

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 861**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2013** **PCT/JP2013/078759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014** **WO14065348**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2013** **E 13849823 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 2913059**

54 Título: **Método novedoso para tratar el daño a la médula espinal utilizando el fragmento de hmgb1**

30 Prioridad:

25.10.2012 JP 2012235786

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

26.06.2018

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 y
CUI, WENHAO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 673 861 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 el daño a la médula espinal utilizando el fragmento de hmgb1

Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticas terapéuticas novedosas para su uso en el tratamiento de daño de la médula espinal las cuales comprenden un fragmento de HMGB1 tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

- 10 Las células madre mesenquimales de médula ósea son células madre *in vivo* pluripotentes, y se sabe que se diferencian en osteoblastos, adipocitos, cartílago y similares. Recientemente, está comenzando a reportarse que en pacientes con daño al tejido tal como infarto cerebral, la administración de sus propias células madre mesenquimales de médula ósea pueden promover la curación del daño al tejido.

- 15 Sin embargo, debido a que las células madre mesenquimales de médula ósea son células limitadas en la médula ósea, existe un límite para la cantidad que puede ser extraída de un paciente. Por tanto, es difícil obtener la cantidad de células madre mesenquimales de médula ósea necesarias para el tratamiento de un amplio rango de daños al tejido. Actualmente, se adoptó el método de cultivo de las células madre mesenquimales de médula ósea para proliferación para asegurar el número de células necesarias para el tratamiento. Sin embargo, es muy difícil cultivar células madre mesenquimales de médula ósea mientras se mantiene su estado indiferenciado. Más aún, existen muchos problemas asociados por resolverse, tal como contaminación y canceración de células viral y bacteriana. Además, el costo por cultivar células que son garantizadas con seguridad y calidad es inmensa.

- 20 Por otra parte, se sabe que las células madre mesenquimales de médula ósea tienen un efecto de facilitar la curación de la médula espinal también. Esto se asume que se presenta de la diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea pluripotentes en células nerviosas, y suministro de componentes que tienen un efecto de mejorar el daño al tejido tal como factores de crecimiento por células madre mesenquimales de médula ósea acumuladas en los tejidos dañados.

- 25 El documento WO2009/133939, documento de patente 3, se relaciona con un método de regeneración neuronal para el daño a la médula espinal y el cerebro utilizando HMGB1.

El documento WO2004/046345, documento de patente 7, divulga composiciones que comprenden un cuadro HMGB A, y el uso de tales composiciones en métodos para inhibir la liberación de una citocina proinflamatoria a partir de una célula, o para inhibir la cascada de citocinas inflamatorias.

- 30 Muller *et al.*, documento de no patente 4, resume la función de HMGB1 en la inflamación, migración de células y crecimiento de neuritas.

Ulloa *et al.*, documento de no patente 15, resume la relación estructural-funcional de HMGB 1.

Kikuchi *et al.*, documento de no patente 16, divulga el tratamiento del daño a la médula espinal con anticuerpos monoclonales anti-HMGB1 para inhibir la inflamación.

- 35 Venereau *et al.*, documento de no patente 17, discute la actividad inducida por quimiocinas y la actividad quimioattractora de HMGB1.

Dong *et al.*, documento de no patente 18, divulga que HMGB1 no media en la respuesta inflamatoria en la regeneración espontánea de la médula espinal y sugiere que HMGB1 promueve la regeneración del SNC.

Documentos de técnica anterior

- 40 **Documentos de Patente**

Documento de Patente 1, WO2008/053892

Documento de Patente 2, WO2007/015546

Documento de Patente 3, WO2009/133939

Documento de Patente 4, WO2009/133943

Documento de Patente 5, WO2009/133940

Documento de Patente 6, WO2004/004763

Documento de Patente 7, WO2004/046345

Documentos de No Patente

- 5 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
- 10 Documento de no patente 6, Germani *et al.*, J Leukoc Biol., 81(1): 41-5, 2007
- 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
- 15 Documento de no patente 11, Yang *et al.*, J Leukoc Biol., 81(1): 59-66, 2007
- Documento de no patente 12, Basso *et al.*, J Neurotrauma., 23(5): 635-659, 2006
- Documento de no patente 13, Rahimi-Movaghar *et al.*, Int J. Neurosci., 118(10): 1359-1373, 2008
- Documento de no patente 14, Quertainmont R *et al.*, PloS One., 7(6):e39500,2012
- Documento de no patente 15, Ulloa *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev., 17(3) : 189-201, 2006
- 20 Documento de no patente 16, Kikuchi *et al.*, Exp Ther Med, 2(5): 767-770, 2011
- Documento de no patente 17, Venereau *et al.*, J Exp Med, 209(9): 1519-28, 2012
- Documento de no patente 18, Dong *et al.*, J. Biol. Chem., 288(25): 18204-18, 2013

Sumario de la invención

Problemas que van a resolverse por medio de la invención

- 25 El daño a la médula espinal es una enfermedad en donde los pacientes experimentan pérdida extrema de calidad de vida tal como dificultad al caminar debido a la parálisis de la mitad baja del cuerpo. Sin embargo, no puede esperarse la recuperación espontánea y métodos de tratamiento efectivos no han sido establecidos. Como se describió anteriormente, en la actualidad, hay esperanzas en la aplicación de medicina regenerativa tal como terapia celular para el tratamiento del daño en la médula espinal, pero todavía está en el proceso de desarrollo. Además, incluso si es puesto
- 30 para uso práctico, el problema del extenso gasto médico no ha sido resuelto.

Sin embargo, si la curación de la médula espinal puede promoverse mediante la administración de un fármaco que tenga una actividad de movilización de las células madre mesenquimales de médula ósea al sitio dañado, se espera que métodos terapéuticos seguros y no caros se puedan proporcionar a pacientes con daño en la médula espinal para lo cual métodos efectivos de tratamiento difícilmente existen en la actualidad.

