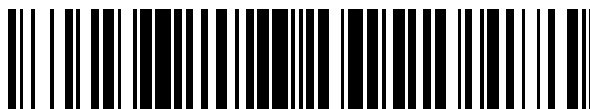


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 420**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2013** **PCT/JP2013/078758**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014** **WO14065347**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2013** **E 13849289 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017** **EP 2913058**

54 Título: **Método novedoso para tratar infarto cardiaco utilizando fragmento de HMGB1**

30 Prioridad:

**25.10.2012 JP 2012235785**

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

**22.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TAMAI, KATSUTO;**  
**KAMATA, SOKICHI;**  
**KANEDA, YASUFUMI;**  
**MIYAGAWA, SHIGERU;**  
**SAWA, YOSHIKI y**  
**YAMAZAKI, TAKEHIKO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 660 420 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**

Método novedoso para tratar infarto cardiaco utilizando fragmento de HMGB1

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

- 5 La presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticas novedosas para utilizar en el tratamiento de infarto de miocardio, en donde la composición comprende un fragmento de péptido de HMGB1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

- 10 El infarto agudo de miocardio el cual resulta en la necrosis de músculo cardiaco debido a la oclusión de la arteria coronaria es una enfermedad con mal pronóstico y es la principal condición fundamental para enfermedades del corazón las cuales son la segunda causa de muerte en Japón. Terapias existentes, cateterización en fase aguda y cirugía de derivación de arteria coronaria, mitigan el daño al miocardio y contribuyen a la reducción de la tasa de mortalidad; sin embargo, existen problemas tales como daño al miocardio que ocurre cuando el flujo sanguíneo coronario bloqueado reinicia (daño de isquemia-reperusión). Por tanto, se desea el desarrollo de terapias adicionales.
- 15 Recientemente, en experimentos básicos que utilizan modelos animales, el trasplante de células madre mesenquimales de médula ósea se ha reportado que suprime el desarrollo del infarto de miocardio mediante la regeneración de músculo cardiaco por la diferenciación directa de las células transplantadas en células constituyentes del músculo cardiaco, y también por medio de la supresión de remodelación ventricular izquierda causada por el efecto paracrino de las citoquinas producidas. Actualmente, pruebas clínicas de trasplantes celulares autólogos por medio de varias rutas de administración están siendo llevadas a cabo. Sin embargo, muchas cuestiones continúan por resolverse como problemas concernientes al trasplante celular autólogo, tal como carga física impuesta en la recolección celular, costo y mano de obra involucrados en el cultivo celular, y el tiempo requerido hasta el trasplante celular. Mientras tanto, se ha confirmado recientemente que existe un mecanismo en el cual el tejido dañado libera factores que reclutan células madre pluripotentes de médula ósea en la sangre para
- 20 inducir la regeneración de tejido en el sitio dañado. La regeneración de tejido que utiliza el mecanismo de inducir regeneración de tejido dañado *in vivo* administrando factores de inducción de células madre de médula ósea es un concepto novedoso no convencional en terapia regenerativa, y se cree que es ventajosa en comparación con la terapia celular que utiliza células madre en esa mano de obra no es requerida, el suministro estable es posible, y la administración en una etapa temprana de daño es posible.
- 25 En estudios previos, los presentes inventores han identificado la proteína HMGB1 como un factor novedoso que moviliza las células madre pluripotentes de médula ósea. El HMGB1 es el mayor componente de proteína nuclear no-histona y es extracelularmente liberado de las células dentríticas, macrófagos, o células necróticas que se acumulan en sitios dañados, y se confirma que están asociados con varias enfermedades.
- 30

**Documentos de la técnica anterior****Documentos de Patente**

- 35 Documento de Patente 1, WO2008/053892  
Documento de Patente 2, WO2007/015546  
Documento de Patente 3, WO2009/133939  
Documento de Patente 4, WO2009/133940  
40 Documento de Patente 5, WO2009/133940  
Documento de Patente 6, WO2004/004763  
Documento de Patente 7, WO2002/074337

**Documentos de no Patente**

- 45 Documento de no Patente 1, Bustin *et al.*, Mol Cell Biol, 19:5237-5246,1999  
Documento de no Patente 2, Hori *et al.*, J. Biol. Chem., 270, 25752-25761, 1995  
Documento de no Patente 3, Wang *et al.*, Science, 285: 248-251, 1999  
Documento de no Patente 4, Muller *et al.*, EMBO J, 20: 4337-4340, 2001  
Documento de no Patente 5, Wang *et al.*, Science, 285: 248-251, 1999  
Documento de no Patente 6, Germani *et al.*, J Leukoc Biol., 81(1): 41-5, 2007  
50 Documento de no Patente 7, Palumbo *et al.*, J. Cell Biol., 164: 441-449, 2004  
Documento de no Patente 8, Merenmies *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 16722-16729, 1991  
Documento de no Patente 9, Wu Y *et al.*, Stem cells, 25: 2648-2659, 2007  
Documento de no Patente 10, Tamai *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A., 108(16): 6609-6614, 2011  
Documento de no Patente 11, Yang *et al.*, J Leukoc Biol., 81(1): 59-66, 2007

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

Problemas que van a resolverse por medio de la invención

Recientemente, en enfermedades tales como infarto cerebral, se ha confirmado que existe un mecanismo en el cual el tejido dañado induce la regeneración de tejido en el sitio dañado liberando factores que movilizan las células madre pluripotentes de médula ósea en la sangre, y que el mecanismo contribuye a la prevención de expansión adicional del daño. En la presente invención, los presentes inventores se enfocaron en desarrollar agentes terapéuticos novedosos para infarto de miocardio utilizando fragmentos de péptidos derivados de una proteína de HMGB1, la cual fue identificada como un nuevo factor de movilización de células madre pluripotentes de médula ósea.

#### Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores prepararon un fragmento del péptido (1-44) de una proteína de HMGB1 el cual tiene una actividad de migración celular, y revelaron en el modelo de infarto de miocardio para la primera vez que la administración sistémica del fragmento de péptido mejora la acumulación de células de PDGFR $\alpha$ -positivo en sitios del infarto y cercanías del mismo. Además, el mejoramiento continuo de la función del corazón se demostró en los animales de modelo de infarto de miocardio administrados con el fragmento de péptido (1-44). Lo anterior sugiere que el fragmento del péptido (1-44) induce la regeneración del tejido haciendo uso del mecanismo de inducir la regeneración del tejido dañado *in vivo*, y suprime el desarrollo de infarto agudo de miocardio. Por tanto, se muestra que el fragmento de péptido de la presente invención puede ser un agente terapéutico útil para mal pronóstico de infarto agudo de miocardio humano.

