (gradiente del 5-20 %, ATTO) y se sometieron a electroforesis a 40 mA durante 75 minutos usando un dispositivo de electroforesis. Después de la electroforesis, la proteína sometida a electroforesis se detectó usando el kit de tinción Dodeca Silver (Bio-Rad) (Fig. 19).

La actividad quimiotáctica de las muestras fraccionadas se ensayó de la misma manera que la descrita anteriormente usando una cámara de Boyden (Fig. 20).

La presencia de las proteínas S100A8 y S100A9 en las muestras fraccionadas se detectó de la misma manera que se describió anteriormente mediante transferencia de Western (Fig. 21).

(6) Se extrajo ARN de piel de ratón neonatal usando Trizol (Invitrogen), y luego se sintetizó ADNc a partir del ARN usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript III (Invitrogen). Los ADNc de S100A8 y S100A9 se amplificaron por el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ADNc como molde. Estos ADNc se

insertaron cada uno en un vector plásmido de expresión de proteína de célula de mamífero, pCAGGS, para expresar las proteínas en las que se une una secuencia de una etiqueta de GST (secuencia de aminoácidos/SEQ ID NO: 31; secuencia de ADN/SEQ ID NO: 32) al extremo terminal N de sus secuencias de aminoácidos (Fig. 22). Se transfectoron pCAGGS-GST-S100A8 o pCAGGS-GST-S100A9 en una línea celular HEK293 cultivada derivada de células de riñón fetal humano usando un reactivo de lipofección (Invitrogen). 48 horas después de la transfección, las células y el sobrenadante de cultivo se recogieron y se centrifugaron a 4.400 G a 4°C durante cinco minutos. El sobrenadante (sobrenadante A) y las células se recogieron por separado. Se añadió PBS que contenía Tween20 al 0,1 % a las células, y la suspensión se sonicó en hielo durante 30 segundos para romper la membrana celular. Después de la centrifugación a 4.400 x g a 4°C durante cinco minutos, se recogió el sobrenadante resultante (sobrenadante B). Los sobrenadantes A y B se combinaron juntos y se cargaron en una columna HiTrap GST FF (5 ml, GE Healthcare) cuyo regulador había sido reemplazado con 30 ml de PBS por adelantado. Después de la carga, la columna se lavó con 100 ml de PBS y la proteína adsorbida se eluyó con regulador de fosfato 20 mM (pH 8) que contenía glutatión reducido. La actividad quimiotáctica de S100A8 recombinante y S100A9 para células madre mesenquimales de médula ósea se evaluó usando la cámara de Boyden. Las muestras se prepararon disolviendo proteína S100A8 o S100A9 purificada a 0,1 ng/μl en DMEM, o diluyendo el extracto de piel de ratones de dos días con cuatro volúmenes de DMEM, y se añadieron al compartimento inferior de la cámara de Boyden. Un control negativo preparado como sigue se usó de la misma manera: la proteína se extrajo de células transfectadas con un vector de control que no porta el ADNc de S100A8 o S100A9 como un inserto; y luego se eluyó una fracción de una columna HiTrap GST FF. Después de que se añadió una muestra al compartimento inferior, se colocó una membrana de policarbonato con microporos de 8 μm en la parte superior. Luego, la unidad superior (un volumen de 50 μl) de la cámara de Boyden se puso en contacto con la membrana y se añadió una suspensión de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (5 x 10⁴ células/50 ml de medio de cultivo (DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal)) a la cámara superior. La cámara se incubó en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 4 a 24 horas. Después de la incubación, se removió la unidad superior de la cámara. La película delgada de silicona se separó y el número de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea que migraron al compartimento inferior a través de los microporos se determinó cuantitativamente mediante tinción de las células (Fig. 23).

(7) Se inyectaron ratones machos de ocho semanas con 250 μl de las proteínas recombinantes GST-S100A8 o S100A9 purificadas anteriormente descritas (1 ng/μl) a través de la vena caudal. 12 horas después de la inyección, se recogió 1 ml de sangre periférica de los corazones de los ratones bajo anestesia por inhalación con isoflurano usando una jeringa recubierta con heparina de 1 ml. Las muestras de sangre se combinaron cada una con 3 ml de PBS y luego se cubrieron suavemente con 3 ml de Ficoll (GE Healthcare). Las muestras resultantes se centrifugaron usando una centrífuga a 400 x g a 25°C durante 40 minutos. Las células en la capa intermedia opaca se recogieron como una fracción de células mononucleares. Se añadió 1 ml de solución de HLB (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.), un agente hemolítico, a las células recogidas, y las células se incubaron a temperatura ambiente durante cinco minutos. Este tratamiento hemolítico se repitió dos veces. Después de añadir 10 ml de PBS, las células se centrifugaron a 440 x g a 25°C durante cinco minutos. Los sobrenadantes resultantes se eliminaron, y las células se recogieron. Se incubaron 1.000.000 de células a temperatura ambiente durante 20 minutos con un anticuerpo anti-PDGFR α de ratón marcado con PE (e-Bioscience), anticuerpo anti-PDGFR β de ratón marcado con PE (e-Bioscience), anticuerpo anti-CD45 de ratón marcado con FITC (BD Biosciences), y anticuerpo anti-CD44 de ratón marcado con PerCy5 (BD Biosciences), cada uno diluido 100 veces con PBS. Luego, las células se centrifugaron a 440 x g a 25°C durante cinco minutos. Los sobrenadantes fueron eliminados. Se añadieron 400 μl de PBS que contenía paraformaldehído al 1 % a las células para preparar muestras para el análisis por citometría de flujo. Los anticuerpos se usaron en las siguientes combinaciones:

(I) PDGFR α /CD45/CD44

(II) PDGF β /CD45/CD44

La relación de células que expresan PDGFR α (o β) y CD44 con relación a células que eran débilmente positivas o negativas para CD45 se determinó con base en el resultado del análisis (Figuras 24A y B).

Resultados: Se evaluaron muestras de piel extirpadas de ratones de dos días y seis semanas para la actividad de movilización de células madre mesenquimales de médula ósea. La actividad del extracto de piel de ratones de dos días demostró ser más fuerte que la del extracto de piel de un ratón de seis semanas. La expresión fuerte de S100A9 en la piel de ratones de dos días se encontró mediante análisis de microarreglos de ADN. Muestras crudas de extractos de piel purificados en una columna de heparina exhibieron correlación entre la actividad de migración de células madre mesenquimales y los contenidos de S100A9 y S100A8. Se construyeron vectores de expresión para estas proteínas, y las proteínas recombinantes se produjeron usando HEK293 y se purificaron. La actividad de migración de las células madre mesenquimales de médula ósea se confirmó en las muestras de S100A8 y S100A9 purificadas mediante ensayos usando la cámara de Boyden. Además, cuando se administraron por vía intravenosa a ratones, las proteínas también exhibieron actividad de movilizar una población de células doblemente positivas para PDGFR α y CD44 para sangre periférica (figura 24).

Discusión: Los presentes inventores descubrieron por primera vez en el mundo en la presente invención que las piezas de piel libres producen S100A8 y S100A9, y las proteínas S100A8 y S100A9 producidas tenían fuertes

actividades de movilización de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. Mientras tanto, las células madre mesenquimales de médula ósea se conocen como células madre pluripotentes que se diferencian en tejidos óseos, tejidos adiposos, tejidos cartilagosos, fibroblastos y similares. Recientemente, se ha indicado que las células derivadas de la médula ósea también incluyen células madre pluripotentes que se diferencian en tejidos tales como músculo cardíaco, células nerviosas y células epidérmicas. Dado que la presente invención demuestra que las células epidérmicas, células del folículo piloso, fibroblastos de tejidos subcutáneos y similares en la piel injertada están constituidas por células derivadas de médula ósea, se puede especular que S100A8 y S100A9 son responsables de movilizar células madre de tejido derivado de médula ósea al injerto de piel para inducir la reparación funcional de los tejidos dañados. Incluso mediante inyección intravenosa, S100A8 y S100A9 pueden movilizar células madre mesenquimales de médula ósea a la sangre periférica. Por lo tanto, S100A8 y S100A9 también pueden administrarse a través de la circulación periférica a tejidos ubicados en el interior del cuerpo donde la administración local es difícil (cerebro, corazón, médula espinal, etc.). Los presentes inventores creen que efectos tales como acortar el tiempo de cicatrización, regeneración funcional de tejidos dañados, y otros, pueden esperarse en el proceso de cicatrización no solo de tejidos de piel dañados sino también de varios tejidos dañados tales como cerebro, músculo y hueso usando la presente invención en productos farmacéuticos, que permite la movilización local de las células madre de tejido derivadas de médula ósea, incluidas las células madre mesenquimales en la regeneración de tejidos dañados.

Ejemplo de referencia 6

Propósito: Evaluar el efecto terapéutico de S100A8 en la úlcera cutánea en ratones normales y diabéticos

Procedimientos: Se administró proteína S100A8 recombinante a ratones modelo de úlcera cutánea para evaluar su efecto terapéutico sobre la úlcera. Los ratones de prueba utilizados fueron: ratones C57/B16 trasplantados con células de médula ósea que expresan GFP, y BKS.Cg-m +/- Leprdb/J (ratones db), que son ratones modelo de diabetes. Se formaron úlceras cutáneas con un diámetro de 6 mm en la piel de los ratones. Cuando se forma úlcera cutánea en ratones, la piel circundante cercana al defecto de la piel se contrae rápidamente. En este experimento, crear un modelo terapéutico para defectos de la piel, en el que el defecto de la piel no se trata mediante contracción sino cubriéndolo con piel regenerada, se fijó un disco de goma de silicona con un diámetro exterior de 10 mm, diámetro interno de 6 mm y espesor de 0,5 mm en el sitio del defecto de la piel a la piel que rodea la úlcera usando un agente adhesivo para cirugía de piel (Aron alpha A) y sutura de nylon para preparar un modelo para tratar el defecto cutáneo cubriéndolo con piel regenerada, no por contracción de la piel. Luego, la proteína recombinante S100A8 se administró directamente a la superficie de la úlcera a razón de 1,5 µg/día todos los días durante siete días. Además, la superficie de la úlcera se protegió con película Tegaderm (3M) para prevenir la desecación de la superficie de la úlcera. El área de la superficie de la úlcera se midió a lo largo del tiempo para evaluar el efecto terapéutico.

Resultados y discusión: en ratones normales, el área superficial de la úlcera se redujo significativamente en el grupo tratado con S100A8 siete días después del inicio del tratamiento en comparación con el grupo de control (Fig. 25). Además, en ratones con diabetes, el área superficial de la úlcera también se redujo significativamente en el grupo tratado con S100A8 siete días después del comienzo del tratamiento en comparación con el grupo control (Fig. 26). En otras palabras, se observó un efecto reductor significativo de la úlcera cutánea en ratones normales y diabéticos. A partir de este resultado, se confirma que S100A8 tiene efecto terapéutico sobre la úlcera cutánea no solo en ratones normales sino también en ratones con diabetes.

Ejemplo de referencia 7

Propósito: Movilización de células madre de tejido de médula ósea a sangre periférica utilizando factores inductores de células madre de tejido derivado de médula ósea en extracto de tejido de piel

Procedimientos: Para lograr el objetivo anterior, se realizó un estudio mediante el procedimiento descrito a continuación.

(1) Preparación de inductor de células madre de tejido derivado de médula ósea. Se sumergieron piezas de piel libres aisladas de 25 ratones neonatales (dos días de edad) en 25 ml de solución salina regulada con fosfato (PBS), pH 7,4. Después de 24 horas de incubación a 4°C, la muestra se centrifugó a 440 G a 4°C durante diez minutos para eliminar el tejido. El sobrenadante se recogió como extracto de piel (SE).

Mientras tanto, se extrajo el ARN de la piel de ratones neonatales C57/B16 usando Trizol (Invitrogen), y luego se sintetizó el ADNc usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript III (Invitrogen). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo usando este ADNc como molde para amplificar el ADNc de HMGB1. El ADNc de HMGB1 se insertó en un vector plásmido de expresión de proteína de célula de mamífero, pCAGGS, para expresar una proteína en la que se adjunta una secuencia de etiqueta Flag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Lys, SEQ ID NO: 30) al extremo terminal N de su secuencia de aminoácidos (Fig. 32). El vector plasmídico se transfirió en HEK293 (línea celular cultivada derivada de células de riñón fetal humano). Las células se cultivaron durante 48 horas para expresar la proteína. Cada muestra de células que expresan la proteína HMGB1 y el sobrenadante del cultivo se

incubaron a 4°C durante 16 horas, y luego se centrifugó a 4.400 x g durante cinco minutos. El sobrenadante se recogió, y se añadió al mismo gel de anticuerpo anti-Flag (Sigma) en una cantidad de 100 µl por 50 ml del sobrenadante. La mezcla se incubó a 4°C durante 16 horas. El gel se recogió por centrifugación, seguido de cinco lavados con PBS. Luego, el gel se eluyó con péptido Flag 3x (100 µg/ml final). La concentración de la proteína eluida se determinó usando el kit ELISA para HMGB1 (Shino-Test Co.). Después de la liofilización, la concentración de proteína se ajustó a 200 µg/ml con PBS.

(2) A ratones machos de ocho semanas (C57/B16) se les administró 500 µl del extracto de piel (SE) descrito anteriormente, o 500 µl de PBS como un grupo de control negativo, a través de la vena caudal usando jeringas con una aguja de inyección 30G 1/2 (Fig. 33). Seis, 12, 24 y 48 horas después de la administración, se recogió 1 ml de sangre periférica de los corazones de los ratones bajo anestesia por inhalación con isofluorano usando una jeringa de 1 ml recubierta con heparina. Las muestras de sangre se combinaron con 3 ml de PBS y luego se cubrieron suavemente con 3 ml de Ficoll (GE Healthcare). Las muestras resultantes se centrifugaron utilizando una centrífuga a 400 x g a 25°C durante 40 minutos. Las células en la capa intermedia opaca se recogieron como una fracción de células mononucleares. Se añadió 1 ml de solución de HLB (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.), un agente hemolítico, a las células recogidas. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante cinco minutos. Este tratamiento hemolítico se repitió dos veces. Después de añadir 10 ml de PBS, las células se centrifugaron a 440 x g a 25°C durante cinco minutos. Los sobrenadantes se eliminaron y las células se recogieron. Se incubaron 1.000.000 de células a temperatura ambiente durante 20 minutos con anticuerpos diluidos cada uno 100 veces con PBS, incluido un anticuerpo anti-PDGFR α de ratón marcado con PE (e-Bioscience), anticuerpo anti-PDGFR β de ratón marcado con PE (e-Bioscience) y Anticuerpo anti-CD44 de ratón marcado con PerCy5 (BD Biosciences). Después de la incubación, las células se centrifugaron a 440 x g a 25°C durante cinco minutos. El sobrenadante fue eliminado. Se añadieron 400 µl de PBS que contenía paraformaldehído al 1 % a las células para preparar una muestra para el análisis citométrico de flujo.