Medios para resolver los problemas

A la fecha, los presentes inventores han revelado que el Grupo de Alta Movilidad Cuadro 1 (HMGB1) es una proteína que tiene una actividad de estimulación de migración de células madre mesenquimales en la médula ósea y movilización de las células en la sangre. El HMGB1 es primariamente conocido por ser un mejor componente de una proteína nuclear no histona, y tiene dos dominios de unión a ADN, Cuadro A y Cuadro B, en la molécula. Más aún, una función conocida

de HMGB1 en el núcleo es relajar la estructura del nucleosoma y formar una estructura óptima para la reacción de transcripción. Sin embargo, en años recientes, se ha vuelto claro que la proteína nuclear HMGB1 es secretada al exterior de las células para ejercer varias actividades, incluso si no tiene una señal de secreción. La investigación de esta función como un mediadora de inflamación está más avanzada. Por ejemplo, en un modelo de sepsis en ratón (modelo de administración LPS), se encontró que la HMGB1 secretada de macrófagos debido a la estimulación de TNF α es una mediadora de sepsis (Wang *et al.*: Science 1999; 285: 248-251), y se sabe que TLR4 es un receptor candidato. Además, el receptor más conocido de HMGB1 es RAGE; y la unión entre este receptor y HMGB1 se ha reportado que influencia la actividad de migración de células y transducción de señal inflamatoria.

La presente invención describe composiciones farmacéuticas terapéuticas novedosas para su uso en el tratamiento de daño a la médula espinal las cuales comprenden un fragmento de HMGB1.

Específicamente, los presentes inventores produjeron un péptido que consiste de los aminoácidos en posiciones 1 a 44 de la proteína HMGB1 (SEC ID NO: 5), y un fragmento de HMGB1 que consiste de los aminoácidos en las posiciones 11 a 44 (SEC ID NO: 4) por síntesis del péptido. Cada uno de los fragmentos producidos de HMGB1 fue administrado a ratones modelo enfermos que habilitan la evaluación de efectos terapéuticos en el daño de la médula espinal, y se confirmaron efectos terapéuticos en los fragmentos con daño de la médula espinal.

En base a estos hallazgos, la presente solicitud proporciona la siguiente invención:

[1] una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de daño en la médula espinal, la cual comprende un fragmento de péptido de HMGB1 seleccionado del grupo que consiste de:

a) un fragmento de péptido que comprende al menos el fragmento de péptido de la SEC ID NO: 3 con el límite superior siendo el fragmento de péptido que consiste del péptido de la SEC ID NO: 4;

b) un fragmento de péptido que comprende al menos el fragmento de péptido de la SEC ID NO: 4 con el límite superior siendo el fragmento de péptido que consiste del péptido de la SEC ID NO: 5; y

c) un fragmento de péptido que comprende al menos el fragmento de péptido de la SEC ID NO: 3 con el límite superior siendo el fragmento de péptido que consiste del péptido de la SEC ID NO: 5;

[2] la composición farmacéutica para su uso de [1], en donde el fragmento del péptido es un péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y SEC ID NO: 5.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A, muestra fotografías que indican la actividad de estimulación-migración de varios péptidos sintéticos en las células madre mesenquimales de médula ósea de PDGFR α -positivo establecidas. Todos los fragmentos de péptidos que contienen el fragmento más pequeño, el fragmento de péptido de HMGB1 (17-25), muestran la actividad de estimulación-migración celular.

La figura 1B, es una fotografía que muestra la actividad de estimulación-migración del fragmento de péptidos de HMGB1 con diferentes longitudes en células madre mesenquimales de médula ósea de PDGFR α -positivo establecidas. Cada péptido fue preparado por medio de síntesis del péptido. La gráfica acompañante muestra la actividad de estimulación-migración celular cuantificada de cada fragmento de péptido. Este experimento muestra que el fragmento de péptido de HMGB1 (17-25) es el fragmento más pequeño con actividad de estimulación-migración.

La figura 2A, muestra que los efectos significantes de mejorar los síntomas neurológicos se observaron en el grupo administrado con el fragmento de HMGB1 (11-44) en comparación con el grupo de control negativo (administrado con PBS). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ VS. PBS)

La figura 2B, muestra la tinción HE de la médula espinal. El tamaño del área del daño de la médula espinal disminuyó en el grupo administrado con el fragmento HMGB1 (11-44) en comparación a ese del grupo de control negativo (administrado con PBS), y se observaron también los efectos terapéuticos en los tejidos patológicos.

La figura 3, es una gráfica que compara el grupo administrado con la longitud completa de HMGB1 y el grupo administrado con el fragmento de HMGB1 para el efecto de mejorar los síntomas neurológicos en animales modelo enfermos inflingidos con daño a la médula espinal con el paso del tiempo.

La figura 4, es una gráfica que compara los grupos administrados con el fragmento de HMGB1 (11-44 Y 1-44) para el efecto de mejorar los síntomas neurológicos en animales modelo enfermos inflingidos con daño a la médula espinal (#1-44, # $p < 0.05$ VS. PBS; *11-44, * $p < 0.05$ VS. PBS).

Modo para llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de daño a la médula espinal, las cuales comprenden un fragmento de péptido de HMGB1 que tiene actividad de estimulación-migración celular. En la presente, las composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de daño de la médula espinal de la presente invención también están expresadas como medicamentos, agentes farmacéuticos, o composiciones medicinales.

En la presente invención, “daño a la médula espinal” significa daño extrínseco o intrínseco de la médula espinal. El daño extrínseco de la médula espinal incluye, por ejemplo, daño traumático de la médula espinal, pero no se limita a ello. Aquí, el daño extrínseco de la médula espinal puede estar expresado simplemente como “daño a la médula espinal”.

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

Las composiciones farmacéuticas para su uso de la presente invención pueden ser administradas/adicionadas a cualquier sitio. Esto es, las composiciones para su uso pueden ejercer sus efectos sin importar en cual sitio son administradas, tal como un sitio de daño de la médula espinal que necesite de regeneración, un sitio diferente al sitio de lesión, o sangre. Por ejemplo, cuando las composiciones para su uso son administradas/adicionadas, 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 las composiciones para su uso son administradas/adicionadas a un sitio de lesión o a la cercanía del mismo, las células son reclutadas a la lesión, induciendo así o promoviendo la regeneración de la lesión. Además, por ejemplo, cuando las composiciones para su uso son administradas/adicionadas a un tejido diferente a un tejido que necesite de regeneración, las células de médula ósea son movilizadas desde la médula ósea al tejido que necesita de regeneración a través de la circulación periférica, induciendo de ese modo o promoviendo la regeneración del tejido. Aquí, la “circulación periférica” es también llamada “circulación sanguínea” o “flujo sanguíneo de circulación periférica”.