La presente invención describe una composición farmacéutica novedosa para utilizar en el tratamiento de infarto de miocardio, en donde la composición comprende un fragmento de péptido de HMGB1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3.

Específicamente, los presentes inventores crearon un péptido que consiste en los aminoácidos en las posiciones 1 a 44 de una proteína de HMGB1 (SEC ID NO: 3) por síntesis del péptido. A ratones de modelo que facilitan la evaluación del efecto terapéutico en el infarto de miocardio, cada uno de los fragmentos de HMGB1 producidos les fue administrado, y se confirmaron los efectos terapéuticos de los fragmentos en el infarto de miocardio.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1A, es una gráfica que indica el número de células madre mesenquimales de médula ósea de PDGFR $\alpha$ -positivo en sitios del infarto (INFARTO), sitios en el límite (LÍMITE), y sitios de no infarto (REMOTO) siete días después de producirse el infarto de miocardio. Las células madre mesenquimales de médula ósea de PDGFR $\alpha$ -positivo fueron reclutadas de manera significativa (1-VIA ANOVA, \*P<0.05 vs. 1-44) en todas las áreas del infarto, límite, y sitios de no infarto en el grupo administrado con el fragmento de péptido (1-44) (1-44; N=) en comparación al grupo de control negativo (CONT; N=4).

La figura 1B, es una fotografía que muestra mancha de inmunofluorescencia en el sitio límite de un ratón administrado con el fragmento de péptido (1-44). Las células positivas para fluorescencia verde son células derivadas de médula ósea GFP-positivo y células positivas para fluorescencia roja indican células que expresan PDGFR $\alpha$ . Las células positivas para ambos, GFP y PDGFR $\alpha$  están indicadas con flechas.

La figura 1C, es una gráfica que muestra el nivel de mRNA de citoquina inflamatoria TNF $\alpha$  en sitios de infarto (INFARTO), sitios límite (LÍMITE), y sitios de no infarto (REMOTO) 7 y 56 días después de producirse el infarto de miocardio. Los niveles de la citoquina inflamatoria (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) en sitios de no infarto fueron significativamente más bajos (1-VIA ANOVA, #P<0.05 1-44 vs. CONT) en el grupo administrado con el fragmento de péptido (1-44) (1-44; N=4) en comparación con el grupo de control negativo (CONT: N=4).

La figura 1D, es una gráfica que muestra el nivel de mRNA de citoquina inflamatoria IL-1 $\beta$  en sitios de infarto (INFARTO), sitios límite (LÍMITE), y sitios de no infarto (REMOTO) 7 y 56 días después de producirse el infarto de miocardio. Los niveles de citoquina inflamatoria (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) en sitios de no infarto fueron significativamente más bajos (1-VIA ANOVA, #P<0.05 1-44 vs. CONT) en el grupo administrado con (1-44) del fragmento de péptido (1-44; N=4) en comparación con el grupo del control negativo (CONT: N=4).

La figura 1E, es una gráfica que muestra la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (EF), el diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (DD), y diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo (DS) del grupo de control negativo y el grupo administrado con (1-44) del fragmento de péptido 56 días después de producirse el infarto de miocardio.

#### **MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION**

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento del infarto de miocardio, la cual comprende un fragmento de péptido de HMGB1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3. Dicho fragmento de péptido de HMGB1 tiene una actividad de estimulación de migración celular.

En la presente invención, una actividad de estimulación-migración celular se refiere a la actividad de estimular la migración celular. En la presente, una actividad de estimulación-migración celular también está expresada como una

actividad de inducción de migración celular o una actividad de atracción celular.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse/adicionarse a cualquier sitio. Esto es, la composición puede aplicar sus efectos sin importar el sitio en el que se administró, tal como un sitio de infarto de miocardio que necesite regeneración, un sitio diferente al sitio del infarto, o sangre. Por ejemplo, cuando la composición se administra/adiciona, las células son reclutadas al sitio de administración/adición o sus sitios cercanos, induciendo de esa manera o promoviendo la regeneración de la lesión. También, por ejemplo, cuando la composición se administra/adiciona al sitio de infarto o cercano al mismo, las células son reclutadas al sitio del infarto, induciendo así o promoviendo la regeneración del sitio del infarto. Además, por ejemplo, cuando la composición se administra/adiciona a un tejido diferente a un tejido que necesite regeneración, las células de médula ósea son movilizadas desde la médula ósea al sitio que necesita regeneración a través de la circulación periférica, induciendo así o promoviendo la regeneración. Aquí, la circulación periférica es también llamada "circulación sanguínea" o "torrente sanguíneo periférico".

La administración a un tejido diferente a un tejido que necesita regeneración se refiere a la administración a un sitio que no sea el sitio que necesite regeneración (un sitio diferente a un sitio que necesite regeneración). Por consiguiente, "un tejido diferente a un tejido que necesite regeneración" también puede estar referido como:

un sitio diferente a un tejido que necesite regeneración; un sitio diferente a un sitio que necesite regeneración; un sitio distante de un tejido que necesite regeneración; un sitio distante de un sitio que necesite regeneración; un sitio distante a un sitio que necesite regeneración; un tejido distante a un tejido que necesite regeneración; un sitio distante; o un tejido distante.

Por tanto, la composición de la presente invención es efectivamente utilizada para regenerar tejidos a los cuales es difícil administrar de manera directa agentes farmacéuticos desde el exterior del cuerpo. Ejemplos del tejido diferente al tejido que necesita regeneración incluyen tejidos sanguíneos, tejidos musculares, tejidos subcutáneos, tejidos intradérmicos, cavidad abdominal, y similares.

En la presente invención, las células son estimuladas para migrar o las células son movilizadas de la médula ósea a la sangre periférica incluyen células indiferenciadas y células en varias etapas de diferenciación, pero no están limitadas a ello. En la presente invención, las células que son estimuladas para migrar o células movilizadas desde la médula ósea a la sangre periférica incluyen células madre, células no-madre, y similares, pero no están limitadas a ello. Las células madre incluyen células madre circulatorias y células madre no circulatorias. Las células madre no circulatorias son, por ejemplo, células madre residentes en un tejido. Células madre circulatorias son, por ejemplo, células madre circulatorias en la sangre.