A ratones machos de ocho semanas (C57/B16) se les administró 250 µl de HMGB1 de ratón (1 µg/µl), o 250 µl de PBS como grupo de control negativo, a través de la vena caudal usando jeringas unidas con una aguja de inyección 30G 1/2 (Fig. 35). 12 horas después de la administración, se recogió 1 ml de sangre periférica de los corazones de los ratones bajo anestesia por inhalación con isofluorano usando una jeringa de 1 ml recubierta con heparina. Las muestras de sangre se combinaron con 3 ml de PBS y luego se cubrieron suavemente con 3 ml de Ficoll (GE Healthcare). Las muestras resultantes se centrifugaron en una centrífuga a 400 x g a 25°C durante 40 minutos. Las células en la capa intermedia opaca se recogieron como una fracción de células mononucleares. Se añadió 1 ml de solución de HLB (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.), un agente hemolítico, a las células recogidas. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante cinco minutos. Este tratamiento hemolítico se repitió dos veces. Después de añadir 10 ml de PBS, las células se centrifugaron a 440 x g a 25°C durante cinco minutos. Los sobrenadantes se eliminaron y las células se recogieron. Se incubaron 1.000.000 de células a temperatura ambiente durante 20 minutos con anticuerpos diluidos cada uno 100 veces con PBS, incluido un anticuerpo anti-PDGFR α de ratón marcado con PE (e-Bioscience) y anticuerpo anti-CD44 de ratón marcado con PerCy5 (BD Biosciences). Después de la incubación, las células se centrifugaron a 440 x g a 25°C durante cinco minutos. El sobrenadante fue eliminado. Se añadieron 400 µl de PBS que contenía paraformaldehído al 1 % a las células para preparar una muestra para el análisis citométrico de flujo.

Resultados: se demostró que las células doblemente positivas para PDGFR α y CD44 se movilizaban significativamente a la sangre periférica 12 horas después de la inyección del extracto de piel (SE) (Fig. 34). Además, se demostró que las células doblemente positivas para PDGFR α y CD44 se movilizaban significativamente a la sangre periférica 12 horas después de la inyección de HMGB1 (Fig. 36).

Ejemplo de referencia 8

Propósito: Comprobar si las células madre mesenquimales se movilizan a la sangre periférica mediante la administración intravenosa de la proteína HMGB1 recombinante.

Procedimientos: Se les administró a ratones C57/BL6 (de ocho a diez semanas de edad, machos) 400 µl de solución salina fisiológica que contenía 100 µg/ml de proteína recombinante HMGB1 (40 µg de HMGB1) o 400 µl de solución salina fisiológica sola a través de la vena caudal. Después de 12 horas, se recogió sangre periférica de los ratones. Las muestras de sangre se diluyeron con PBS hasta un volumen total de 4 ml. Las muestras de sangre diluida se superpusieron a 3 ml de Ficoll-Paque Plus (GE) colocadas en tubos de centrífuga. Las muestras se centrifugaron a 100 G a 18°C durante diez minutos. La capa intermedia que contenía células mononucleares se transfirió a un tubo de centrífuga nuevo, y se añadieron 45 ml de PBS al mismo. El tubo se centrifugó a 440 G a 18°C durante cinco minutos. El sobrenadante fue eliminado. De nuevo, se añadieron 45 ml de PBS y el tubo se centrifugó a 440 G a 18°C durante cinco minutos. El sobrenadante fue eliminado. Las células mononucleares preparadas se incubaron con anticuerpo anti-PDGFR α de ratón marcado con Ficoeritrobilina (PE) y anticuerpo anti-CD44 de ratón marcado con Aloficocianina (APC). Luego, se evaluó la abundancia de células doblemente positivas para PDGFR α y CD44 en la fracción de células mononucleares mediante citometría de flujo (Facsan; Becton, Dickinson and Company).

Resultados: se demostró que las células doblemente positivas para PDGFR α y CD44, y negativas para CD44 y positivas para PDGFR α en la fracción de células mononucleares de sangre periférica se incrementaron significativamente 12 horas después de la administración de HMGB1 (Fig. 37). Específicamente, se demostró que HMGB1 tiene la actividad de movilizar células positivas para PDGFR α a la sangre periférica de la médula ósea. PDGFR α se conoce como un marcador de células madre mesenquimales.

Discusión: PDGFR α y CD44 son conocidos como marcadores de superficie de células madre mesenquimales de médula ósea, que son representativas de células madre pluripotentes derivadas de médula ósea. Las células madre mesenquimales de médula ósea son células madre pluripotentes capaces de diferenciarse en células nerviosas, células epiteliales, o también como osteocitos, condrocitos y adipocitos. Mientras tanto, las piezas de piel usadas en este experimento están en una condición isquémica. Por lo tanto, los tejidos se necrosan gradualmente y las proteínas intracelulares, tales como las proteínas nucleares, así como las proteínas de la superficie celular se liberan al exterior. HMGB1 es una proteína contenida en el extracto de la piel. En injertos de piel o similares, tales proteínas sirven como una señal para movilizar células madre de tejido derivadas de médula ósea en la piel injertada. Por lo tanto, se especula que la regeneración funcional de la piel se logra en el injerto de piel debido a la reconstitución de la epidermis, la hipodermis, los tejidos foliculares, o los derivados de las células de la médula ósea. Con base en este experimento, la presente invención, por primera vez, descubrió con éxito que las células madre de tejido derivadas de médula ósea se movilizan en la circulación sanguínea periférica por administración intravenosa de HMGB1 o extracto de piel como se describió anteriormente. Este descubrimiento permite nuevos procedimientos terapéuticos para tratar enfermedades intratables con daños tisulares tales como infarto cerebral, infarto de miocardio, fractura ósea y úlcera cutánea, que se basan en la movilización de células madre pluripotentes derivadas de médula ósea hacia la sangre periférica. Además, las células movilizadas a la sangre periférica se pueden recolectar de la misma manera que el procedimiento convencional para la extracción de sangre. Por lo tanto, la presente invención permite procedimientos más simples y seguros de recolección de células madre de tejido derivadas de médula ósea en comparación con el procedimiento convencional para tratar el infarto cerebral en el que se recogen células de la médula ósea.

Aplicabilidad industrial

La presente invención permite la recolección de células biológicamente funcionales de una manera mínimamente invasiva, que era difícil previamente. Se puede esperar que esto promueva estudios básicos usando células biológicamente funcionales, así como medicina de regeneración usando las células recolectadas. Por lo tanto, se espera que la presente invención sea una técnica innovadora que proporciona a los pacientes que padecen enfermedades intratables un nuevo tipo de remedio. Además, los recipientes a implantar en el cuerpo sirven como una semilla para el desarrollo de nuevos materiales médicos, y por lo tanto se espera que contribuyan al desarrollo industrial en este campo.

Listado de secuencias

<110> GENOMIX CO., LTD.
OSAKA UNIVERSITY

<120> Desarrollo de dispositivos médicos para aislamiento eficiente y selectivo de células funcionales *in vivo*.

<130> G6-A0802P

<150> JP 2008-119355

<151> 2008-04-30

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 654 542 T3

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

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

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

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

5 <210> 2

<211> 648

ES 2 654 542 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 2

```

atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatatgc attttttgtg      60
caaacttgtc gggaggagca taagaagaag cacccagatg cttcagtcaa cttctcagag      120
ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaatth      180
gaagatatgg caaaagcggg caaggcccggt tatgaaagag aatgaaaac ctatatccct      240
cccaaagggg agacaaaaaa gaagttcaag gatcccaatg cacccaagag gcctccttcg      300
gccttcttcc tcttctgctc tgagtatcgc ccaaaaatca aaggagaaca tcctggcctg      360
tccattggtg atggtgcgaa gaaactggga gagatgtgga ataacactgc tgcagatgac      420
aagcagcctt atgaaaagaa ggctgcgaag ctgaaggaaa aatacgaaaa ggatattgct      480
gcatatcgag ctaaaggaaa gcctgatgca gcaaaaaagg gagttgtcaa ggctgaaaaa      540
agcaagaaaa agaaggaaga ggaggaagat gaggaagatg aagaggatga ggaggaggag      600
gaagatgaag aagatgaaga tgaagaagaa gatgatgatg atgaataa      648

```

<210> 3

10

<211> 215

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<400> 3

```

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

```

20

ES 2 654 542 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
 <213> Mus musculus

<400> 4

atgggcaaag gagatcctaa aaagccgaga ggcaaaatgt cctcatatgc attctttgtg 60
 caaacttgcc gggaggagca caagaagaag caccgcatg cttctgtcaa cttctcagag 120
 ttctccaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagaaaa ggggaaattt 180

ES 2 654 542 T3

```

gaagatatgg caaaggctga caaggctcgt tatgaaagag aaatgaaaac ctacatcccc      240
cccaaagggg agaccaaaaa gaagttcaag gaccccaatg cacccaagag gcctccttcg      300
gccttcttct tgttctgttc tgagtaccgc cccaaaatca aaggcgagca tcttggettta    360
tccattggtg atggtgcaaa gaaactagga gagatgtgga acaacactgc agcagatgac      420
aagcagccct atgagaagaa agctgccaaag ctgaaggaga agtatgagaa ggatattgct      480
gcctacagag ctaaaggaaa acctgatgca gcgaaaaagg ggtgggtcaa ggctgaaaag      540
agcaagaaaa agaaggaaga ggaagatgat gaggaggatg aagaggatga ggaagaggag      600
gaagaagagg aagacgaaga tgaagaagaa gatgatgatg atgaataa                    648

```

<210> 5

5 <211> 215

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

10

<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

```

ES 2 654 542 T3

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 Glu Asp Glu Asp Glu
 195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210> 6

5 <211> 648

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

10

<400> 6

```

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

15 <210> 7

<211> 209

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 654 542 T3

<400> 8

```
atgggtaaag gagaccccaa caagccgagg ggcaaaatgt cctcgtacgc cttcttcgtg      60
cagacctgcc gggaagagca caagaagaaa caccggact cttccgtcaa tttcgcggaa      120
ttctccaaga agtgttcgga gagatggaag accatgtctg caaaggagaa gtcgaagttt      180
gaagatatgg caaaaagtga caaagctcgc tatgacaggg agatgaaaaa ttacgttcct      240
cccaaagggtg ataagaaggg gaagaaaaag gacccaatg ctcctaaaag gccaccatct      300
gccttcttcc tgttttgctc tgaacatcgc ccaaagatca aaagtgaaca ccctggccta      360
tccattgggg atactgcaaa gaaattgggt gaaatgtggt ctgagcagtc agccaaagat      420
aaacaacat atgaacagaa agcagctaag ctaaaggaga aatatgaaaa ggatattgct      480
gcatatcgtg ccaagggcaa aagtgaagca ggaaagaagg gccctggcag gccaacaggc      540
tcaaagaaga agaacgaacc agaagatgag gaggaggagg aggaagaaga agatgaagat      600
5   gaggaggaag aggatgaaga tgaagaataa      630
```

<210> 9

<211> 210

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 9

ES 2 654 542 T3

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

Glu Glu
 210

5 <210> 10

<211> 633

<212> ADN

10

<213> Mus musculus

ES 2 654 542 T3

<400> 10

```
atgggcaagg gtgaccccaa caagccgcgg ggcaaaatgt cctcgtacgc cttcttcgtg      60
cagacctgcc gcgaggagca caagaagaag catccccgact 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
gcataccgtg ccaagggcaa aagtgaagca ggaaagaagg gtcctggtag gccaacaggc    540
tcaaagaaga agaacgaacc agaagatgag gaggaggaag aagaggagga agaggaggaa    600
gatgacgagg aagaagagga ggatgaagaa taa                                     633
```

5 <210> 11

<211> 210

<212> PRT

10

<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
15
```

ES 2 654 542 T3

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 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 Glu Asp Glu Asp
 195 200 205

Glu Glu
 210

<210> 12

5 <211> 633

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

10

ES 2 654 542 T3

<400> 12

	atgggcaagg gggaccccaa caagccgcgg 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
	cccaaaggtg ataagaaagg aaagaaaaaa gatccaaatg ctcccaagag accaccgtct	300
	gccttcttcc tgttttgctc tgaacatcgc ccaaagatca aaagtgaaca ccccggcctg	360
	tctattggag atactgcaaa gaaactgggg gagatgtggg ctgagcaatc tgccaaagat	420
	aaacaaccgt atgagcagaa agcagctaaa ctaaaggaga agtatgaaaa ggatattgct	480
	gcataccgtg ccaagggcaa aagtgaagta ggaaagaagg gtcctggtag gccaacaggc	540
	tcaaagaaga agaatgaacc agaagatgag gaagaggagg aggaggaaga agatgatgaa	600
5	gatgaagagg aggaagatga ggatgaagaa taa	633

<210> 13

<211> 200

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 13

ES 2 654 542 T3

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							
			180					185						190	
Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu								
		195					200								

- 5 <210> 14
- <211> 603
- <212> ADN
- 10 <213> Homo sapiens
- <400> 14

ES 2 654 542 T3

```

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

```

<210> 15

5 <211> 200

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<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

```

ES 2 654 542 T3

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

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

5 <211> 603

<212> ADN

<213> Mus musculus

10

<400> 16

atggctaaag gtgaccccaa gaaaccaaag ggcaagatgt ctgcttatgc cttctttgtg 60

cagacatgca gggaagaaca taagaagaaa aaccagagg ttcccgtaa ttttgctgag 120

ttctccaaga agtgctcgga gaggtggaag accatgtcta gcaaagagaa atcaaagttt 180

gatgaaatgg caaaggcaga taaagtccga tatgatcggg agatgaaaga ttatggacca 240

gctaaaggag gcaagaagaa gaaggacca aatgccccca aaagacctcc gtctggattt 300

ES 2 654 542 T3

```

ttcttattct gctctgaatt ccgcccgaag atcaaatcca caaaccttgg catctccatt    360
ggagatgtgg caaaaaagct gggtagatg tggaataact taagtgacaa tgaaaagcag    420
ccttatgtca ccaaggcagc aaagctgaag gagaagtatg agaaggatgt tgctgactat    480
aagtctaaag ggaagtttga tggcgccaag ggtcctgcta aagttgcccg gaaaaaggtg    540
gaagaagagg aagaggagga ggaagaggaa gaagaggagg aggaagagga ggaagatgaa    600
taa                                                                    603

```

<210> 17

5 <211> 89

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 17

```

Met Pro Ser Glu Leu Glu Lys Ala Leu Ser Asn Leu Ile Asp Val Tyr
1           5           10           15

```

```

His Asn Tyr Ser Asn Ile Gln Gly Asn His His Ala Leu Tyr Lys Asn
          20           25           30

```

```

Asp Phe Lys Lys Met Val Thr Thr Glu Cys Pro Gln Phe Val Gln Asn
          35           40           45

```

```

Ile Asn Ile Glu Asn Leu Phe Arg Glu Leu Asp Ile Asn Ser Asp Asn
          50           55           60

```

```

Ala Ile Asn Phe Glu Glu Phe Leu Ala Met Val Ile Lys Val Gly Val
65           70           75           80