La administración a un tejido diferente a un tejido que necesite de regeneración se refiere a la administración a un sitio que no es un sitio que necesite de regeneración (un sitio diferente al sitio que necesite de regeneración). Por consiguiente, “un tejido diferente a un tejido que necesite de regeneración” también puede estar referido como:

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

Por tanto, las composiciones para su uso de la presente invención son efectivamente utilizadas para regenerar tejidos a los cuales es difícil administrar directamente agentes farmacéuticos desde el exterior del cuerpo. Ejemplos del tejido diferentes a un tejido que necesite de regeneración incluye tejidos sanguíneos, tejidos musculares, tejidos subcutáneos, tejidos intradérmicos, cavidad abdominal, y similares.

En la presente divulgación, las células que son estimuladas para migrar o células movilizadas de la médula ósea a la sangre periférica incluyen células indiferenciadas y células en varias etapas de diferenciación, pero no se limitan a ello. En la presente divulgación, 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 se limitan a ello. Las células madre incluyen células madre circulatorias y células madre no circulatorias. Las células madre no circulatorias son, por ejemplo, células madre que residen en un tejido. Las 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 se limitan a ello. En la presente especificación, “células madre hematopoyéticas” son células madre que pueden diferenciarse en las células de la sangre tales como glóbulos rojos, plaquetas, mastocitos, y células dendríticas, así como glóbulos blancos que incluyen neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos, macrófagos, y similares. Sus marcadores son conocidos por ser 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 necesitan ser co-cultivadas con células estromáticas.

En la presente especificación, “células de médula ósea” se refieren a las células presentes dentro de la médula ósea

mientras que “células derivadas de médula ósea” se refieren a “células de médula ósea” movilizadas de la médula ósea al exterior de la médula ósea. Las “células de médula ósea” incluyen células que contienen poblaciones de células progenitoras de tejido presentes dentro de la médula ósea. Además, las “células derivadas de médula ósea” pueden ser células que contienen mesoangioblastos o células libres de mesoangioblastos.

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

10 En la presente, “células madre 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 otros tejidos (sangre, piel, grasa, y otros tejidos), y pueden ser cultivadas y proliferadas como células adherentes en una placa de cultivo (hecha de plástico o vidrio). Estas células se caracterizan por tener un potencial para diferenciarse en tejidos mesenquimales tales como huesos, cartílago, y grasa (células madre mesenquimales, o en músculo esquelético, músculo del corazón, tejidos nerviosos, y tejidos epiteliales (células madre pluripotentes), y pueden obtenerse por medio de la extracción de células de médula ósea.

20 Las “células de médula ósea” y “células derivadas de médula ósea” son células madre hematopoyéticas y células diferenciadas derivadas a partir de estas tales como leucocitos, eritrocitos, plaquetas, osteoblastos, y fibrocitos, o son células madre representadas por células las cuales han sido llamadas hasta ahora 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 divulgación, las células estimuladas para migrar a células movilizadas de la médula ósea a sangre periférica incluyen “células madre derivadas de médula ósea”, pero no se limitan a ello. “Células de médula ósea” y “células derivadas de médula ósea” pueden aislarse por medio de la extracción de médula ósea (extracción celular de médula ósea) o extracción de sangre periférica. Las células madre hematopoyéticas no son adherentes, mientras algunas de las “células de médula ósea” y “células derivadas de médula ósea” son obtenidas como células adherentes por medio de un cultivo celular de una fracción monocita de sangre obtenida por la extracción de médula ósea (extracción celular de médula ósea) o extracción de sangre periférica.

30 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 tinción positiva azul alciano, tinción positiva 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 keratinocitos 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 diferenciar las células de órganos parenquimáticos tal como, riñón, y páncreas también está incluido.

40 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 grasas, tejidos epiteliales tales como piel, o tejidos nerviosos tal como el cerebro.

45 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.

50 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 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.

- 5 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 α -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.

- 10 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 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 aislada. Los marcadores para células de médula ósea de ratón y células derivadas de médula ósea de ratón incluyen, por ejemplo, todo o algo de lo siguiente pero sin limitarse a ello: CD44-positivo, PDGFR α -positivo, PDGFR β -positivo, CD45-negativo, Lin-negativo, Sca-1-positivo, c-kit-negativo, CD90-positivo, CD29-positivo, y Flk-1-negativo.

- 15 En la presente divulgación, las células estimuladas para migrar incluyen células positivas PDGFR α -positivo, pero no se limitan a ello. Además, las células PDGFR α -positivo estimuladas para migrar no están limitadas particularmente, sino preferentemente son células PDGFR α -positivo derivadas de médula ósea. Más aún, los marcadores diferentes a PDGFR α 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 α -positivo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, células derivadas de médula ósea de PDGFR α -positivo, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de PDGFR α -positivo, las células de tejido residente en tejidos de PDGFR α -positivo (por ejemplo, fibroblastos y similares), las células derivadas de médula ósea de PDGFR α -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.

- 20 La proteína de HMGB1 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.

- 25 En la presente divulgación, "un péptido de fragmento de HMGB1 que tiene una actividad de estimulación de migración celular" se refiere a un péptido que consiste de una porción de una proteína de HMGB1 y que tiene una actividad de estimulación de migración celular. Los fragmentos de péptido que consisten de una porción de la proteína de HMGB1 de la presente divulgación son un fragmento de péptido de HMGB1 que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de las posiciones 17 a 25 de la proteína HMGB1 (SEC ID NO: 3), la cual está confirmada por experimentos llevados a cabo por los presentes inventores que es el fragmento de péptido más pequeño entre los fragmentos con actividad de estimulación de migración celular (Figura 1).

En la presente invención los péptidos que consisten de un fragmento de HMGB1 que tienen una actividad de estimulación-migración celular son los fragmentos a continuación.

- 30 En la presente invención, los fragmentos de HMGB1 los cuales tienen una actividad de estimulación-migración celular son un fragmento de péptido que comprende al menos el fragmento de péptido (17-25) de la SEC ID NO: 3 con el límite superior siendo el fragmento de péptido (11-44) que consiste del péptido de la SEC ID NO: 4; un fragmento de péptido que comprende al menos el fragmento de péptido (11-44) de la SEC ID NO: 4 con el límite superior siendo el fragmento de péptido (1-44) que consiste del péptido de la SEC ID NO: 5; o un fragmento de péptido que comprende al menos el fragmento de péptido (17-25) de la SEC ID NO: 3 con el límite superior siendo el fragmento de péptido (1-44) que consiste del péptido de la SEC ID NO: 5.

- 35 En la presente invención, los fragmentos de péptidos de HMGB1 los cuales tienen una actividad de estimulación-migración celular incluyen, por ejemplo, un fragmento de péptido que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y SEC ID NO: 5, el cual es un fragmento de péptido de HMGB1 que tiene actividad de estimulación-migración celular.