Además, las células estimuladas para migrar o células movilizadas de la médula ósea a la sangre periférica incluyen células derivadas de médula ósea y células madre hematopoyéticas, pero no están limitadas a ello. En la presente especificación, "células madre hematopoyéticas" son células madre que pueden diferenciarse en las células sanguíneas tal como glóbulos rojos, plaquetas, mastocitos, y células dendríticas, así como glóbulos blancos incluyendo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos, macrófagos, y similares. Sus marcadores se sabe que son CD34-positivo y CD133-positivo en humano, y CD34-negativo, c-Kit-positivo, Sca-1-positivo, y marcador de linaje negativo en ratón. Las células madre hematopoyéticas son difíciles de cultivar solas cuando son cultivadas en placas de cultivo, y no necesitan ser co-cultivadas con células madre.

En la presente especificación, las "células de médula ósea" significan células presentes dentro de la médula ósea mientras que "células derivadas de médula ósea" significan "células de médula ósea" movilizadas de médula ósea al exterior de la médula ósea. "Células de médula ósea" incluyen células que contienen poblaciones de células progenitoras de tejido presentes dentro de la médula ósea. Además, "células derivadas de médula ósea" pueden ser células que contienen mesoangioblastos o células libres de mesoangioblastos.

Las células progenitoras de tejido están definidas como células indiferenciadas que tienen una potencia unidireccional para diferenciarse en las células de un tejido específico diferente al sistema sanguíneo, e incluyen células indiferenciadas que tienen la potencia para diferenciarse en tejidos mesenquimales, tejidos epiteliales, tejidos nerviosos, órganos parenquimáticos, y endotelio vascular como se mencionó anteriormente.

"Células de médula ósea" y "células derivadas de médula ósea" son células madre hematopoyéticas y células diferenciadas derivadas de las mismas tal como leucocitos, eritrocitos, plaquetas, osteoblastos, y fibrocitos, o son células madre representadas por células que han sido hasta el momento llamadas células madre mesenquimales de médula ósea, células madre pluripotentes estromáticas de médula ósea, o células madre pluripotentes de médula ósea. Como se utilizó en la presente, "células madre de médula ósea" se refieren a células madre presentes dentro de la médula ósea, mientras que "células madre derivadas de médula ósea" se refieren a "células madre de médula ósea" movilizadas de la médula ósea al exterior de la médula ósea. En la presente invención, las células estimuladas para migrar o células movilizadas de la médula ósea a la sangre periférica incluyen "células madre derivadas de médula ósea", pero no están limitados a ello. "Células de médula ósea" y "células derivadas de médula ósea" se pueden aislar por medio de la extracción de médula ósea (extracción celular de médula ósea) o extracción de la sangre periférica. Las células madre hematopoyéticas no son adherentes, mientras algunas de las "células de

médula ósea” y “células derivadas de médula ósea” se obtienen como células adherentes por medio de un cultivo celular de una fracción de monocito de sangre obtenida por una extracción de médula ósea (extracción celular de médula ósea) o extracción de sangre periférica.

Además, “células de médula ósea” y “células derivadas de médula ósea” incluyen células madre mesenquimales, y tienen un potencial para diferenciarse en, preferentemente, osteoblastos (los cuales pueden ser identificados observando la calcificación después de inducir la diferenciación), condrocitos (los cuales pueden ser identificados por medio de tinción positiva azul alciano, tinción positiva de safranina O, o similares), los adipocitos (los cuales pueden ser identificados por medio de tinción positiva de Sudan III), y otras células mesenquimales tales como fibroblastos, células musculares lisas, células estromáticas, y células del tendón; y además células nerviosas, células epiteliales (por ejemplo, familia de citoqueratina que expresa queratinocitos epidérmicos y células epiteliales intestinales), y células endoteliales vasculares. Las células que se van a diferenciar no están limitadas a las células anteriores, y el potencial para diferencias las células de órganos parenquimáticos tal como, riñón, y páncreas también está incluido.

En la presente, “células mesenquimales de médula ósea”, “células pluripotentes estromáticas de médula ósea”, o “células madre pluripotentes de médula ósea” se refieren a células existentes en la médula ósea, las cuales son directamente extraídas de la médula ósea o indirectamente extraídas de manera indirecta de otros tejidos (sangre, piel, grasa, y otros tejidos), y se pueden cultivar y proliferar como células adherentes en una placa de cultivo (hecho de plástico o vidrio). Estas células se caracterizan en tener un potencial para diferenciarse en tejidos mesenquimales tales como hueso, cartílago, y grasa (células madre mesenquimales), o en músculo esquelético, músculo cardíaco, tejidos nerviosos, y tejidos epiteliales (células madre pluripotentes), y pueden obtenerse por medio de extracción de células de médula ósea.

Por otra parte, “células madre mesenquimales de médula ósea derivadas de médula ósea”, “células pluripotentes estromáticas de médula ósea derivadas de médula ósea”, o “células madre pluripotentes de médula ósea derivadas de médula ósea” movilizadas de médula ósea al exterior de la médula ósea son células que se pueden obtener por medio de extracción de la sangre periférica, tejidos mesenquimales tales como grasa, tejidos epiteliales tales como piel, o tejidos nerviosos tal como el cerebro.

Además, estas células también están caracterizadas por tener un potencial para diferenciarse en, por ejemplo, tejidos epiteliales tal como queratinocitos que constituyen piel, o tejidos nerviosos que constituyen el cerebro, cuando son administradas a un área lesionada del cuerpo vivo inmediatamente después de la extracción o después de haber sido adherido a una placa de cultivo.

Las células madre mesenquimales de médula ósea, células madre pluripotentes estromáticas de médula ósea, células madre pluripotentes de médula ósea, o estas células reclutadas de la médula ósea al exterior de la médula ósea de preferencia tienen una potencia para diferenciarse en: osteoblastos (los cuales pueden identificarse por medio de la observación de calcificación después de inducir la diferenciación), condrocitos (los cuales pueden identificarse por medio de tinción positiva azul alciano, tinción positiva de safranina O, o similares), adipocitos (los cuales pueden identificarse por medio de tinción positiva Sudan III o similares), y otras células mesenquimales tales como fibroblastos, células musculares lisas, células músculoesqueléticas, células estromáticas, y células del tendón; células nerviosas, células de pigmentación, células epidérmicas, células del folículo capilar (las cuales expresan familia de citoqueratina, familia de queratina capilar, o similares), células epiteliales (por ejemplo, queratinocitos epidérmicos y células epiteliales intestinales que expresan familia de citoqueratina y similares), y células endoteliales; y además en células de órganos parenquimatosos tal como hígado, riñón, y páncreas. Sin embargo, células diferenciadas no están limitadas a las células anteriores.