```

```

Ala Ser His Lys Asp Ser His Lys Glu
          85

```

15 <210> 18

<211> 270

<212> ADN

20

<213> Mus musculus

<400> 18

ES 2 654 542 T3

atgccgtctg aactggagaa ggccttgagc aacctcattg atgtctacca caattattcc 60
 aatatacaag gaaatcacca tgcctctac aagaatgact tcaagaaaat ggtcactact 120
 gagtgcctc agtttgtgca gaatataaat atcgaaaact tgttcagaga attggacatc 180
 aatagtgaca atgcaattaa cttcgaggag ttccttgoga tggtgataaa agtgggtgtg 240
 gcatctcaca aagacagcca caaggagtag 270

<210> 19

5 <211> 89

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

10

<400> 19

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

15 <210> 20

<211> 270

<212> ADN

20

<213> Rattus norvegicus

<400> 20

atggcaactg aactggagaa ggccttgagc aacgtcattg aagtctacca caattattct 60
 ggtataaaaag ggaatcacca tgcctctac agggatgact tcaggaaaat ggtcactact 120
 gagtgcctc agtttgtgca gaataaaaat accgaaagct tgttcaaaga attggacgtc 180
 aatagtgaca acgcaattaa cttcgaagag ttccttgogt tggtgataag ggtgggcgtg 240
 gcagctcata aagacagcca caaggagtaa 270

25

<210> 21

ES 2 654 542 T3

<211> 93

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

```

Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr
1           5           10           15

His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp
20           25           30

10 Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys
35           40           45

Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly
50           55           60

Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val
65           70           75           80

Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu
85           90

```

<210> 22

15 <211> 282

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 22

```

atggtgaccg agctggagaa agccttgaac tctatcatcg acgtctacca caagtactcc      60
ctgataaagg ggaatttcca tgccgtctac agggatgacc tgaagaaatt gctagagacc      120
gagtgtcctc agtatatcag gaaaaagggg gcagacgtct ggttcaaaga gttggatatac      180
aacactgatg gtgcagttaa cttccaggag ttcctcattc tggtgataaa gatggggcgtg      240
gcagcccaca aaaaaagcca tgaagaaagc cacaaagagt ag                          282

```

25 <210> 23

<211> 113

<212> PRT

30 <213> Mus musculus

<400> 23

ES 2 654 542 T3

Met Ala Asn Lys Ala Pro Ser Gln Met Glu Arg Ser Ile Thr Thr Ile
 1 5 10 15

Ile Asp Thr Phe His Gln Tyr Ser Arg Lys Glu Gly His Pro Asp Thr
 20 25 30

Leu Ser Lys Lys Glu Phe Arg Gln Met Val Glu Ala Gln Leu Ala Thr
 35 40 45

Phe Met Lys Lys Glu Lys Arg Asn Glu Ala Leu Ile Asn Asp Ile Met
 50 55 60

Glu Asp Leu Asp Thr Asn Gln Asp Asn Gln Leu Ser Phe Glu Glu Cys
 65 70 75 80

Met Met Leu Met Ala Lys Leu Ile Phe Ala Cys His Glu Lys Leu His
 85 90 95

Glu Asn Asn Pro Arg Gly His Gly His Ser His Gly Lys Gly Cys Gly
 100 105 110

Lys

5 <210> 24

<211> 342

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 24

atggccaaca aagcaccttc tcagatggag cgcagcataa ccaccatcat cgacaccttc 60

catcaatact ctaggaagga aggacaccct gacaccctga gcaagaagga attcagacaa 120

atggtggaag cacagttggc aacctttatg aagaaagaga agagaaatga agccctcata 180

aatgacatca tggaggacct ggacacaaac caggacaatc agctgagctt tgaggagtgt 240

atgatgctga tggcaaagtt gatctttgcc tgtcatgaga agctgcatga gaacaacca 300

15 cgtgggcatg gccacagtca tggcaaaggc tgtgggaagt aa 342

<210> 25

<211> 113

20 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

25 <400> 25

ES 2 654 542 T3

```

Met Ala Ala Lys Thr Gly Ser Gln Leu Glu Arg Ser Ile Ser Thr Ile
1          5          10          15

Ile Asn Val Phe His Gln Tyr Ser Arg Lys Tyr Gly His Pro Asp Thr
20          25          30

Leu Asn Lys Ala Glu Phe Lys Glu Met Val Asn Lys Asp Leu Pro Asn
35          40          45

Phe Leu Lys Arg Glu Lys Arg Asn Glu Asn Leu Leu Arg Asp Ile Met
50          55          60

Glu Asp Leu Asp Thr Asn Gln Asp Asn Gln Leu Ser Phe Glu Glu Cys
65          70          75          80

Met Met Leu Met Gly Lys Leu Ile Phe Ala Cys His Glu Lys Leu His
85          90          95

Glu Asn Asn Pro Arg Gly His Asp His Arg His Gly Lys Gly Cys Gly
100         105         110

```

Lys

```

5 <210> 26
  <211> 342
  <212> ADN
10 <213> Rattus norvegicus
  <400> 26
    atggctgcca aacaggatc tcagctggag cgcagcataa gcaccatcat caatgttttc      60
    catcagtact ctaggaagta tggacatcct gacaccctga acaaggcgga attcaaagaa      120
    atggtgaata aggacttgcc aaatcttctg aagagggaga aaagaaatga aaatctccta      180
    agagacatca tggaggacct ggacacaaac caggacaatc aactgtcctt tgaggagtgt      240
    atgatgctga tgggaaagtt gatctttgcc tgtcatgaga agctgcatga gaacaacca      300
15  cgtgggcatg accacaggca cggcaaaggc tgtgggaagt aa                          342
  <210> 27
  <211> 116
20 <212> PRT
  <213> Homo sapiens
25 <400> 27

```

ES 2 654 542 T3

Met Thr Cys Lys Met Ser Gln Leu Glu Arg Asn Ile Glu Thr Ile Ile
 1 5 10 15

Asn Thr Pro His Glu His Gln Tyr Ser Val Lys Leu Gly His Pro Asp
 20 25 30

Thr Leu Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu Leu Val Arg Lys Asp Leu Gln
 35 40 45

Asn Phe Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu Lys Val Ile Glu His Ile
 50 55 60

Met Glu Asp Leu Asp Thr Asn Ala Asp Lys Gln Leu Ser Phe Glu Glu
 65 70 75 80

Phe Ile Met Leu Met Ala Arg Leu Thr Trp Ala Ser His Glu Lys Met
 85 90 95

His Glu Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro Gly Leu Gly
 100 105 110

Glu Gly Thr Pro
 115

5 <210> 28

<211> 345

<212> ADN

10

<213> Homo sapiens

<400> 28

atgacttgca aaatgtcgca gctggaacgc aacatagaga ccatcatcaa caccttccac 60

caataactctg tgaagctggg gcacccagac accctgaacc agggggaatt caaagagctg 120

gtgcgaaaag atctgcaaaa ttttctcaag aaggagaata agaatgaaaa ggtcatagaa 180

cacatcatgg aggacctgga cacaaatgca gacaagcagc tgagcttcga ggagttcatc 240

atgctgatgg cgaggctaac ctgggcctcc cacgagaaga tgcacgaggg tgacgagggc 300

15

cctggccacc accataagcc aggcctcggg gagggcaccc cctaa 345

<210> 29

<211> 63

20

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

ES 2 654 542 T3

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 29

atgcagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctgt gggttccagg ttccactggt 60

5 gac 63

<210> 30

<211> 7

10

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 30

20

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 31

25 <211> 220

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

35 <400> 31

ES 2 654 542 T3

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp
 210 215 220

<210> 32

5 <211> 660

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

ES 2 654 542 T3

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 32

```
atgtccccta tactaggtta ttggaaaatt aagggccttg tgcaaccac tcgacttctt      60
ttggaatatac ttgaagaaaa atatgaagag catttgtatg agcgcgatga aggtgataaa    120
tggcgaaaca aaaagtttga attgggtttg gagtttcca atcttcctta ttatattgat     180
ggtgatgtta aattaacaca gtctatggcc atcatagctt atatagctga caagcacaac    240
atgttgggtg gttgtccaaa agagcgtgca gagatttcaa tgcttgaagg agcggttttg    300
gatattagat acggtgtttc gagaattgca tatagtaaag actttgaaac tctcaaagtt    360
gattttctta gcaagctacc tgaatgctg aaaatgttcg aagatcgttt atgtcataaa    420
acatatttaa atggtgatca tgtaaccat cctgacttca tgttgatga cgctcttgat     480
gttgttttat acatggaccc aatgtgcctg gatgcgttcc caaaattagt ttgttttaa    540
aaacgtattg aagctatccc acaaattgat aagtacttga aatccagcaa gtatatagca    600
5 tggcctttgc agggctggca agccacgttt ggtggtggcg accatcctcc aaaatcggat   660
```

REIVINDICACIONES

1. Un recipiente implantable que comprende un material de uno cualquiera de (a) una proteína S100A8; (b) una proteína S100A9; y (c) ácido hialurónico para su uso en un procedimiento de (i) o (ii) a continuación:

5

(i) un procedimiento de recolección de una población de células que comprende una célula de médula ósea, dicho procedimiento comprende las etapas de:

10

(I) implantar el recipiente que contiene uno cualquiera de (a) a (c) debajo de la piel; y

(II) recolectar una población de células que comprende una célula de médula ósea del recipiente; o

15

(ii) un procedimiento de recolección de una célula de médula ósea, dicho procedimiento comprende las etapas de:

(I) implantar el recipiente que contiene uno cualquiera de (a) a (c) debajo de la piel;

(II) cosechar una población de células que comprende una célula de médula ósea del recipiente; y

20

(III) aislar una célula de médula ósea de la población de células cosechadas.

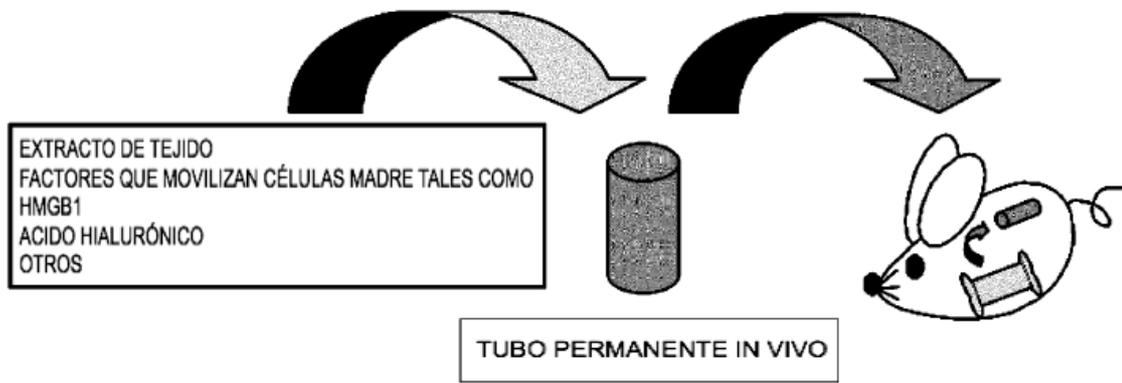


Fig. 1

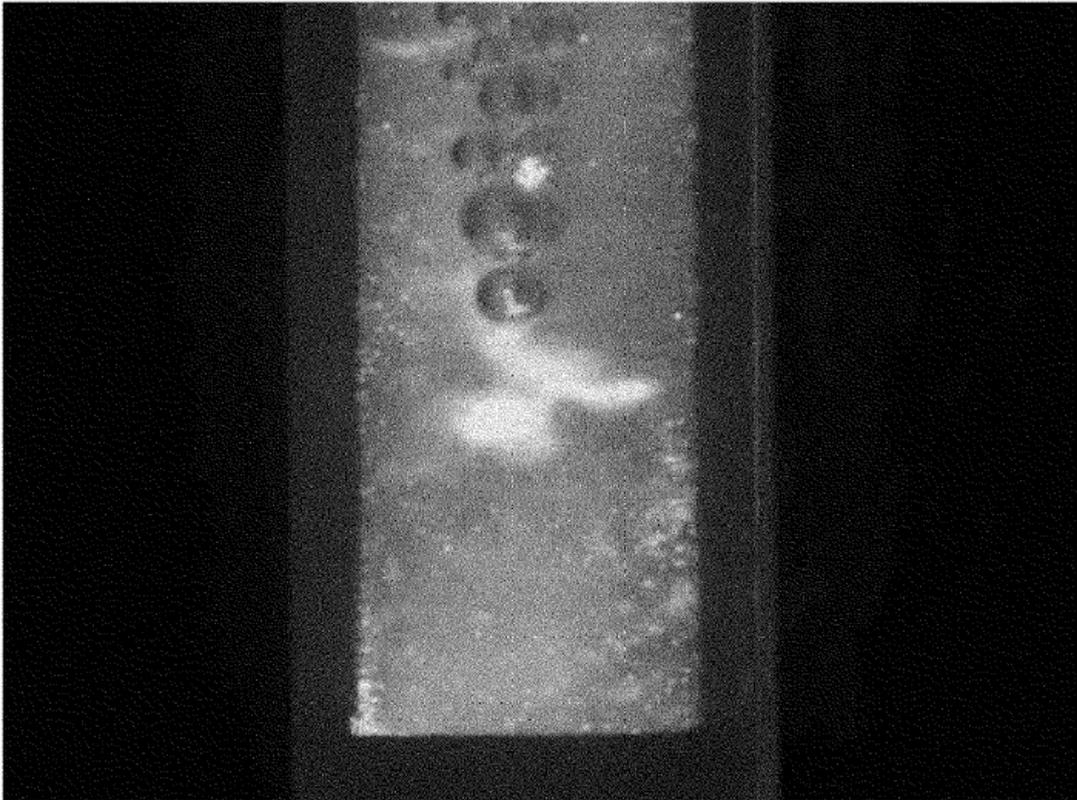


Fig. 2

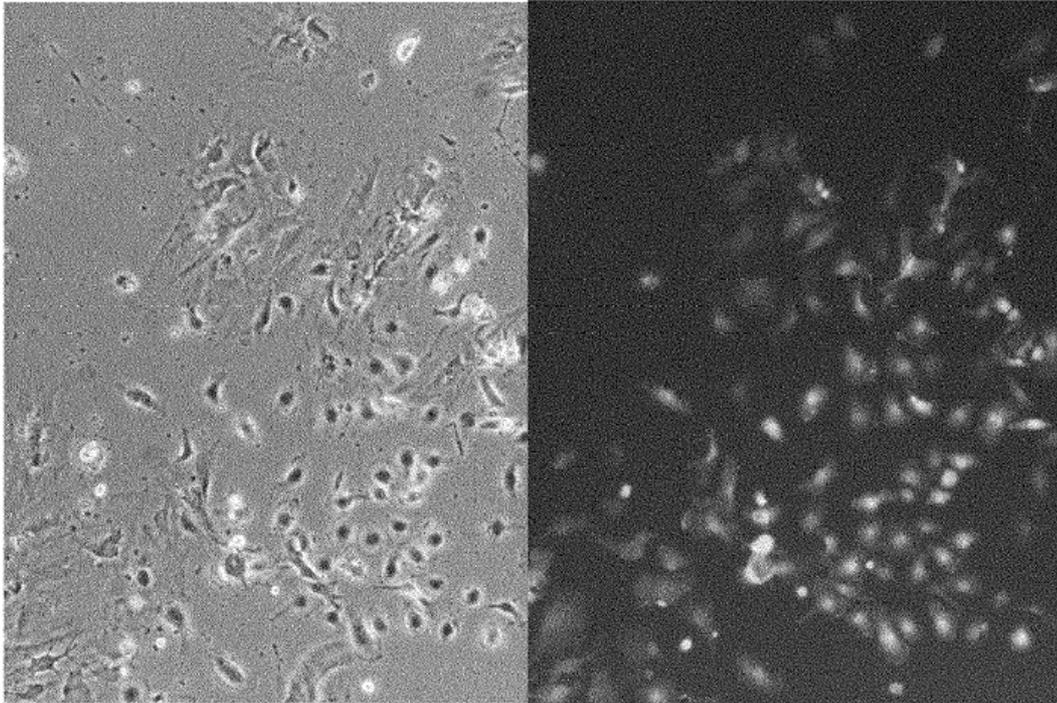
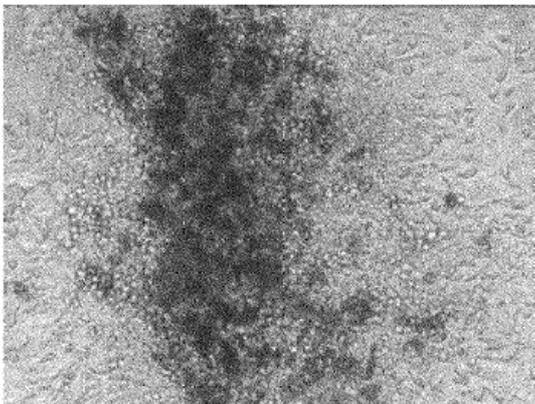