Los métodos para administrar una composición para su uso 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 para su uso 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).

5 Los métodos para administrar una composición para su uso 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.

10 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 limitado al mismo.

15 El método de administración puede seleccionarse apropiadamente conforme a la edad y los síntomas del paciente. Cuando un péptido empleado de acuerdo con 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. Sin embargo, la dosis de composiciones farmacéuticas para su uso de la presente invención no está limitada al mismo.

20 Los fragmentos de péptidos de HMGB1 empleadas de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse como recombinantes incorporando un ADN que codifica el péptido en un sistema de expresión apropiada, o se puede sintetizar artificialmente. Las composiciones farmacéuticas para su uso de la presente invención pueden 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 isotonzante, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, impulsores de flujo, y agentes saborizantes, aunque no están limitados a ellos 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 polioxietileno 60, azúcar blanca, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, y sales inorgánicas.

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

Ejemplo 1

Evaluación de péptidos sintéticos para actividad de promoción-migración

Métodos

35 Los péptidos enlistados más adelante fueron sintetizados a medida utilizando el método de fase sólida por Medical & Biological Laboratories (MBL). Los péptidos fueron sintetizados en base a la secuencia HMGB1 de ratón. Las secuencias de aminoácidos de las posiciones 1 a 169 de HMGB1 de ratón y HMGB1 humano son idénticos, es decir, comparten 100% de homología secuencial.

Un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 10 de HMGB1 (1-10);

40 Un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 34 de HMGB1 (1-34);

Un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 11 a 20 de HMGB1 (11-20);

Un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 11 a 25 de HMGB1 (11-25);

Un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 11 a 30 de HMGB1 (11-30);

Un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 11 a 34 de HMGB1 (11-34);

45 Un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 11 a 44 de HMGB1 (11-44); y

la longitud total de HMGB1 de ratón producida en HEK293 (1-215(HEK)) como un control positivo fueron ajustados a 100 µg/ml y colocados en la cámara inferior de una cámara de quimiotaxis para evaluar la actividad de promoción-migración

en la línea de célula madre mesenquimal de médula ósea de ratón (célula MSC-1; producido por Osaka University, Tamai et al., (Tamai et al., Proc Natl Acad Scie U S A., 108(16): 6609-6614,2011)).

Resultados

Al menos los péptidos sintéticos (11-34), (1-34), (11-44), y (11-30) se encontró que tienen la actividad comparable a o más alta que esa del control positivo (Figura 1A). Más aún, el péptido sintético (11-25) también se encontró que tiene la actividad (Figura 1A).

Métodos

Con el fin de limitar la ubicación del centro activo, los péptidos más cortos enlistados a continuación fueron sintetizados.

- un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 11 a 25 de HMGB1 (11-25),
- un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 12 a 25 de HMGB1 (12-25),
- un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 13 a 25 de HMGB1 (13-25),
- un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 14 a 25 de HMGB1 (14-25),
- un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 15 a 25 de HMGB1 (15-25),
- un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 16 a 25 de HMGB1 (16-25), y
- un péptido sintético que consiste de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 17 a 25 de HMGB1 (17-25).

Como controles positivos, se utilizaron el sobrenadante centrifugado de la piel de un ratón de un día de edad (uno individual) incubado en PBS a 4°C por 12 horas, y la longitud total de HMGB1 de ratón producido en HEK293 (1-215(HEK)). Las células de una línea de células madre mesenquimales de médula ósea (MSC-1) fueron colocadas en la cámara superior de una cámara de quimiotaxis, y la proteína y péptidos sintéticos se adicionaron en una concentración de 5 µM o 10µM a la cámara más baja de la cámara de quimiotaxis. El ensayo de migración se llevó a cabo por el mismo método como se describió antes.

Resultados

Se encontró que todos los péptidos sintéticos tienen -actividad (Figura 1B). El fragmento de péptido de HMGB1 (17-25) se mostró que es el fragmento más pequeño que tiene la actividad de estimulación-migración.

Ejemplo 2

Métodos

Ratones hembras de siete semanas de edad C57BL6/J se utilizaron como animales de prueba. Después de que los ratones fueron anestesiados por inhalación de isoflurano, se hizo una incisión en la piel a lo largo de la línea dorsal, y el arco vertebral de la novena vértebra torácica fue expuesta y extirpada. La duramadre fue expuesta en el mismo sitio, y la médula espinal se mantuvo epiduralmente por tres segundos utilizando un soporte de micro aguja para producir un daño traumático de la médula espinal. Después de generar el daño de la médula espinal, la piel fue suturada. El daño a la médula espinal se confirmó al día siguiente de la operación por medio de la evaluación de parálisis de ambas extremidades, y los ratones que no mostraron parálisis fueron excluidos del ensayo. El reactivo del ensayo se preparó diluyendo 100µg de un fragmento de HMGB1 (secuencia de aminoácidos: aminoácidos de posiciones 11 a 44; péptido sintetizado producido en MBL) en 200 µL de PBS de Dulbecco (D-PBS). 200 µL de D-PBS fue utilizado para el control negativo. Al siguiente día de operación, se llevó a cabo la primera administración por medio de la vena caudal, y esto fue seguido por un total de cinco administraciones diarias. Los síntomas neurológicos fueron evaluados utilizando el resultado de la Escala de Basso para ratón (BMS) en los días 1, 3, 7, 10, 14, 17, y 21 después de la operación.

Resultados

En base a los resultados de BMS, se observó una mejora significativa de síntomas neurológicos a partir del día 3 después de la operación en el grupo administrado con el fragmento HMGB1 en comparación al grupo administrado con PBS. En particular, se observó la mejora destacable de síntomas en los días 3, 7, 14, y 17 después de la operación (Figura 2A). Más aún, mientras las imágenes de tinción HE de la región dañada de la médula espinal para el grupo de control negativo mostraron el daño en un rango amplio (D1), la región dañada (D2) se redujo para el grupo administrado con el fragmento de HMGB1 (11-44 péptido), y se observaron efectos terapéuticos histopatológicamente también (Figura 2B).