Las células de médula ósea humana y células derivadas de médula ósea humana se pueden ejemplificar por, pero no limitarse a, células las cuales pueden obtenerse directamente extrayendo médula ósea (células de médula ósea), sangre periférica, o grasa, u obtenidas como células adherentes mediante el cultivo de una fracción de monocito aislado. Los marcadores para células de médula ósea humana y células derivadas de médula ósea humana incluyen, por ejemplo, todo o algo de lo siguiente sin limitarse a ello: PDGFR $\alpha$ -positivo, Lin-negativo, CD45-negativo, CD44-positivo, CD90-positivo, y CD29-positivo, F1k-1-negativo, CD105-positivo, CD73-positivo, CD90-positivo, CD71-positivo, Stro-1-positivo, CD106-positivo, CD166-positivo, y CD31-negativo.

Además, las células de médula ósea de ratón y células derivadas de médula ósea de ratón se pueden ejemplificar por medio de, pero no limitarse a, células las cuales puedan obtenerse directamente extrayendo médula ósea (células de médula ósea), sangre periférica, o grasa, u obtenidas como células adherentes mediante el cultivo de una fracción de monocito aislada. Los marcadores para células de médula ósea de ratón y células derivadas de médula ósea incluyen, por ejemplo, todo o algo de lo siguiente pero sin limitarse a ello: CD44-positivo, PDGFR $\alpha$ -positivo, PDGFR $\beta$ -positivo, CD45-negativo, Lin-negativo, Sca-1-positivo, c-kit-negativo, CD90-positivo, CD29-positivo, y flk-1-negativo.

En la presente invención, las células estimuladas para migrar incluyen células positivas PDGFR $\alpha$ -positivo, pero no se limitan a ello. Además, las células PDGFR $\alpha$ -positivo estimuladas para migrar no están limitadas particularmente, sino preferentemente son células PDGFR $\alpha$ -positivo derivadas de médula ósea. Más aún, los marcadores diferentes

a PDGFR $\alpha$  pueden ejemplificarse por medio de todos o algunos de CD29-positivo, CD44-positivo, CD90-positivo, CD271-positivo, CD11b-negativo, y Flk-1 negativo, pero no están limitados a ello. Las células PDGFR $\alpha$ -positivo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, células derivadas de médula ósea de PDGFR $\alpha$ -positivo, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de PDGFR $\alpha$ -positivo, las células de tejido residente en tejidos de PDGFR $\alpha$ -positivo (por ejemplo, fibroblastos y similares), las células derivadas de médula ósea de PDGFR $\alpha$ -positivo obtenidas como células adherentes por medio del cultivo celular de una fracción de monocito de sangre obtenida por la extracción de médula ósea (extracción celular de médula ósea) o extracción de sangre periférica.

La proteína de HMGB1 en la presente divulgación incluye, pero no se limita a, por ejemplo, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 como una proteína de HMGB1 derivada humana, y ADN que codifica dicha proteína incluye, pero no se limita a, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 2.

En la presente invención, "un péptido de fragmento de HMGB1 que tiene una actividad de estimulación de migración" se refiere a un péptido que consiste en una porción de una proteína de HMGB1 y que tiene una actividad de estimulación de migración celular. El fragmento de péptido de HMGB1 comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 44 de la proteína de HMGB1 (SEC ID NO: 3), la cual es un fragmento de péptido que tiene una actividad de estimulación de migración celular.

Los métodos para administrar una composición de la presente invención incluyen administración oral y administración parenteral. Específicamente, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, inyección, administración transnasal, administración transpulmonar, administración transdérmica, y similares. Como ejemplos de inyección, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, y similares que se pueden utilizar para administrar una composición de la presente invención sistemática o localmente (por ejemplo, bajo la piel, en la piel, en la superficie de la piel, globo ocular o conjuntiva palpebral, mucosa de cavidad nasal, mucosa intraoral y mucosa del tracto gastrointestinal, mucosa vaginal/mucosa intrauterina, sitio dañado o similar).

Los métodos para administrar una composición de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, administración intravascular (administración intra-arterial, administración intravenosa, o similar), administración de sangre, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intradérmica, administración intraperitoneal.

No hay limitación en el sitio de administración, y por ejemplo, puede ser un sitio del tejido que necesite de regeneración o su región cercana, un sitio diferente del tejido que necesite regeneración, o un sitio distante a y diferente del tejido que necesite de regeneración. El sitio es, por ejemplo, en la sangre (en arterias, en venas, o similares), músculo, bajo la piel, sobre la piel, en la cavidad abdominal, o similar, sin estar al mismo.

El método de administración puede seleccionarse apropiadamente conforme a la edad y los síntomas del paciente. Cuando un péptido de la presente invención es administrado, la dosis por vez del péptido puede seleccionarse dentro de un rango de 0.0000001 mg a 1000 mg por kg de peso corporal de un paciente. Alternativamente, la dosis puede seleccionarse dentro de un rango de 0.00001 mg a 100000 mg por cuerpo del paciente, por ejemplo. Cuando se administran células que secretan un péptido de la presente invención o vectores de terapia de genes insertados con ADN codificando el péptido, pueden administrarse de manera tal que la cantidad del péptido esté dentro del rango anterior. Sin embargo, la dosis de composiciones farmacéuticas de la presente invención no está limitada a ello.

El fragmento de péptido de HMGB1 comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención puede obtenerse como un recombinante incorporando un ADN que codifica el péptido en un sistema de expresión apropiada, o se puede sintetizar artificialmente. La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse conforme a los métodos usuales (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, última edición, Mark Publishing Company, Easton, E.U.A.), y puede contener portadores farmacéuticamente aceptables y aditivos juntos. Ejemplos incluyen tensioactivos, excipientes, colorantes, perfumes, conservadores, estabilizadores, tampones, agentes de suspensión, agentes isotonzantes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, impulsores de flujo, y agentes saborizantes, aunque no están limitados a ello y otros portadores comunes pueden utilizarse apropiadamente. Ejemplos específicos incluyen ácido silícico anhídrido ligero, lactosa, celulosa cristalina, manitol, almidón, carmelosa de calcio, carmelosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, acetato de polivinilacetaldietilamina, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicérido de ácido graso de cadena media, aceite de ricino hidrogenado de polioxitileno 60, azúcar blanca, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, y sales inorgánicas.