Fig. 3

MEDIO QUE INDUCE
DIFERENCIACIÓN ÓSEA



TINCIÓN CON ROJO DE ALIZARINA

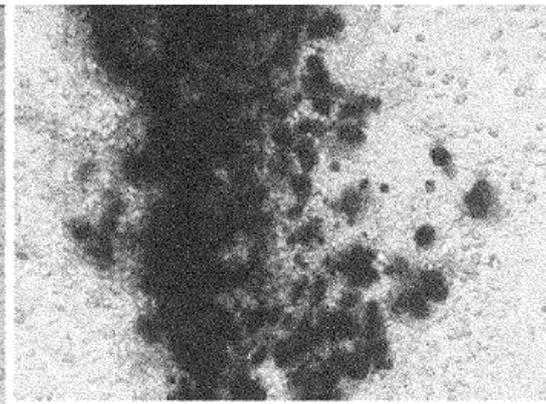


Fig. 4

MEDIO QUE INDUCE
DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS

TINCIÓN CON ROJO ACEITE

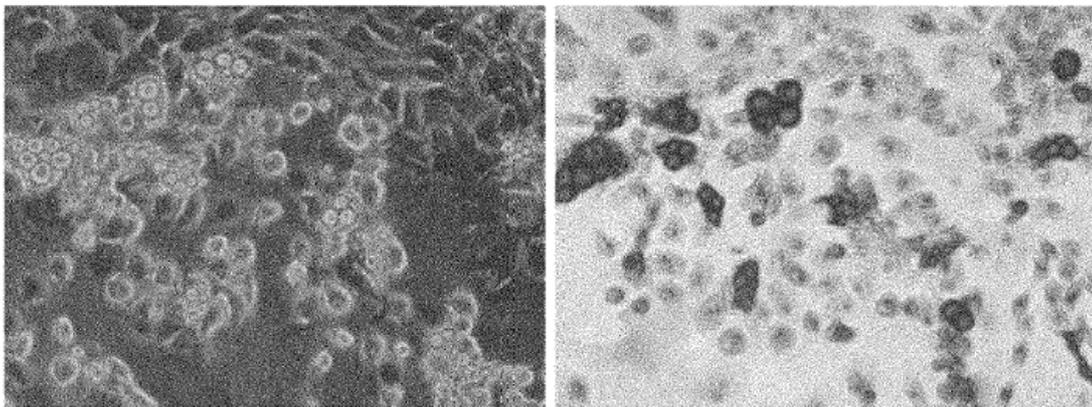


Fig. 5

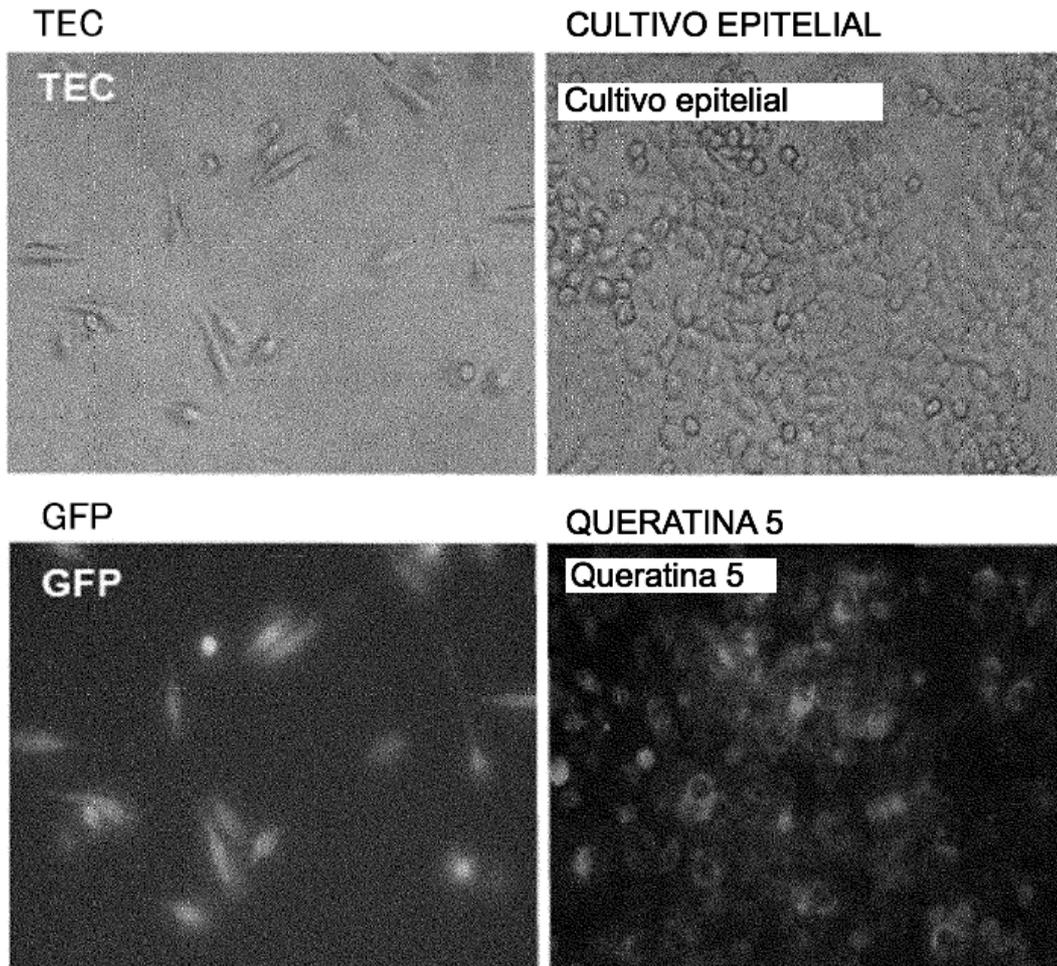


Fig. 6

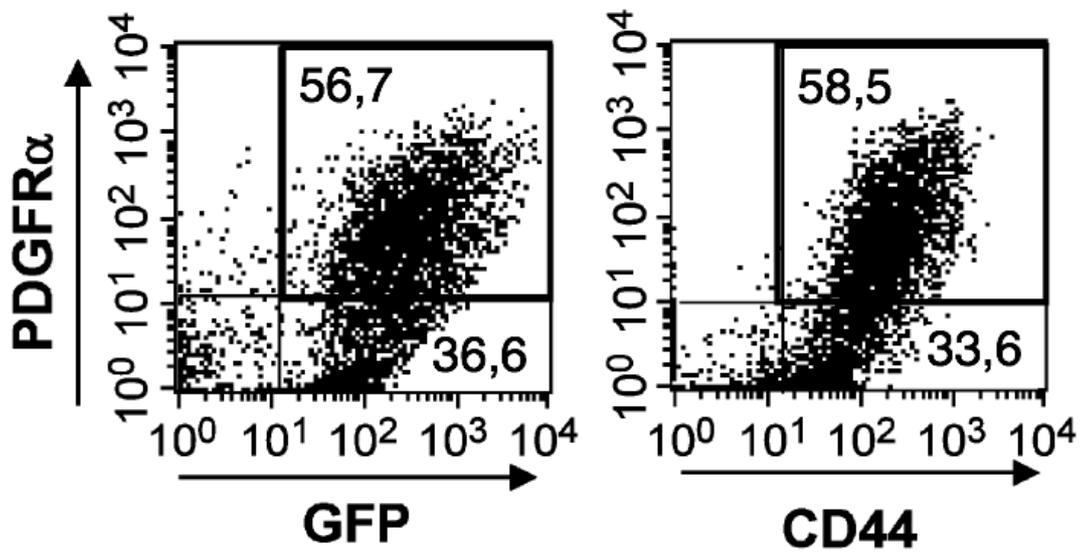


Fig. 7

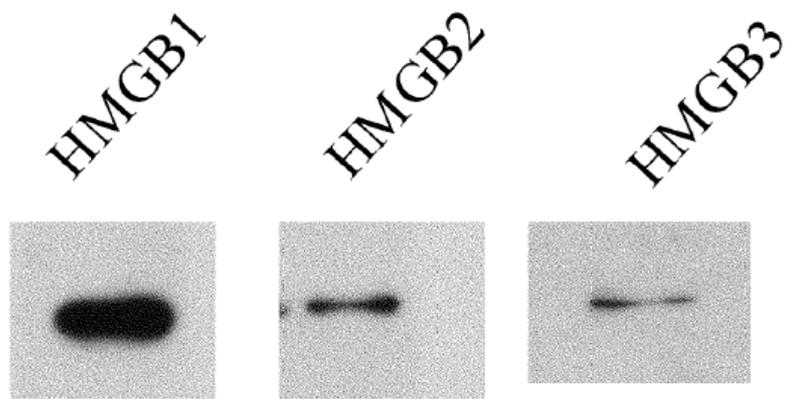


Fig. 8

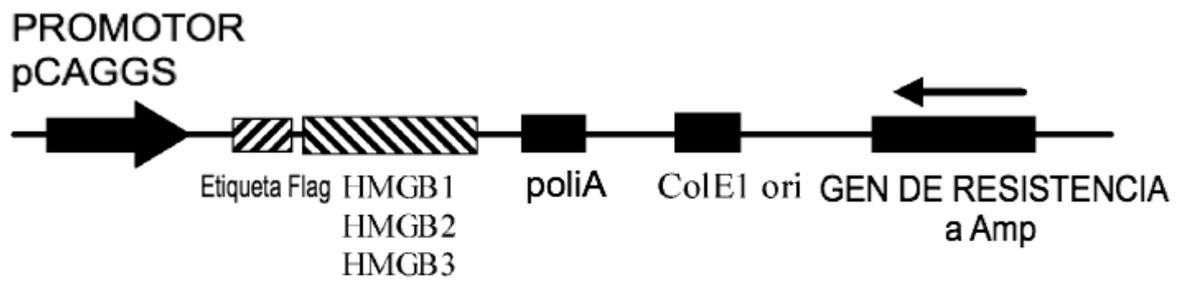


Fig. 9

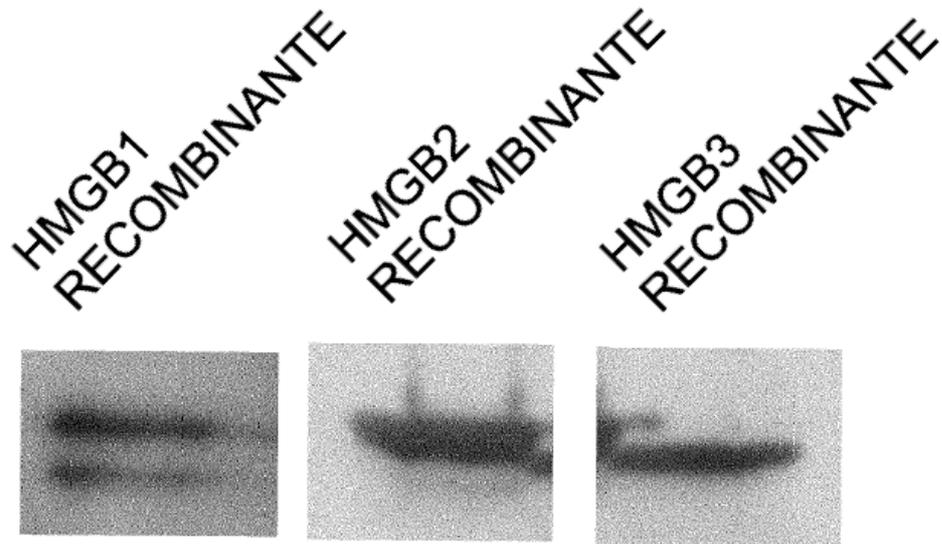


Fig. 10

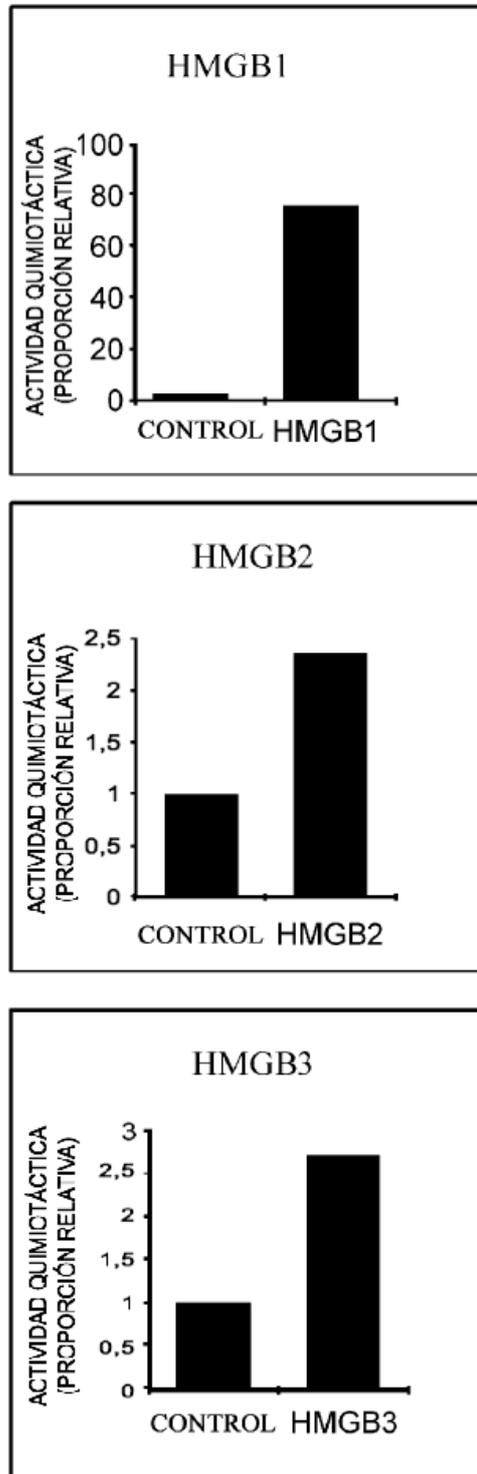


Fig. 11

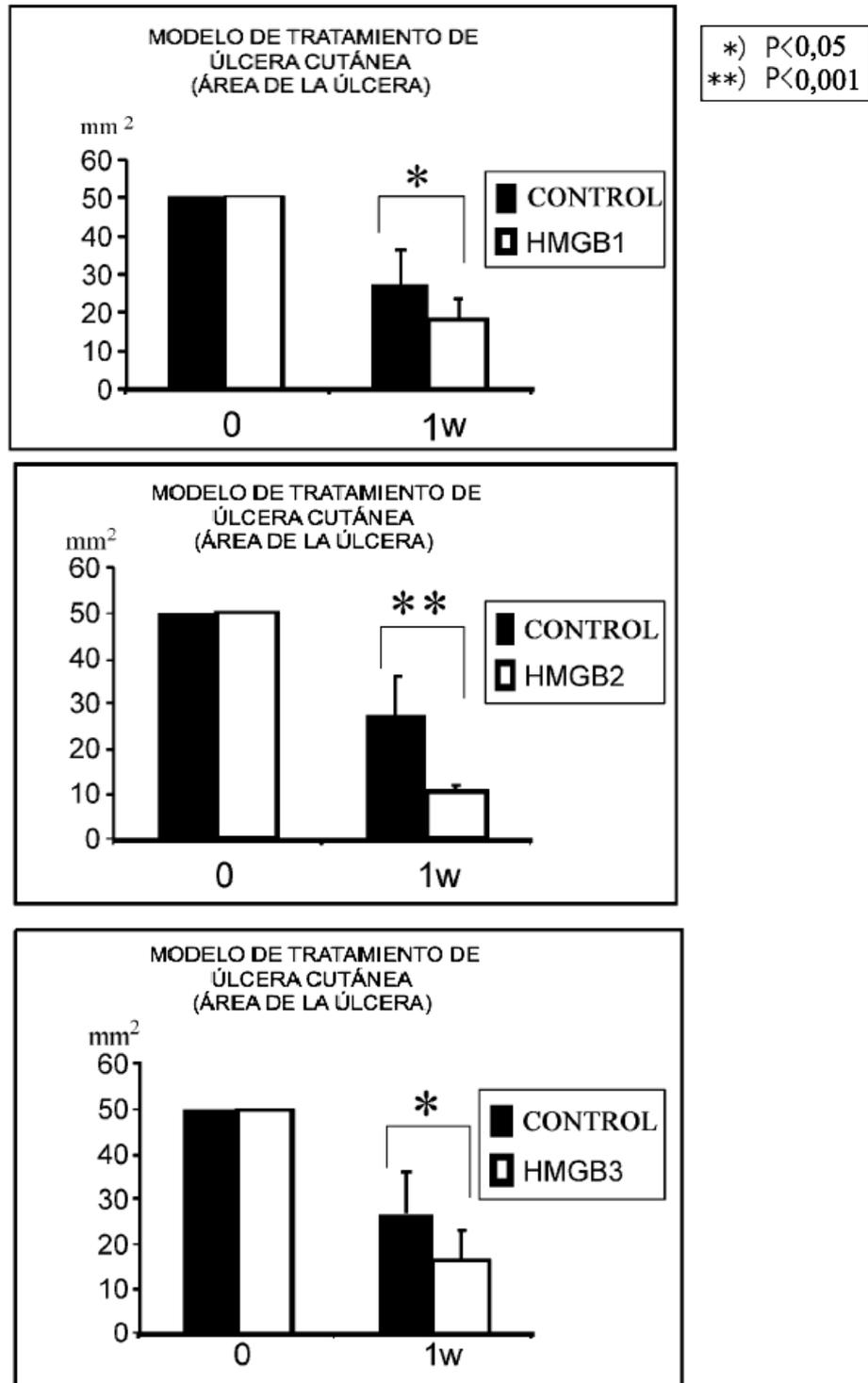