Discusión

Se observó una clara mejora de los síntomas neurológicos de ratones infligidos con daño a la médula espinal mediante la administración del fragmento de HMGB1. Se encontró actividad movilizadora de célula madre mesenquimal de médula ósea para los fragmentos de HMGB1 utilizados en este estudio, y fueron esperados los efectos terapéuticos de las células madre mesenquimales de médula ósea movilizadas en el daño a la médula espinal. Se espera que los efectos de las células madre mesenquimales de médula ósea en los daños al tejido sean regeneración del tejido mediante diferenciación en células nerviosas por pluripotencia, así como acción protectora de efectos de crecimiento, citoquinas, y tales secretados por las células madre mesenquimales de médula ósea en tejidos dañados. En el presente ensayo, los efectos a plazo corto hasta la primer semana después de la operación se pueden deber a esta última acción, y subsecuentemente, puede estar involucrada la acción anterior.

Ejemplo 3**Métodos**

Se utilizaron ratones hembras de siete semanas de edad C57BL6/J como animales de prueba. Después de que los ratones fueron anestesiados por medio de inhalación de isoflurano, se hizo una incisión en la piel a lo largo de la línea dorsal, y el arco vertebral de la novena vértebra torácica fue expuesta y extirpada. La duramadre fue expuesta en el mismo sitio, y la médula espinal se mantuvo epiduralmente por tres segundos utilizando un soporte de micro aguja para producir un daño traumático de la médula espinal. Después de generar el daño de la médula espinal, la piel fue suturada. El daño a la médula espinal se confirmó al día siguiente de la operación por medio de la evaluación de parálisis de ambas extremidades, y los ratones que no mostraron parálisis fueron excluidos del ensayo. Un fragmento de HMGB1 (secuencia de aminoácidos: los aminoácidos de las posiciones 11 a 44; péptido sintético producido en MBL) se preparó diluyendo 100 µg del fragmento en 200 µL de PBS de Dulbecco (D-PBS). La longitud total de la proteína HMGB1 se produjo expresándola en HEK293 como se reportó previamente, y la HMGB1 purificada (100 µg) se disolvió en 200 µL de D-PBS. 200 µL de D-PBS se utilizó para el control negativo. Al siguiente día de la operación, la primera administración se llevó a cabo a través de la vena caudal, y esto fue seguido por un total de cinco administraciones diariamente. Los síntomas neurológicos fueron evaluados utilizando el resultado de BMS en los días 1, 3, 7, y 14 después de la operación.

Resultados

Los efectos en la mejora de síntomas neurológicos se evaluó utilizando los resultados de BMS. La terapia fue más efectiva en el grupo administrado con el fragmento de HMGB1 (aminoácidos en las posiciones 11-44) en ambos días 7 y 14. Mientras se observó el efecto terapéutico en el grupo administrado con HMGB1 (longitud completa) al compararse a ese en el grupo de control negativo, este no fue efectivo como ese en el grupo administrado con el fragmento de HMGB1 (aminoácidos en las posiciones 11-44) (Figura 3).

Discusión

Después de producir daño en la médula espinal, en la etapa temprana, el efecto terapéutico en el grupo administrado con la longitud completa de HMGB1 se encontró que está intermedio entre el efecto en el grupo administrado con el fragmento de HMGB1 (aminoácidos en posiciones 11-44) y que en grupo de control negativo; sin embargo, por el día 14 después de la producción del daño de la médula espinal, se observó una mejora mucho muy satisfactoria del efecto terapéutico en el grupo administrado con el fragmento HMGB1 (aminoácidos en posiciones 11-44) que en otros grupos. Estos experimentos revelaron que en lugar de la proteína de longitud completa, los fragmentos muestran efectos terapéuticos mayores en daños a la médula espinal. Los péptidos que pueden sintetizarse químicamente, tal como este fragmento, puede ser extremadamente útil en aplicaciones prácticas, debido a que permiten la producción de productos homogéneos baratos en grandes cantidades en producción farmacéutica.

Ejemplo 4**Métodos**

Ratones hembras de siete semanas de edad C57BL6/J fueron utilizados como animales de prueba. Estos ratones fueron anestesiados por inhalación de isoflurano, se hizo una incisión en la piel a lo largo de la línea dorsal, y el arco vertebral de la novena vértebra torácica fue expuesta y extirpada. La duramadre fue expuesta en el mismo sitio, y la médula espinal se mantuvo epiduralmente por tres segundos utilizando un soporte de micro aguja para producir un daño traumático de la médula espinal. Después de generar el daño de la médula espinal, la piel fue suturada. El daño a la médula espinal se confirmó al día siguiente de la operación por medio de la evaluación de parálisis de ambas extremidades, y los ratones que no mostraron parálisis fueron excluidos del ensayo. Los fragmentos de HMGB1 (secuencias de aminoácidos de las posiciones 11 a 44 y aminoácidos de las posiciones 1 a 44; péptidos sintéticos

producidos en MBL) fueron preparados diluyendo 100 µg del fragmento en 200 µL de D-PBS. 200 µL de D-PBS se utilizaron para el control negativo. Al día siguiente de la operación, se llevó a cabo la primera administración mediante la vena caudal, y esto fue seguido por un total de cinco administraciones diariamente. Los síntomas neurológicos fueron evaluados utilizando el resultado de BMS en los días 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21, y 28 después de la operación.

5 **Resultados**

Los efectos en la mejora de síntomas neurológicos fueron evaluados utilizando los resultados de BMS. En comparación al grupo de control negativo, los efectos terapéuticos se observaron en los grupos administrados con el fragmento HMGB1 (aminoácidos en posiciones 11-44 y aminoácidos en posiciones 1-44) en los días 17, 21, y 28. El fragmento de HMGB1 que consiste de los aminoácidos de las posiciones 11 a 44 y el fragmento de HMGB1 consistente de los aminoácidos de las posiciones 1 a 44 tuvieron efectos terapéuticos comparables (figura 4).

Discusión

Se encontró que los fragmentos de HMGB1 11-44 y 1-44 eran efectivos en el tratamiento del daño de la médula espinal. Como se muestra en las figuras 1A-B, los presentes inventores explicaron que uno de los dominios de núcleo de HMGB1 para la actividad de reclutar células madre mesenquimales de médula ósea es un péptido que consiste de los aminoácidos de las posiciones 17 a 25. Ambos, el fragmento de 11-44 y el fragmento de 1-44 incluyen posiciones de 17 a 25, y el péptido de núcleo que muestra eficacia de estos péptidos está previsto que sea la secuencia de las posiciones 17 a 25. Se ha reportado que RAGE no está involucrado en la movilización de células madre mesenquimales de médula ósea por la proteína de longitud completa de HMGB1 (Tamai, 2011, PNAS; etc), y debido a que no hay reportes de que el fragmento 11-44 y el fragmento 1-44 sean ligandos para un receptor conocido tal como RAGE, se espera que estos fragmentos se dirijan a un receptor que es todavía desconocido.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona usos novedosos de fragmentos de péptidos de HMGB1 que retengan la actividad de reclutar células PDGFRα-positivo para tratar el daño a la médula espinal. Los fragmentos de péptidos de HMGB1 empleados de acuerdo con la presente invención son fragmentos de péptidos con un peso molecular de aproximadamente 20 por ciento o menos de la proteína de longitud completa de HMGB1 que consiste de 215 aminoácidos. Tales fragmentos de péptidos pueden ser producidos por medio de síntesis química utilizando sintetizadores péptidos, y por tanto se espera que mejoren la pureza, proporcionen producción estable, y reduzcan costos en la situación de producción de péptidos como farmacéuticos.