De aquí en adelante, la presente invención será además ilustrada con referencia a Ejemplos, pero no debe considerarse como limitante a ellos.

## Ejemplo 1

### Objetivo

El efecto terapéutico por la administración sistémica del fragmento de péptido de la proteína HMGB1 (1-44) es comprehensivamente evaluado utilizando una etapa aguda de infarto de miocardio del modelo de ratón por medio de fisiología cardíaca, histopatología, y biología molecular.

### **Materiales y métodos**

5 Se extrajeron células de médula ósea del fémur/pantorrilla de ratones de tres semanas de edad (ratones transgénicos C57BL6-CAG-GFP), y la suspensión celular de médula ósea fue administrada (300 ml/ratón) a la vena caudal de ratones de seis semanas de edad (C57BL6) después de la irradiación (10GY) para producir médula ósea de ratones quiméricos. Sesenta días después del transplante de médula ósea, se llevó a cabo una toracotomía en el cuarto interespacio izquierdo bajo anestesia general en la posición supina, y la arteria próxima coronaria descendente anterior izquierda fue ligada para producir un modelo de infarto de miocardio extendido (modelo de arteria coronaria descendente anterior izquierda/oclusión circunfleja). Al hacer la proteína de HMGB1 molecular baja, un fragmento de péptido (1-44) de la proteína de HMGB1 se desarrolló en consideración de la retención de la actividad de reclutamiento de células madre mesenquimales de médula ósea. A las 6, 24, 48, 72 y 96 horas después de producirse el infarto, el fragmento de péptido de la proteína HMGB1 (1-44) (5 µg/300 µl), o 300 µl de PBS (grupo de control negativo) fue administrado cinco veces en la vena caudal. Los ratones fueron sometidos a eutanasia mediante la administración de ketamina y xilacina en exceso, y sus corazones fueron extraídos. Después de que los tejidos fueron incorporados en compuesto OCT, se prepararon criosecciones de 5 µm de grosor. Los estudios inmunohistológicos se llevaron a cabo como sigue utilizando un anticuerpo PDGFRα anti-ratón. El anticuerpo Alfa Receptor Anti-PDGF de Conejo PDGFRα (Abcam, AB61219) fue utilizado como el anticuerpo primario. El Anticuerpo Anti-conejo Caprino Alexa 555 (sondas moleculares) se utilizó como el anticuerpo secundario, y 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sondas Moleculares) se utilizó para tinción nuclear. Se utilizó el microscopio de escaneo láser confocal (FV300, Olympus) para fotografiar. En relación al número de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea acumuladas en el tejido, se determinó el número de células positivas para ambos GFP y PDGFRα presentes en todas las áreas de las 5 secciones seleccionadas aleatoriamente y se calculó el valor medio. Además, RNA fue extraído del tejido del miocardio utilizando el Kit RNeasy (Qiagen) y se obtuvo cADN por reacción de transcripción inversa utilizando la Transcriptasa Inversa Omniscript (Qiagen). El tiempo real PCR se llevó a cabo con el Sistema Gene Amp(R) PCR 9700 (Life Technologies Japan) utilizando el cADN antes mencionado como un patrón, y los niveles de TNFα e IL-1β mRNA se determinaron como una relación al nivel GAPDH mRNA. La mejora en la función cardíaca se evaluó midiendo el diámetro final diastólico ventricular izquierdo (LVDd: Dd), diámetro final sistólico ventricular izquierdo (LVDs: Ds), y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF- EF) utilizando el Sistema Vivid 7 de Ecocardiografía y Transductor 12-MHZ (General Electric).

Mediante la administración sistémica del fragmento del péptido de la proteína HMGB1 (1-44), las células mesenquimales derivadas de médula ósea de PDGFRα-positivo fueron reclutadas significativamente en todas las áreas de sitios de no infarto, sitios límite, y sitios del infarto en el día 7 después de producirse el infarto (sitio de no infarto: fragmento parcial de la proteína HMGB1 (péptido 1-44),  $52 \pm 11\#^*$ ; control negativo,  $32 \pm 9$  células/mm<sup>2</sup>, N=4 cada uno, #P<0.05 vs. control negativo) (Figura 1A). Además, en el grupo del fragmento de péptido de proteína HMGB1 (1-44), los niveles de citoquinas inflamatorias (TNFα, IL-1β) en sitios de no infarto fueron significativamente bajos (TNFα: fragmento de péptido de la proteína HMGB1 (1-44),  $4 \pm 2\#^*$ , control negativo,  $11 \pm 3$  GAPDH; N= 4 cada uno, #P<0.05 vs. control negativo), (IL-1β: fragmento parcial de proteína HMGB1 (1-44 péptido),  $2 \pm 1\#^*$ , control negativo,  $6 \pm 1$  GAPDH; N=4 cada uno, #P<0.05 vs. control negativo) (Figuras 1C, 1D). El examen ultrasónico del corazón en el día 56 reveló que la disfunción sistólica del ventrículo izquierdo después del infarto de miocardio fue significativamente suprimido en el grupo del fragmento de péptido de la proteína HMGB1 (1-44) (EF: fragmento de péptido de la proteína HMGB1 (1-44) (N = 8),  $26 \pm 4\#^*$ ; control negativo (N = 16),  $20 \pm 4\%$ , #P<0.05 vs. control negativo). Además, el agrandamiento del ventrículo izquierdo se suprimió significativamente en el grupo del fragmento del péptido de la proteína HMGB1 (1-44) (DD: fragmento de péptido de la proteína HMGB1 (1-44) (N = 8),  $5.8 \pm 0.2\#^*$ , control negativo (N = 16),  $6.3 \pm 0.2$  mm, #P<0.05 VS. control negativo) (Figura 1E).