Fig. 12

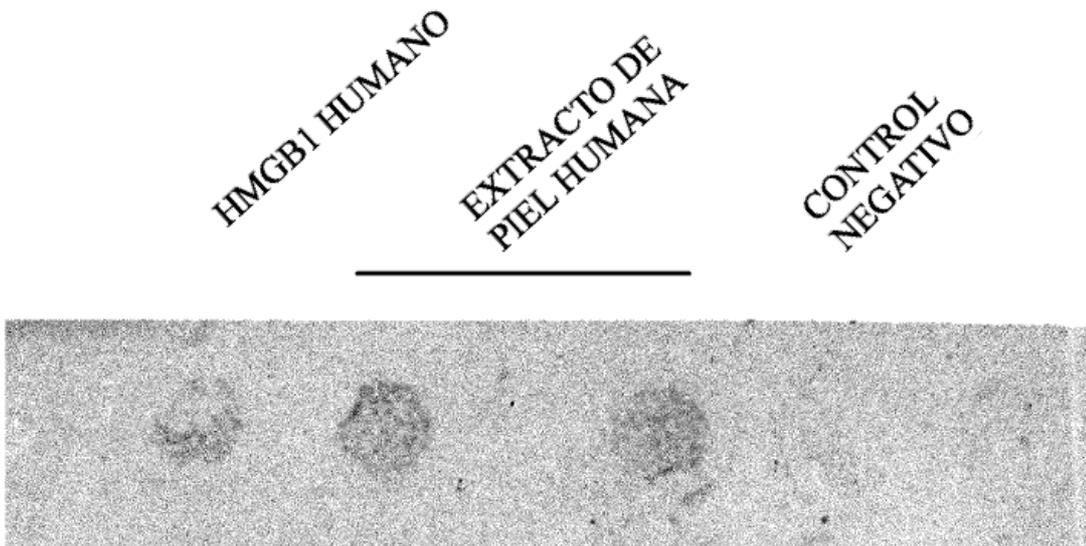


Fig. 13

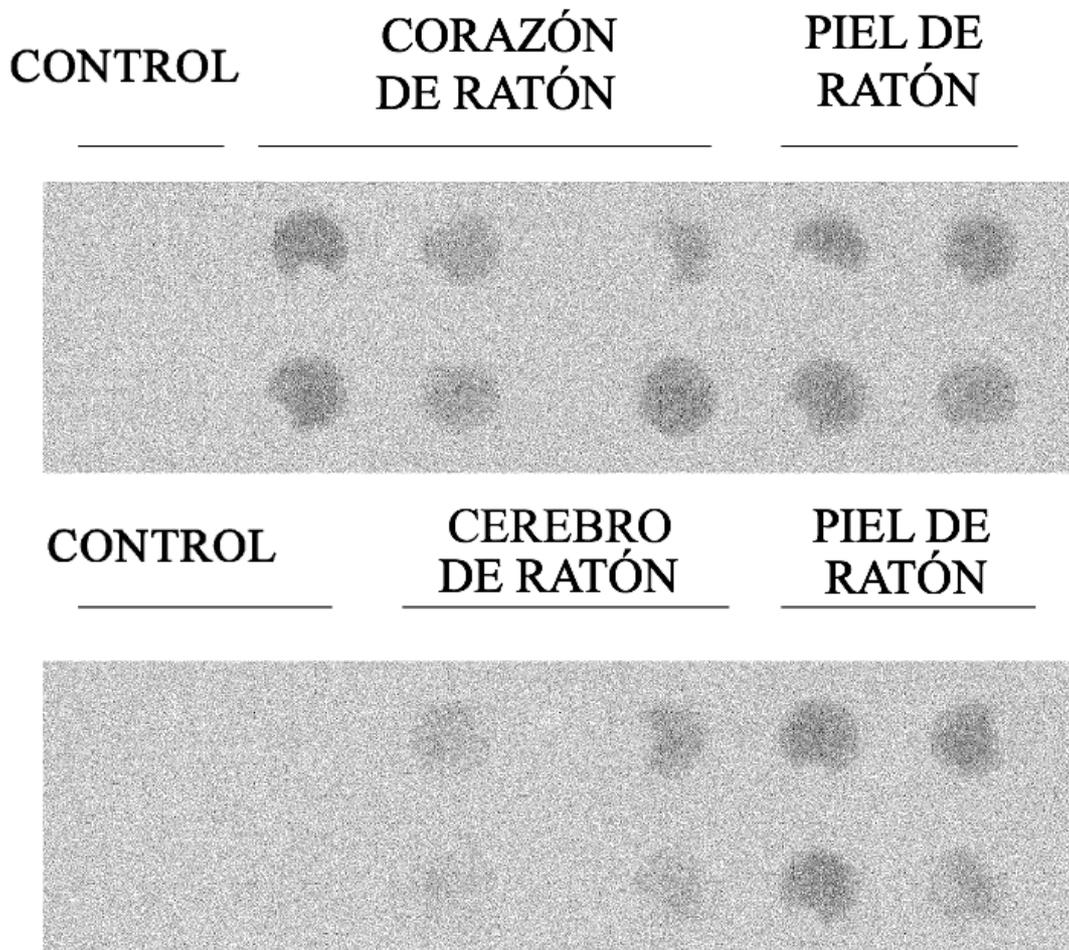


Fig. 14

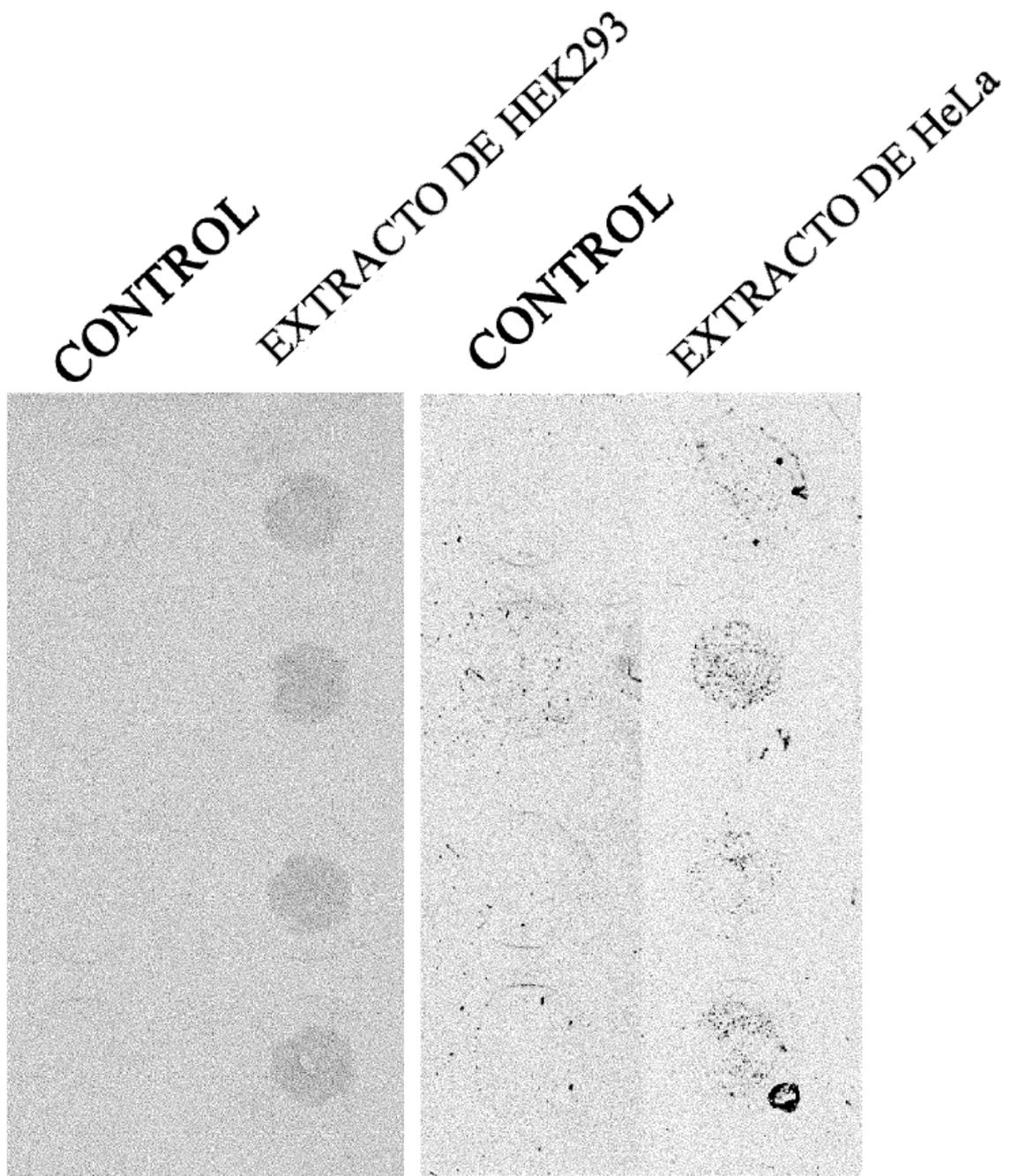


Fig. 15

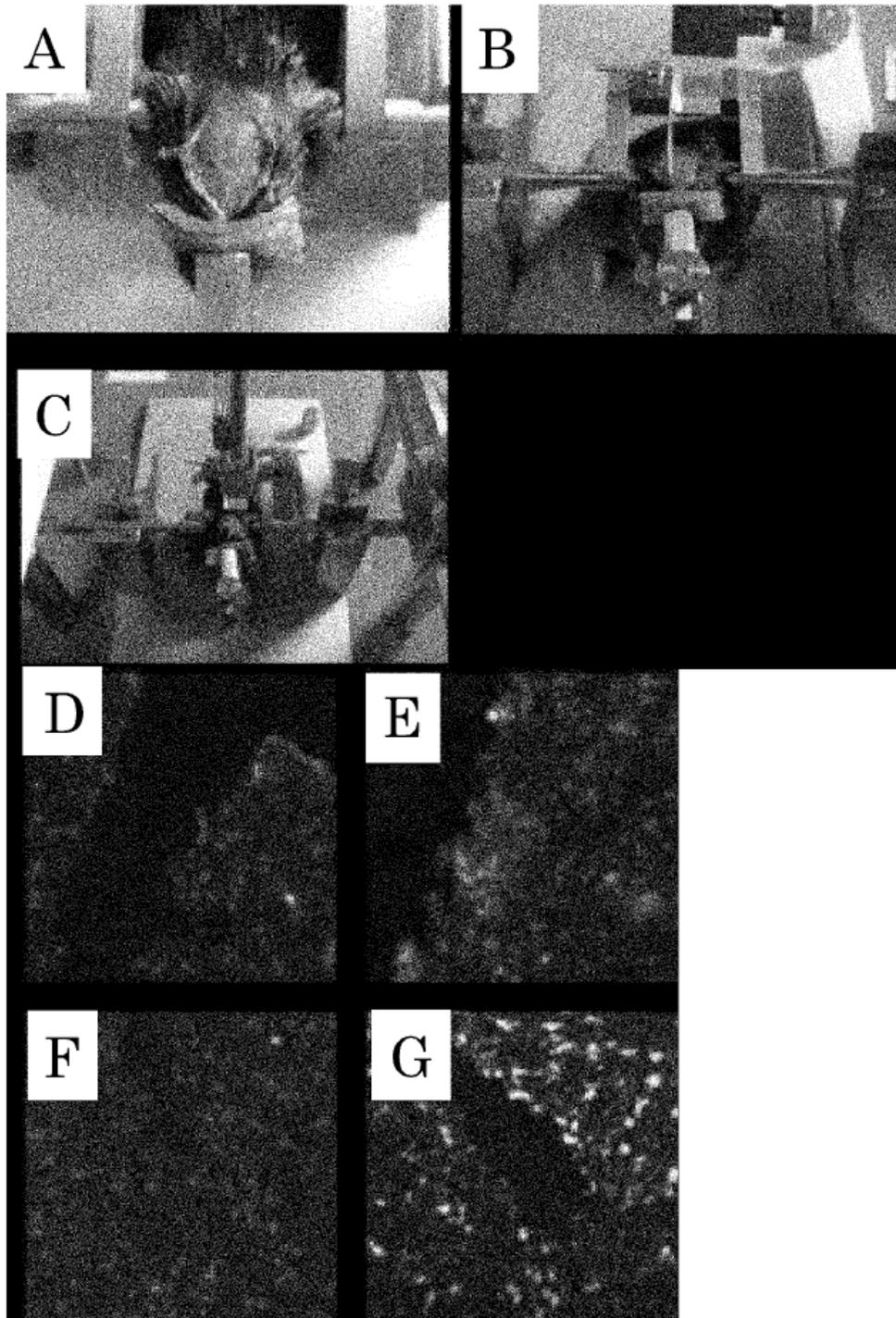


Fig. 16



Fig. 17

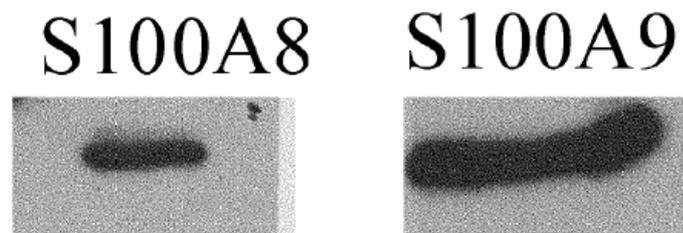


Fig. 18

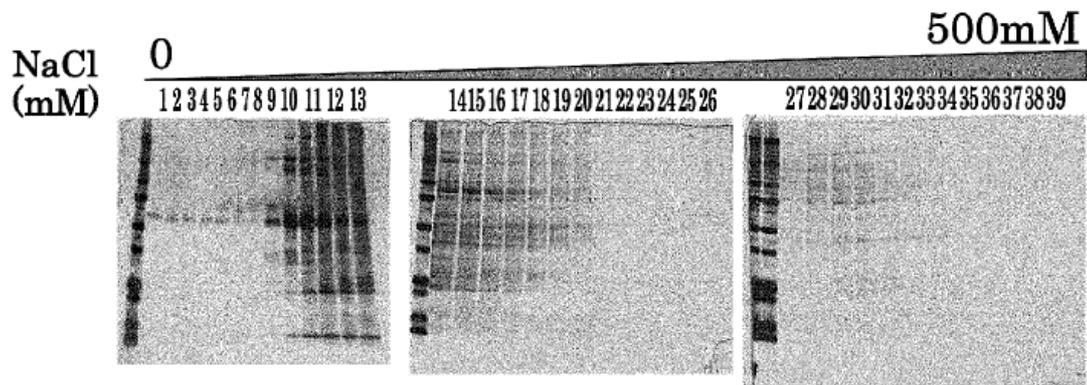


Fig. 19



Fig. 20

S100A8

14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 M 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



S100A9

14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 M 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