Más aún, se sabe que HMGB1 de longitud completa 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, hacer HMGB1 en péptidos reduce su afinidad a LPS, y por tanto se espera que se reduzca la contaminación de LPS en farmacéuticos. Por consiguiente, utilizando un fragmento de HMGB1 que comprende la porción para reclutar células PDGFRα-positivo como se especificó en la presente invención es posible desarrollar composiciones farmacéuticas más seguras para tratar daño a la médula espinal.

La administración directa del fragmento de péptido de HMGB1 empleado de acuerdo con la presente invención al sitio del daño a la médula espinal que necesita regenerarse, o a la proximidad del mismo, puede inducir o mejorar la regeneración de la lesión. Además, la regeneración de daño a la médula espinal puede ser inducida o mejorada administrando el fragmento 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 de daño a la médula espinal 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 se 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 para tratar el daño a la médula espinal con fragmentos de HMGB1
	<130>	G6-A1202P
10	<150>	JP 2012-235786
	<151>	2012-10-25
	<160>	5
15	<170>	PatentIn version 3.5
	<210>	1
	<211>	215
20	<212>	PRT
	<213>	Homo sapiens
	<400>	1
25		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
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
35		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
40		Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys 100 105 110
45		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
50		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
55		Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu 180 185 190
60		Asp Glu Glu Asp 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
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10
<400> 2
atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatatgc atttttgtg 60
caaactgtgc gggaggagca taagaagaag caccagatg cttcagtcaa cttctcagag 120

15
tttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaattt 180
gaagatatgg caaaagcggg caaggcccgt tatgaaagag aaatgaaaac ctatatccct 240

20
cccaaagggg agacaaaaaa gaagttaag gatcccaatg cacccaagag gcctccttcg 300
gccttctcc tcttctgctc tgagtatgc ccaaaaatca aaggagaaca tcctggcctg 360

25
tccattgggt atgttgcgaa gaaactggga gagatgtgga ataacactgc tgcagatgac 420
aagcagcctt atgaaaagaa ggctgcgaag ctgaaggaaa aatacgaaaa ggatattgct 480

30
gcatatcgag ctaaaggaaa gcctgatgca gcaaaaaagg gagttgtcaa ggctgaaaaa 540
agcaagaaaa agaaggaaga ggaggaagat gaggaagatg aagaggatga ggaggaggag 600

35
gaagatgaag aagatgaaga tgaagaagaa gatgatgatg atgaataa 648

40
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 3
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu

50
1 5

<210> 4
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55
<220>
<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 4
Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu
1 5 10 15

60
His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser
20 25 30

Lys Lys

5

<210> 5
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

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

<400> 5

15 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

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys
35 40

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de daño a la médula espinal, la cual comprende un fragmento de péptido de HMGB1 seleccionado del grupo que consiste de:
 - a) un fragmento de péptido que comprende al menos el fragmento de péptido de la SEC ID NO: 3 con el límite superior siendo el fragmento de péptido que consiste del péptido de la SEC ID NO: 4;
 - b) un fragmento de péptido que comprende al menos el fragmento de péptido de la SEC ID NO: 4 con el límite superior siendo el fragmento de péptido que consiste del péptido de la SEC ID NO: 5; y
 - c) un fragmento de péptido que comprende al menos el fragmento de péptido de la SEC ID NO: 3 con el límite superior siendo el fragmento de péptido que consiste del péptido de la SEC ID NO: 5.
2. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el fragmento de péptido de HMGB1 es un péptido que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y SEC ID NO: 5.