En la presente investigación, se demostró que la administración de cinco días del fragmento de péptido de la proteína HMGB1 (1-44) recluta células madre mesenquimales de médula ósea PDGFRα-positivo al sitio del infarto y su región cercana en la etapa aguda (Día 7) después de producirse el infarto (Figuras 1A, 1B). En particular, se demostró que la administración del fragmento de péptido (1-44) mejora el reclutamiento de células madre mesenquimales de PDGFRα-positivo al tejido del miocardio del sitio de no infarto. Las células madre mesenquimales de médula ósea se conocen por tener un efecto supresor de la inflamación y un efecto regenerativo del tejido. En el presente Ejemplo, se encontró también que suprimen las reacciones inflamatorias (Figuras 1C, 1D). Además, la administración del fragmento del péptido de HMGB1 (1-44) significativamente suprimieron el agravamiento de la función sistólica del ventrículo izquierdo, el agrandamiento del ventrículo izquierdo, y reestructuración del ventrículo izquierdo. Se observó también mejora significativa a largo plazo de la función del miocardio (Figura 1E).

### **Aplicabilidad Industrial**

La presente invención se basa en un fragmento de péptido de HMGB1 que retiene la actividad de reclutar células PDGFRα-positivo para utilizar en el tratamiento de infarto de miocardio. Tale fragmento de péptido puede producirse por medio de síntesis química utilizando sintetizadores péptidos, y por tanto se espera que mejore la pureza, se proporcione una producción estable, y se reduzcan costos en la situación de producción de péptidos como

farmacéuticos.

Más aún, se sabe que la longitud total de HMGB1 tiene una actividad para unirse a lipopolisacáridos (LPS) los cuales son un tipo de endotoxina. La contaminación de incluso una cantidad residual de LPS en farmacéuticos ocasiona fiebre y tales cosas, y a menudo resulta en serios efectos laterales. Por tanto, la contaminación de LPS en farmacéuticos es estrictamente regulada. Como HMGB1 tiene afinidad para LPS, es difícil eliminar LPS completamente de farmacéuticos contaminados con los mismos. Sin embargo, al hacer HMGB1 en péptidos se reduce su afinidad a LPS, y por tanto se espera que reduzca la contaminación de LPS en farmacéuticos. Por consiguiente, utilizando un fragmento de HMGB1 que comprende la porción para reclutar células PDGFR $\alpha$ -positivo como se especificó en la presente invención es posible desarrollar composiciones farmacéuticas más seguras para tratar infarto de miocardio.

La administración directa del fragmento de péptido de HMGB1 empleado de acuerdo con la presente invención al sitio del infarto de miocardio que necesita regenerarse, o a la proximidad del mismo, puede inducir o mejorar la regeneración del sitio del infarto o el tejido dañado por el infarto. Además, la regeneración del infarto de miocardio puede ser inducida o mejorada administrando el fragmento de péptido de HMGB1 empleado de acuerdo con la presente invención a un sitio diferente del sitio que necesita regeneración por medios tal como administración intravenosa. Y es así, que la presente invención habilita el tratamiento del infarto de miocardio con administración intravenosa, lo cual es ampliamente llevado a cabo en la práctica general; y por tanto, los agentes terapéuticos pueden ser administrados de manera fácil y segura en concentraciones arbitrarias por un número de veces arbitrarios. Este hecho es uno de los aspectos extremadamente superiores de la presente invención en comparación con métodos terapéuticos convencionales.

En la práctica actual de medicina regenerativa o terapia celular, las células madre pluripotentes de médula ósea limitadas derivadas de pacientes son cultivadas ex vivo y utilizadas para terapias después de la proliferación; sin embargo, debido al proceso de cultivación corre el riesgo de deterioro celular (canceración o contaminación de bacterias, virus, y similares), se requiere el control de seguridad suficiente. En contraste, los agentes terapéuticos basados en la presente invención no incluyen el paso de tomar células fuera del cuerpo o el paso de incluir operación manual, y por tanto, se cree que son relativamente seguras. Este hecho también es uno de los aspectos superiores de la presente invención en comparación a métodos terapéuticos convencionales.



## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Genomix Co., Ltd.  
Osaka University
- 5 <120> Método novedoso para tratar infarto cardiaco utilizando fragmento de HMGB1  
<130> SI01P005WOEP  
  
<150> JP 2012-235785  
<151> 2012-10-25  
  
<160> 3
- 10 <170> PatentIn version 3.5  
  
<210> 1  
<211> 215  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- 15 <400> 1  
Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
1 5 10 15  
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu His Lys Lys Lys His Pro  
20 25 30  
20 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  
25 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  
30 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  
35 145 150 155 160  
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  
40 Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu  
195 200 205  
Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
210 215
- <210> 2  
45 <211> 648  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens
- <400> 2  
atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatatgc atttttgtg 60  
50 caaactgttc gggaggagca taagaagaag caccagatg cttcagtcaa cttctcagag 120  
ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaattt 180  
gaagatatgg caaaagcgga caaggccgt tatgaaagag aaatgaaaac ctatatccct 240  
cccaaagggg agacaaaaa gaagttcaag gatccaatg cacccaagag gcctccttg 300  
gccttcttc tcttctgctc tgagtatgc ccaaaaatca aaggagaaca tcttgccctg 360  
55 tccattggtg atgttgcaa gaaactggga gagatgtgga ataactatgc 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  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Una secuencia de péptido sintetizado artificialmente

<400> 3  
 10 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  
 35 40  
 15

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento del infarto de miocardio, en donde la composición comprende un fragmento de péptido de HMGB1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3.