Fig. 21

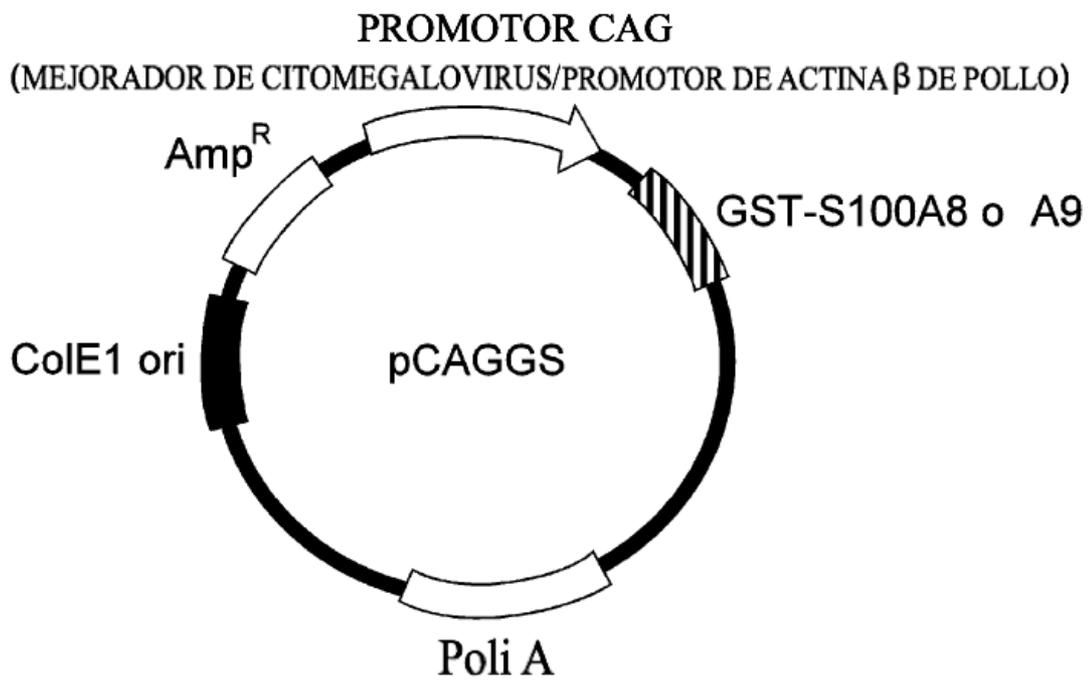


Fig. 22

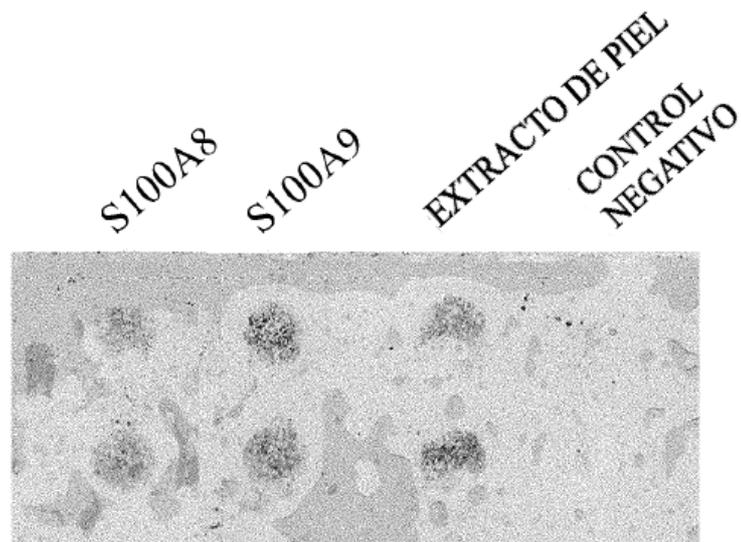


Fig. 23

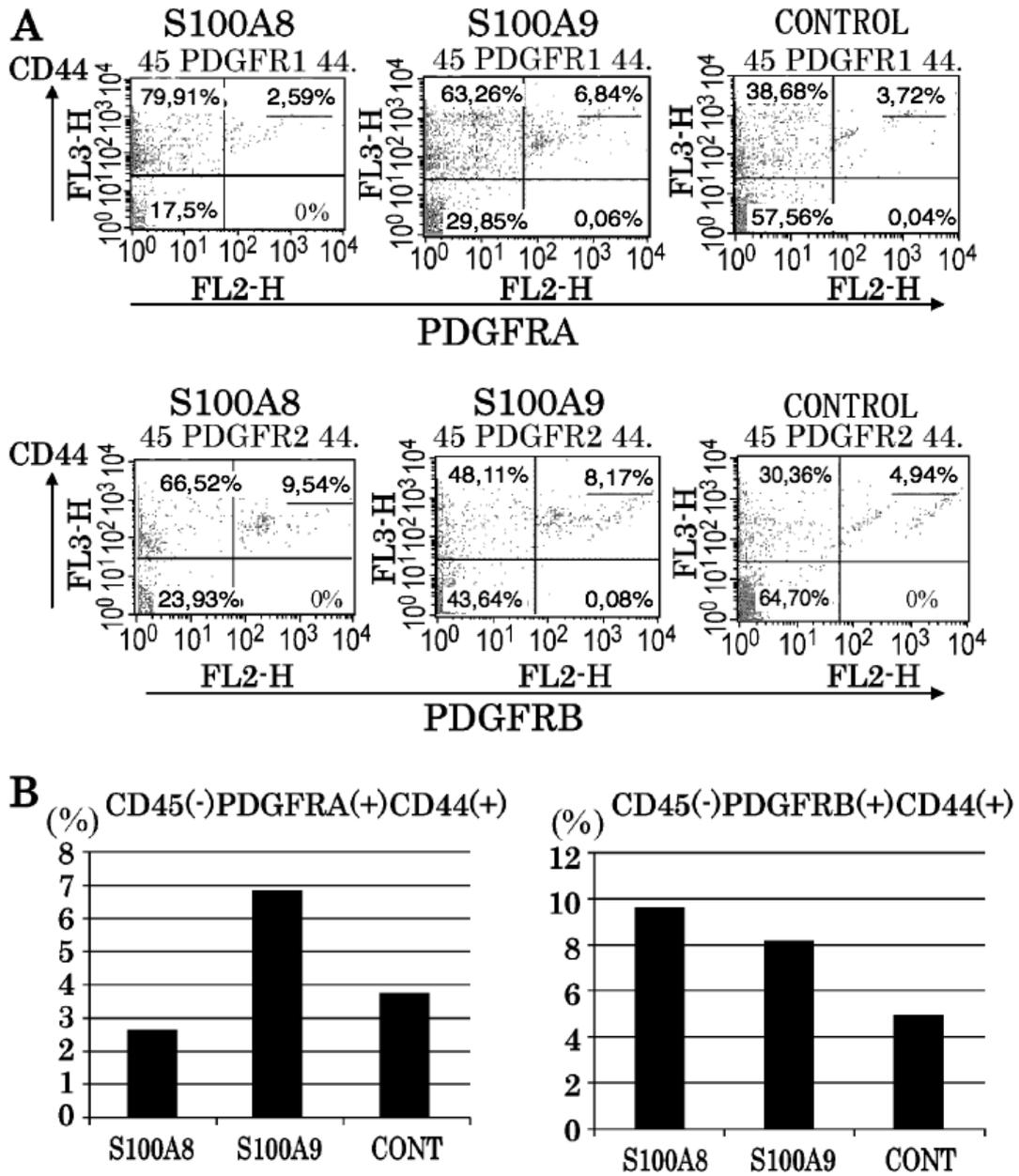


Fig. 24

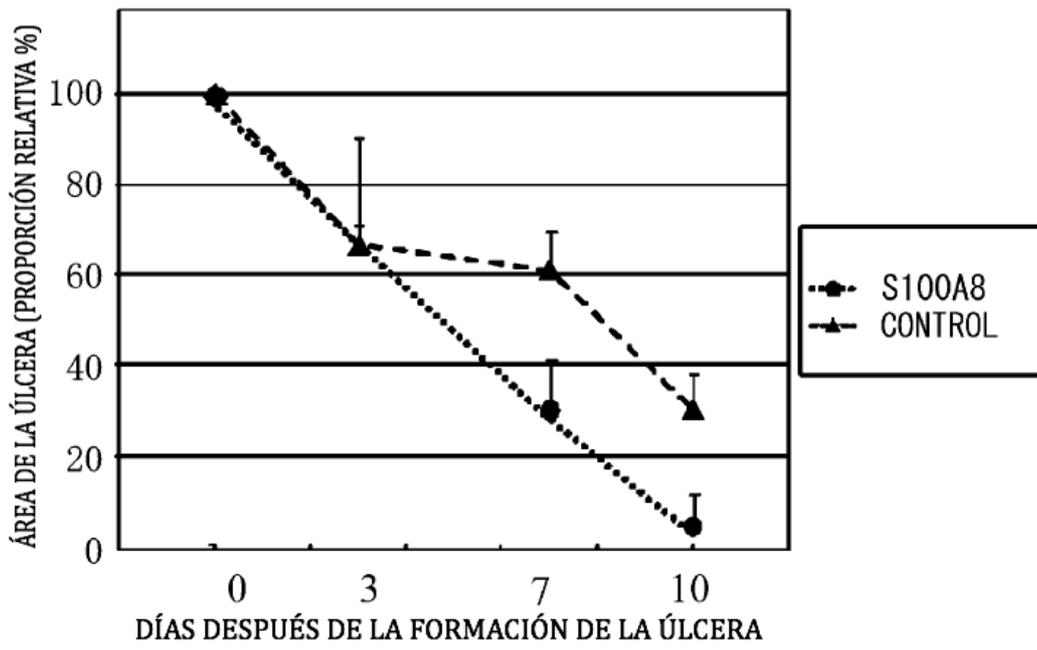


Fig. 25

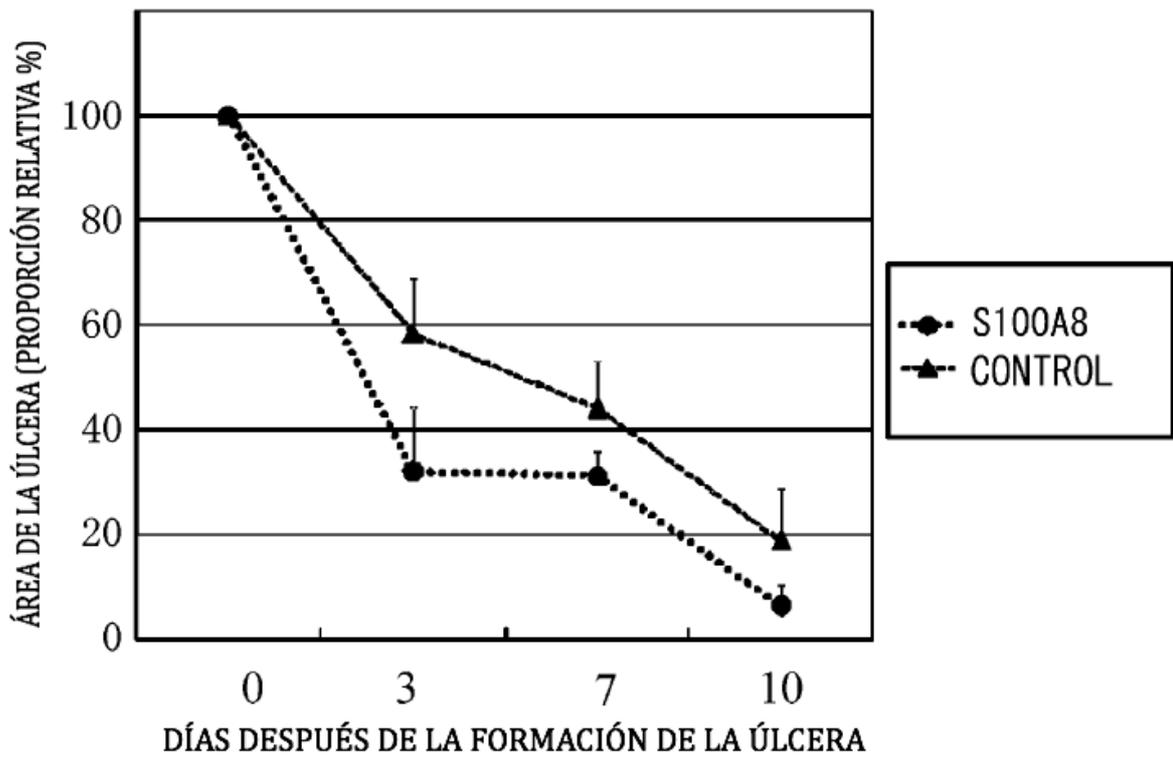


Fig. 26

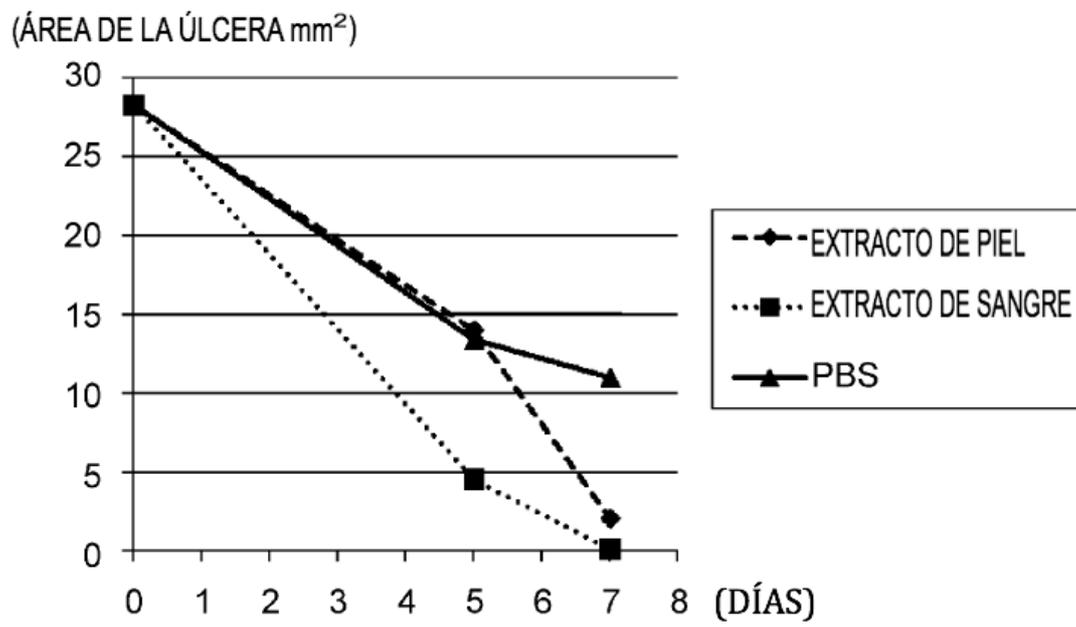


Fig. 27