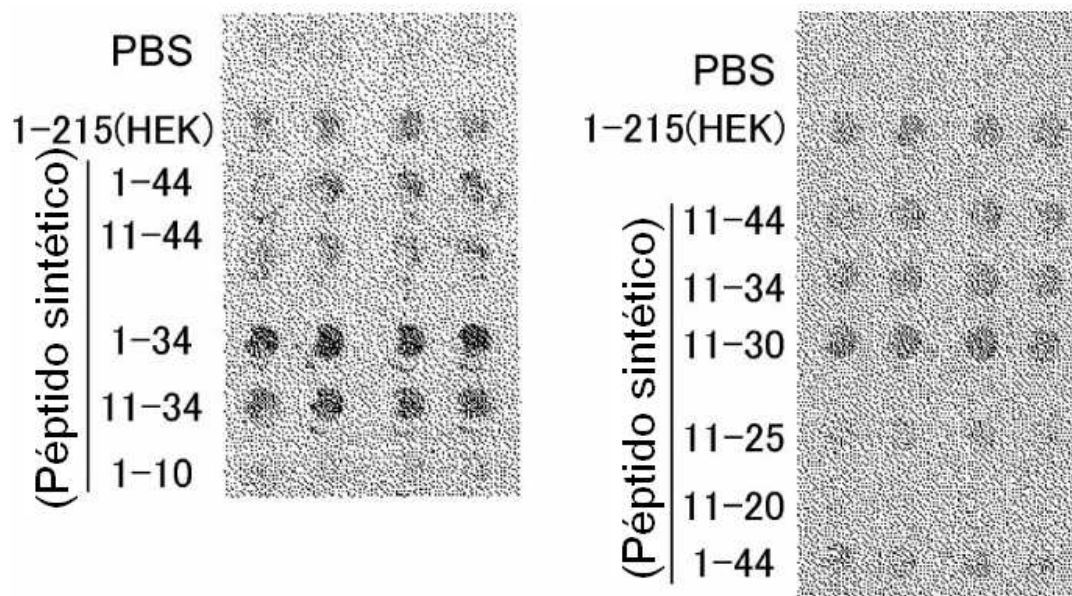


FIG. 1A

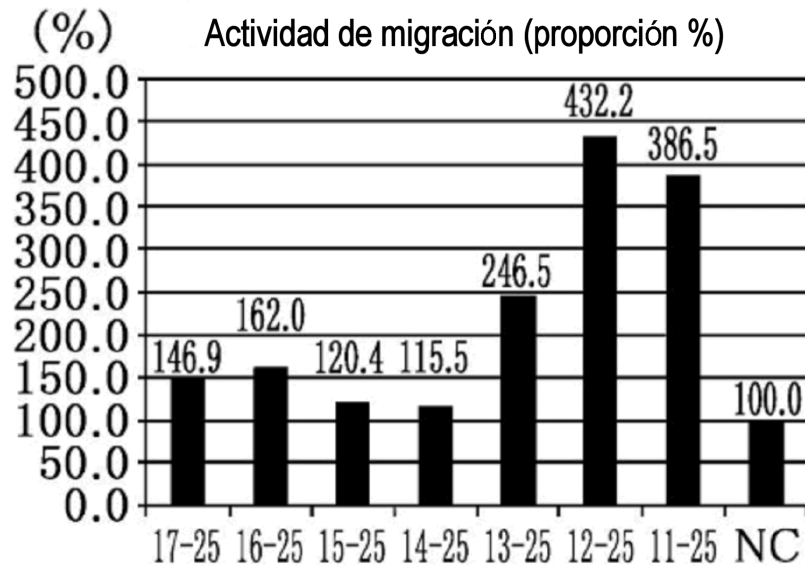
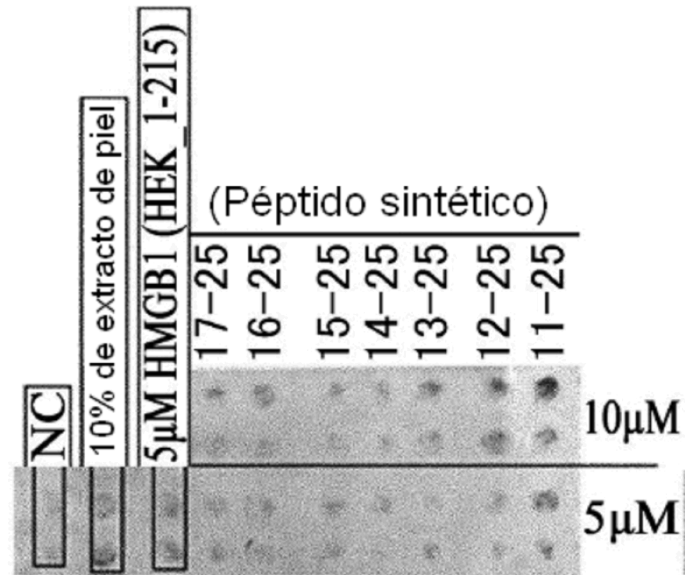