Células PDGFR $\alpha$ -positivo y GFP-positivo

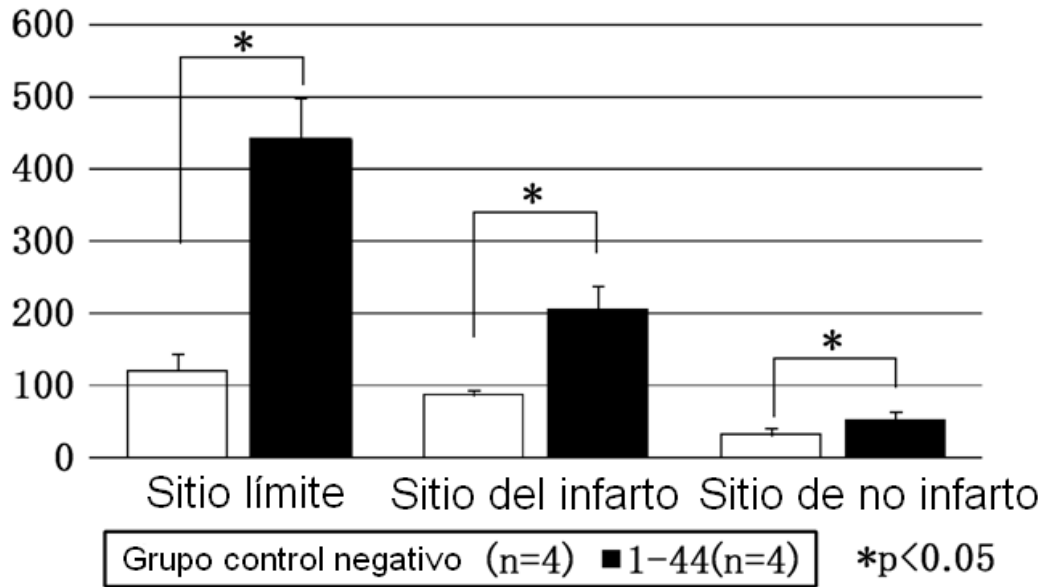


FIG. 1A

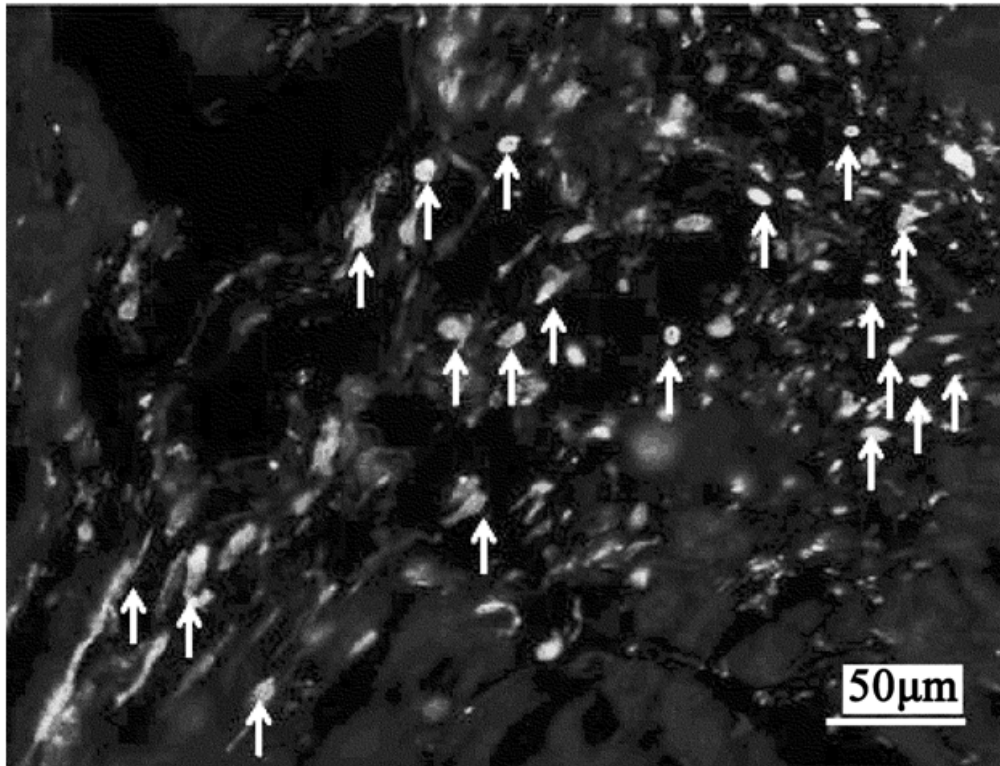


FIG. 1B