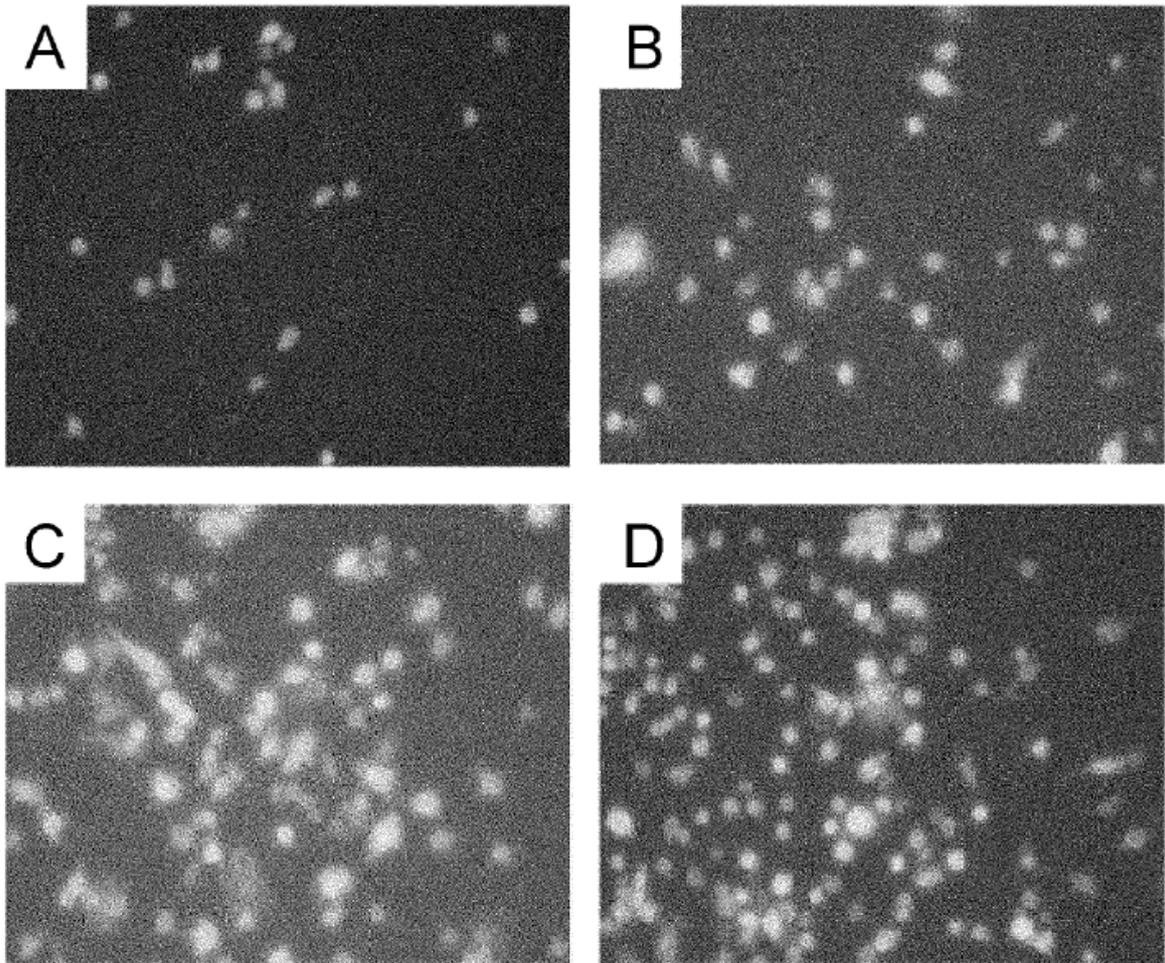


Fig. 28

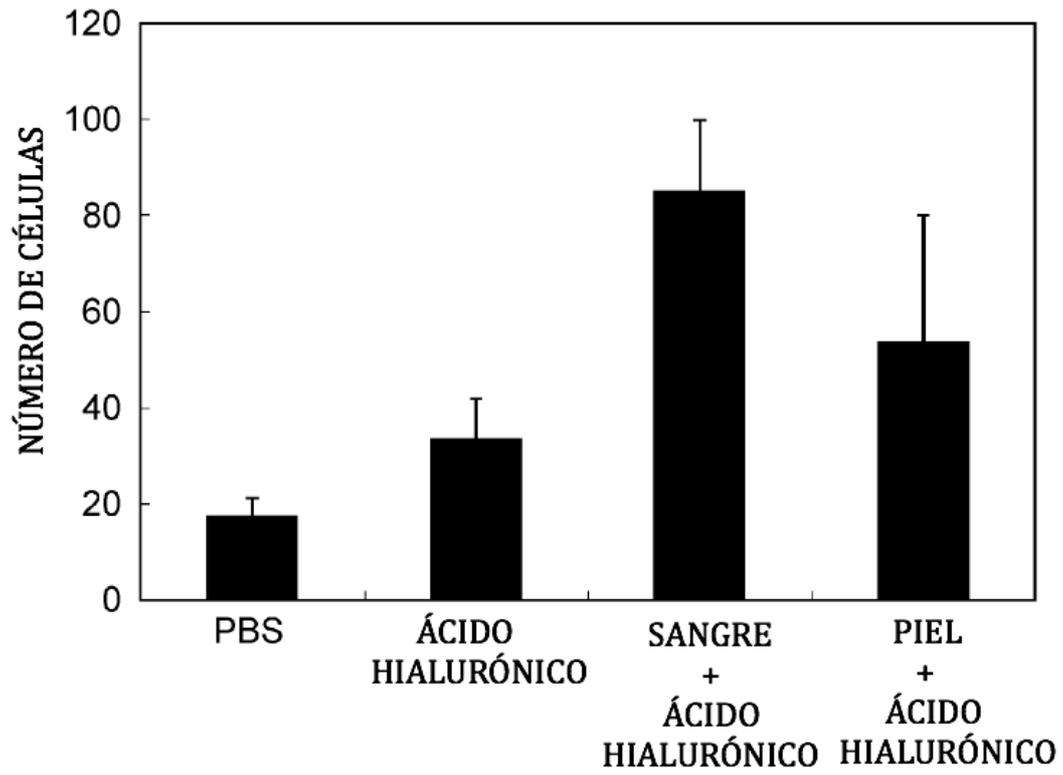


Fig. 29

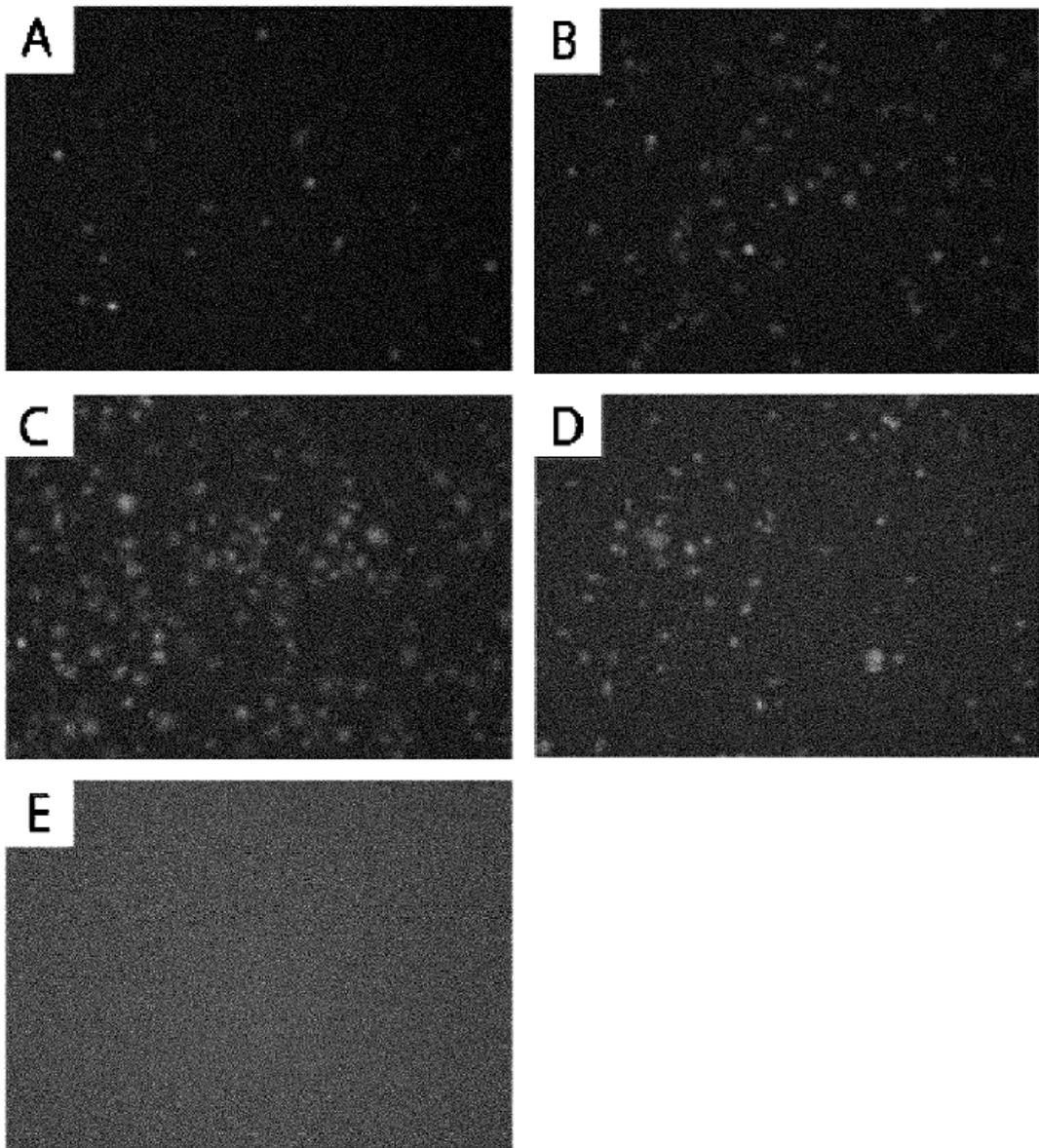


Fig. 30

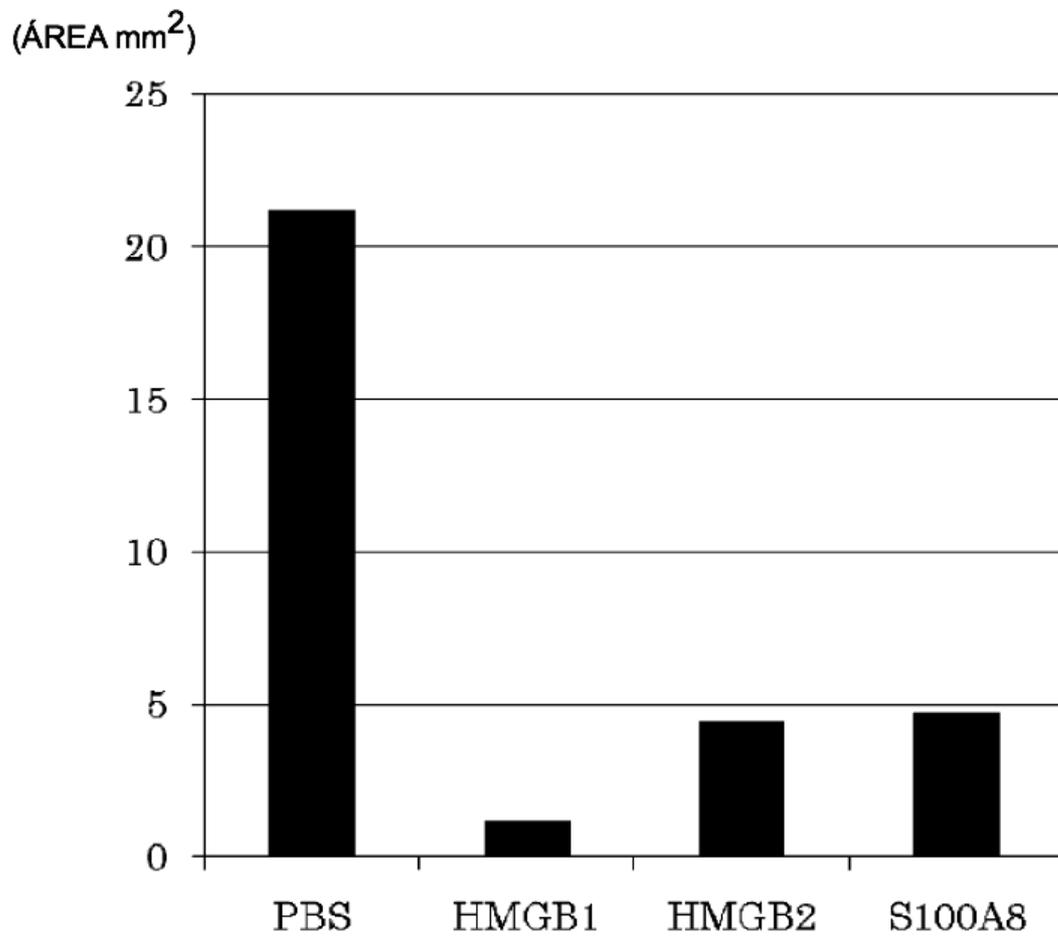


Fig. 31

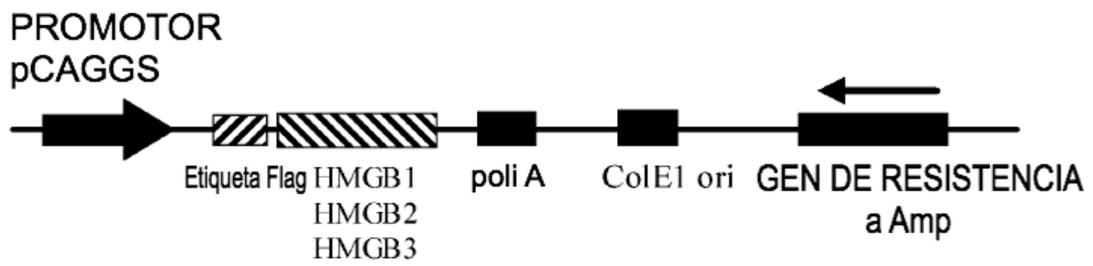
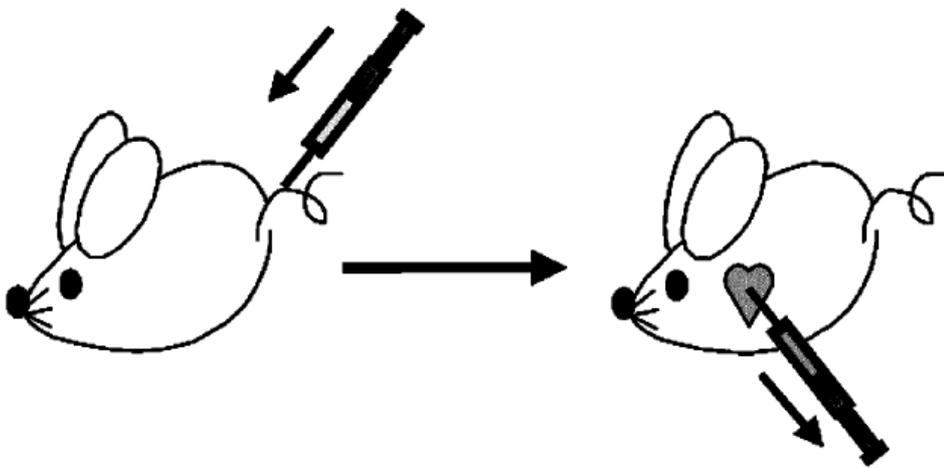


Fig. 32