FIG. 1B

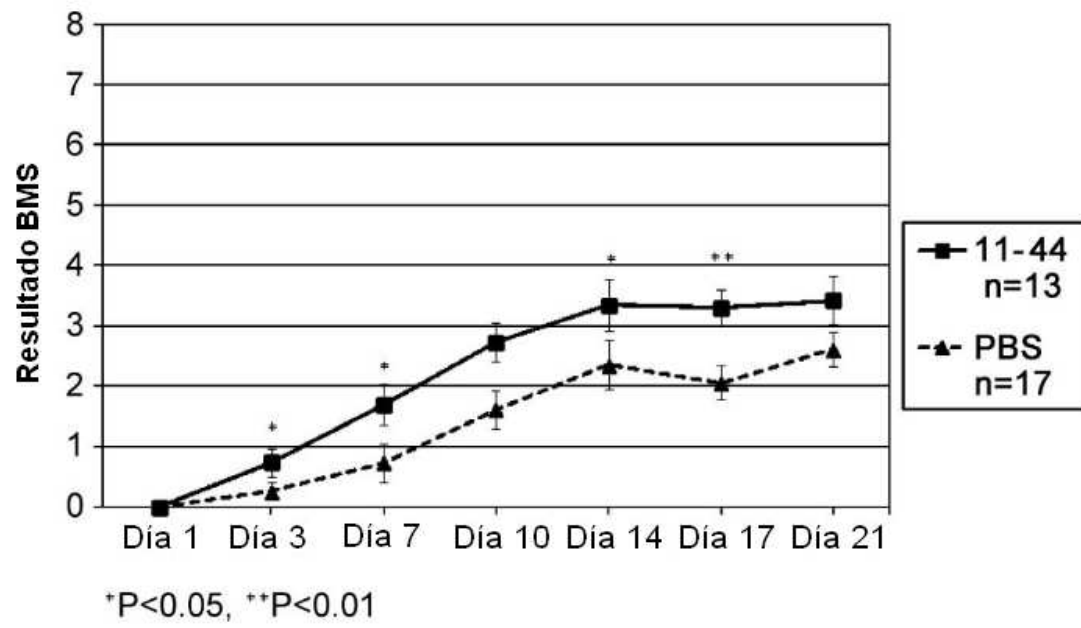


FIG. 2A

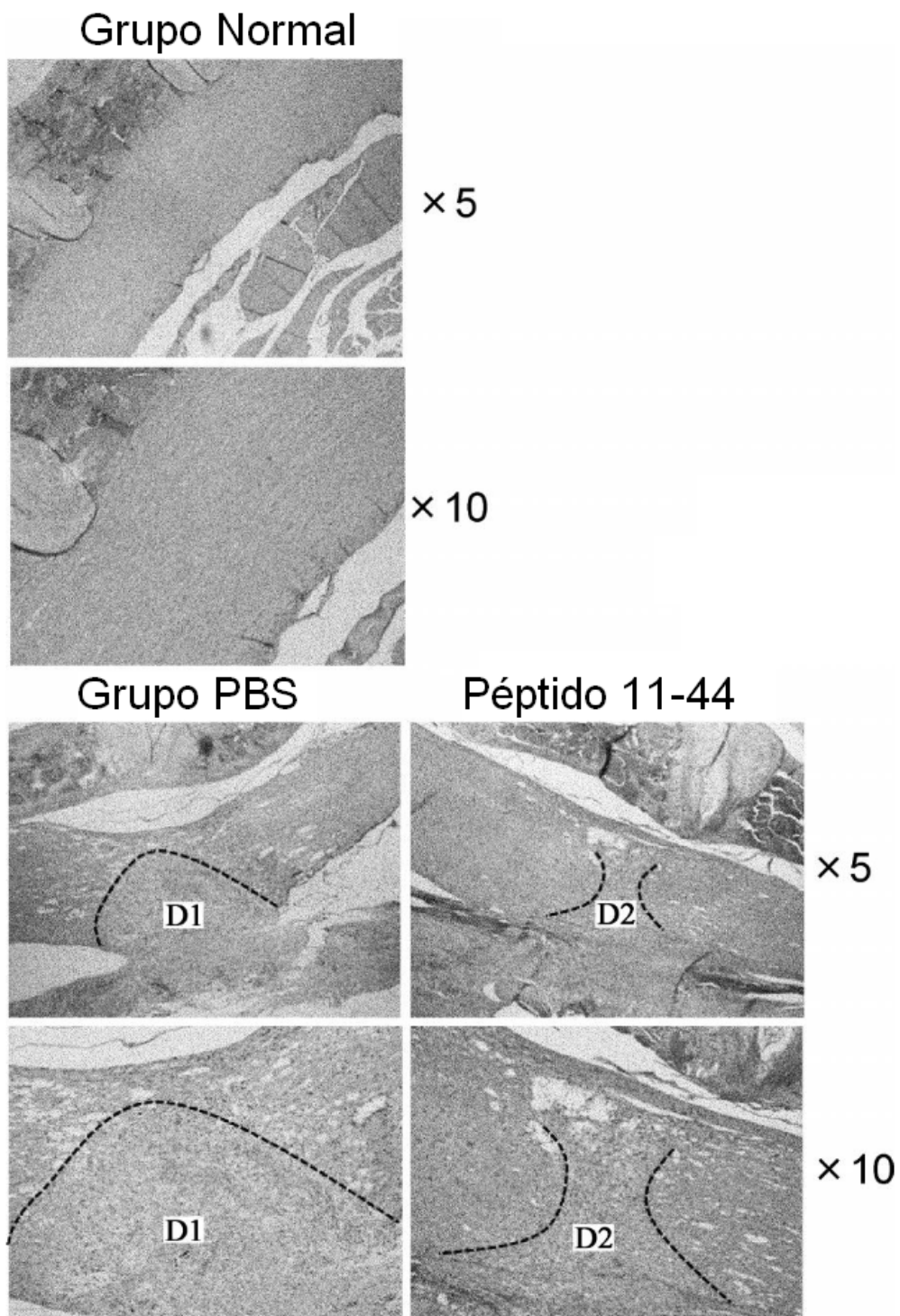


FIG. 2B

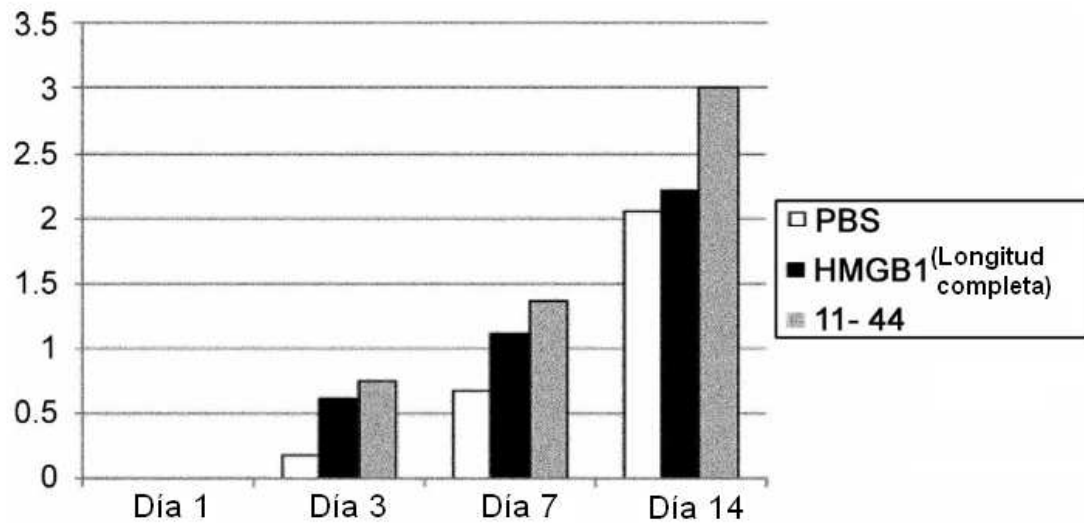


FIG. 3

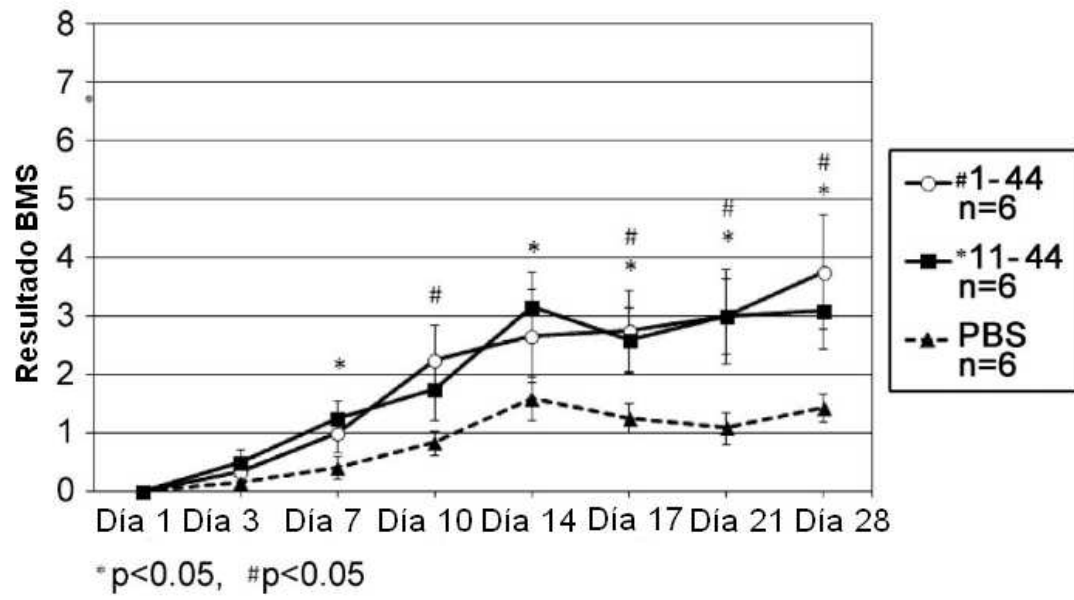


FIG. 4