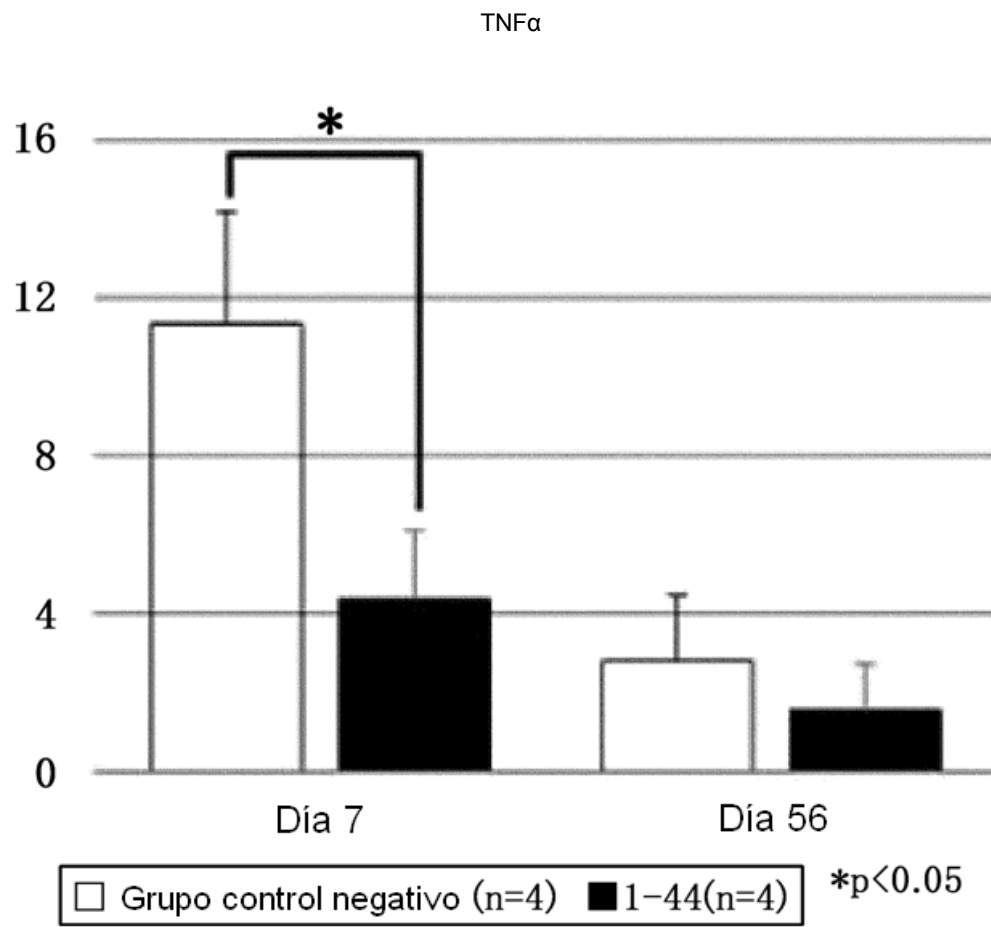


FIG. 1C

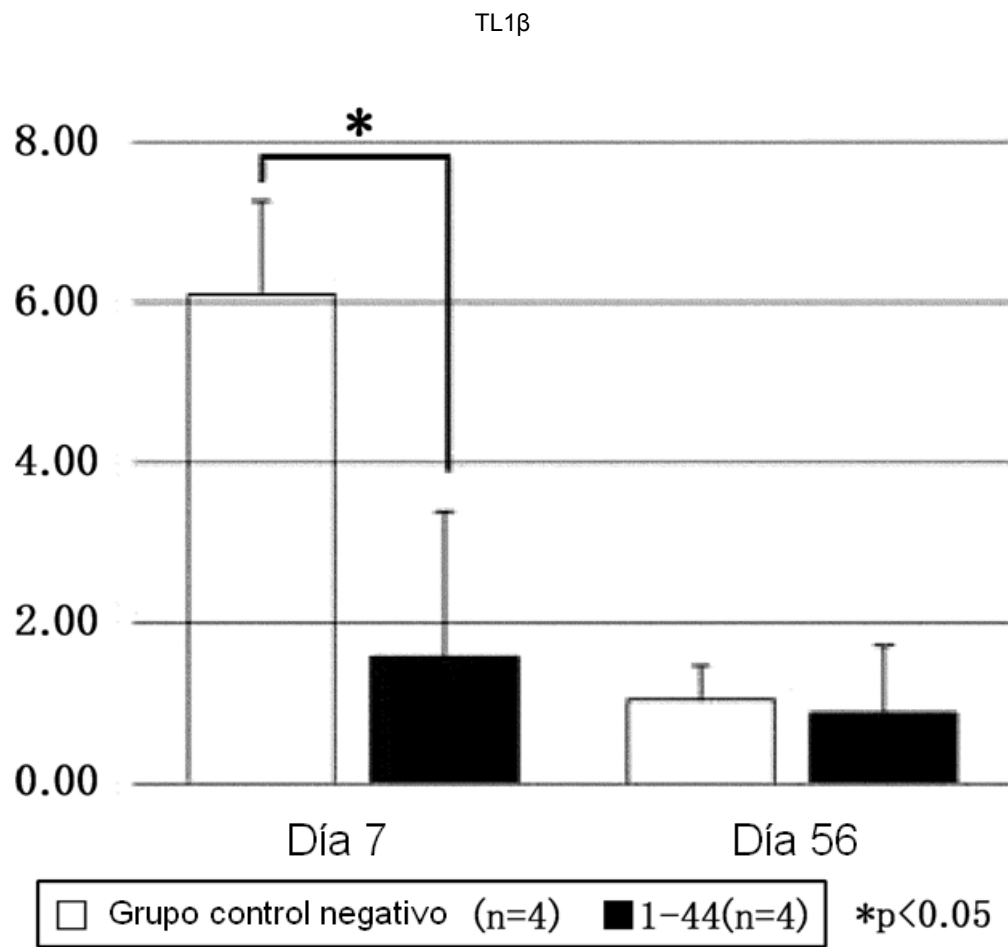


FIG. 1D

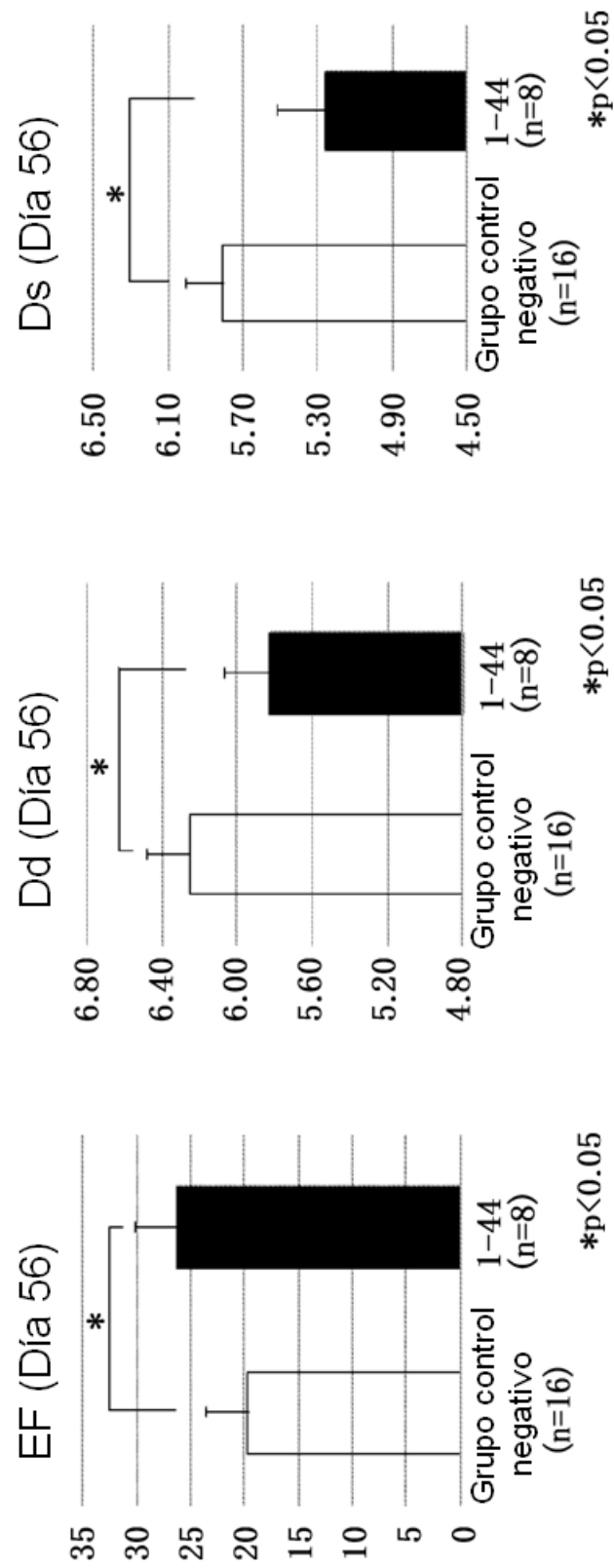


FIG. 1E