EXTRACTO DE TEJIDO, INDUCTOR DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO DE MÉDULA ÓSEA



RECOLECCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA

Fig. 33

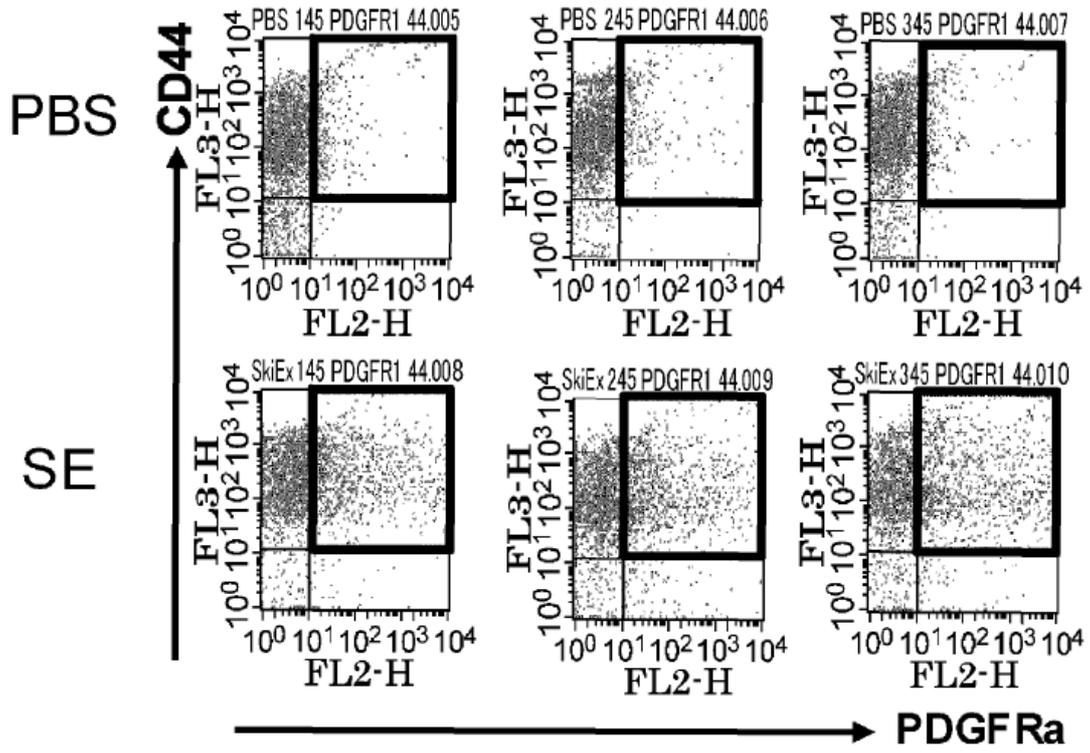


Fig. 34

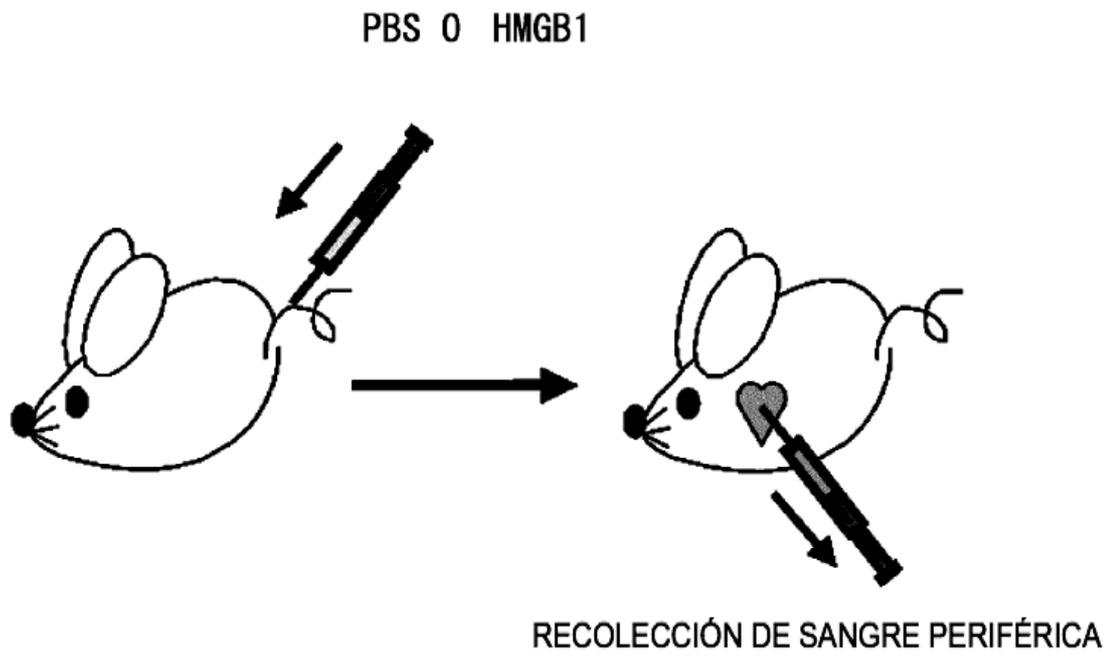


Fig. 35

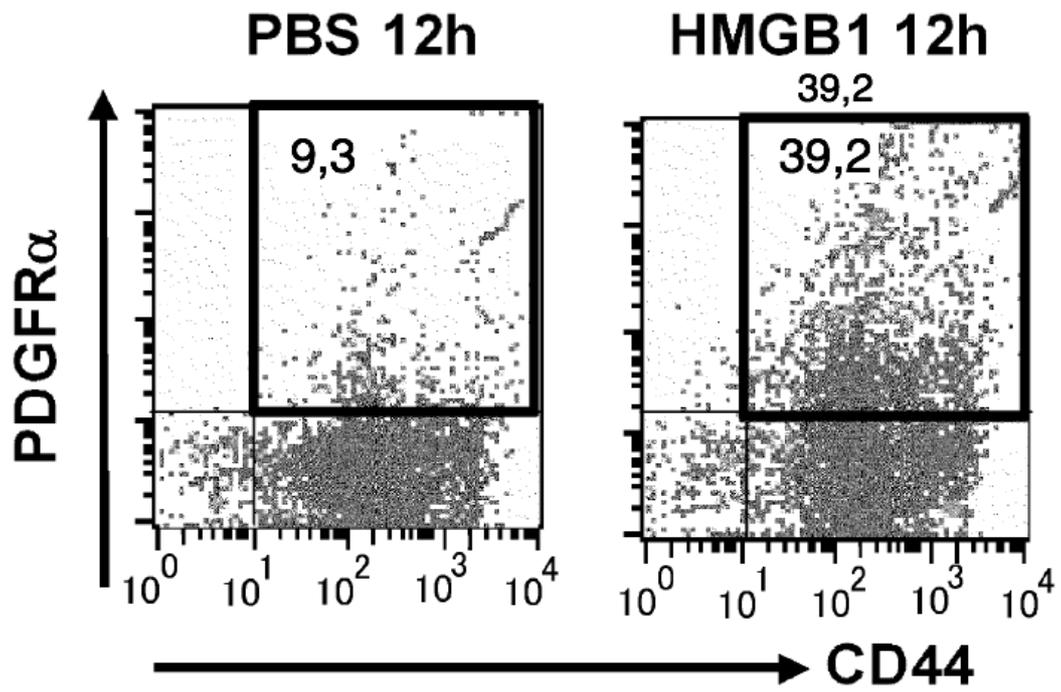


Fig. 36

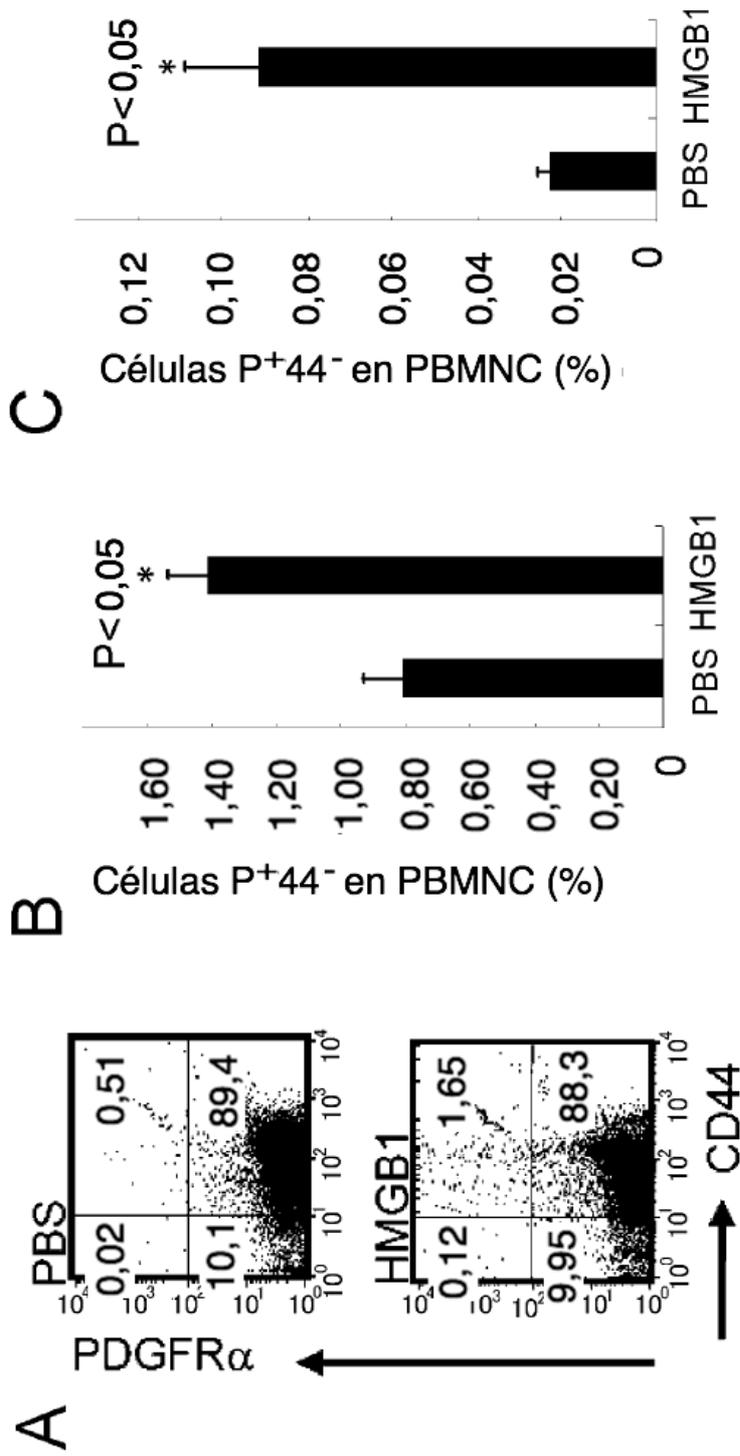


FIG. 37