

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 788 394**

(51) Int. Cl.:

<b>C12N 15/09</b>	(2006.01)	<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/711</b>	(2006.01)	<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/713</b>	(2006.01)	<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/12</b>	(2015.01)	<b>A61P 19/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/28</b>	(2015.01)	<b>A61P 21/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/76</b>	(2015.01)	<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)	<b>C12N 1/15</b>	(2006.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)	<b>C12N 1/19</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)	<b>C12N 1/21</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/04</b>	(2006.01)	<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2012 E 18160112 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3358011**

(54) Título: **Péptido para inducir regeneración de tejido y uso del mismo**

(30) Prioridad:

**26.04.2011 JP 2011098270  
03.10.2011 JP 2011219454**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.10.2020**

(73) Titular/es:

**STEMRIM INC. (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;  
YAMAZAKI, TAKEHIKO;  
KANEZAKI, TSUTOMU;  
SAKURAI, SHIGERU;  
NOGUCHI, YUKIKO;  
ENDO, MAYUMI;  
HAMABUCHI, NATSUMI y  
NAITO, KANA**

(74) Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 788 394 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

Péptido para inducir regeneración de tejido y uso del mismo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a péptidos que consisten en una porción de una proteína HMGB1 y que tienen una actividad de estimulación de la migración de una célula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

Técnica anterior

10 Ha quedado claro que cada órgano o tejido en el organismo vivo tiene células madre de tejido que mantienen su homeostasis estructural y funcional. Por ejemplo, las células madre cardíacas están presentes en el corazón, las células madre neurales están presentes en el cerebro, y las células madre epidérmicas y las células madre del folículo piloso están presentes en la piel. Proporcionan cardiomocitos, neuronas y células epidérmicas y células epiteliales del folículo piloso al corazón, cerebro y piel, respectivamente, durante toda la vida para mantener sus estructuras y funciones. Mientras tanto, las células madre hematopoyéticas, que se diferencian en glóbulos sanguíneos tales como eritrocitos, leucocitos y plaquetas, están presentes en la médula ósea. Los glóbulos sanguíneos derivados de células madre hematopoyéticas circulan a través de todos los órganos o tejidos en el cuerpo mediante la circulación sanguínea y cumplen funciones esenciales para el mantenimiento de la vida, tales como el suministro de oxígeno, respuesta inmunitaria, parada de hemorragia y reparación de tejidos dañados. Así, es justo afirmar que las células madre hematopoyéticas de la médula ósea contribuyen al mantenimiento de la homeostasis de todos los tejidos en el cuerpo mediante la circulación periférica, en vez del mantenimiento de la homeostasis de la médula ósea y los tejidos óseos donde están localizados.

15

20 Recientemente, se ha demostrado que, además de las células madre hematopoyéticas, las células madre mesenquimatosas capaces de diferenciarse no solo tejidos mesodérmicos, tales como hueso, cartílago y tejidos adiposos, sino también en tejidos ectodérmicos tales como neurona y epidermis, están presentes en la médula ósea. Sin embargo, poco se entiende sobre la significancia de la presencia de células madre mesenquimatosas en el cuerpo vivo. Sin embargo, dado que las células madre hematopoyéticas que mantienen la homeostasis de todos los órganos y tejidos suministrando glóbulos sanguíneos mediante la circulación periférica están presentes en la médula ósea, se espera que las células madre mesenquimatosas presentes en la médula ósea también puedan contribuir al mantenimiento homeostático de tejidos vivos suministrando células capaces de diferenciarse en hueso, cartílago, tejido adiposo, neurona, epitelio, etc., a tejidos u órganos en necesidad de las mismas en el cuerpo vivo mediante la circulación periférica.

25

30 Actualmente, la medicina regenerativa está en intenso desarrollo, en la que células madre mesenquimatosas de la médula ósea se preparan recogiendo sangre de la médula ósea, y después de la expansión por cultivo celular, las células se injertan en el sitio del daño tisular resistente al tratamiento o en la circulación periférica para inducir la regeneración del tejido dañado. La aplicación clínica del trasplante de células madres mesenquimatosas de la médula ósea ya está en marcha en la medicina regenerativa para infarto cerebral, infarto cardíaco, úlcera de la piel resistente al tratamiento, etc. Además, se ha demostrado que las células madre mesenquimatosas de la médula ósea transplantadas producen el efecto de suprimir la inflamación y la respuesta inmunitaria, así como el efecto de suprimir la formación de cicatrices fibrosas en sitios locales en el cuerpo. Han empezado los ensayos clínicos en la terapia de trasplante de células madre mesenquimatosas de la médula ósea como un nuevo método terapéutico para tratar esclerodermia, que es una enfermedad autoinmunitaria, o para tratar enfermedad injerto contra huésped (GVHD), que es un efecto secundario grave después del trasplante de médula ósea o la infusión de sangre. Sin embargo, la sangre de la médula ósea que contiene células madre mesenquimatosas de la médula ósea se recoge solo por un método invasivo donde agujas gruesas se insertan repetidamente en el hueso ilíaco. Además, los continuos pases de las células madre mesenquimatosas de la médula ósea fuera del cuerpo conducen a la pérdida gradual de su capacidad proliferativa y multipotencia. Además, puesto que el cultivo de células madre mesenquimatosas de la médula ósea con alto control de calidad para asegurar la seguridad del trasplante *in vivo* requiere instalaciones especiales de cultivo celular tales como un centro de procesamiento de células (CPC), actualmente solo se realizar pueden en universidades y empresas muy limitadas. Así, con el fin de poner a disposición la medicina regenerativa usando células madre mesenquimatosas de la médula ósea para un gran número de pacientes alrededor del mundo que padecen daño tisular resistente al tratamiento, es una tarea urgente desarrollar técnicas para la medicina regenerativa de células madre mesenquimatosas que se pueda realizar en cualquier instalación médica.

35

40 La proteína del grupo de alta movilidad de caja 1 (HMGB 1) se identificó aproximadamente hace 30 años como una proteína de cromatina no de histona que regula la expresión génica y la reparación de ADN regulando la estructura de cromatina nuclear. La estructura de la proteína HMGB1 está principalmente constituida por dos dominios de unión de ADN, y aquellos en el extremo N y C se denominan caja A y caja B, respectivamente. Los estudios anteriores han revelado que el dominio que se une a TLR para inducir la reacción inflamatoria se localiza dentro de la caja B de la molécula de HMGB1.

45

50

55

El Documento de patente 1 se refiere a productos farmacéuticos para promover la regeneración funcional de tejido dañado que comprende una proteína HMGB1.

El Documento de patente 3 se refiere a agentes que comprenden una proteína HMGB1 para el reclutamiento de células madre pluripotentes derivadas de médula ósea en la circulación periférica.

5 El Documento de patente 4 se refiere a métodos de recogida de células funcionales *in vivo* usando, entre otras cosas, una proteína HMGB1.

El Documento de patente 7 se refiere al uso de HMGB1 en el tratamiento del daño tisular.

El Documento de patente 8 divulga una proteína de la soja con una longitud de 98 aminoácidos que no tiene identidad con el fragmento de HMGB1 humana de los aminoácidos 89-185.

10 El Documento de patente 9 se refiere al uso de HMGB1 para la protección contra la lesión por isquemia-reperfusión.

El Documento de patente 10 se refiere a una proteína HMGB1 acetilada.

El Documento no de patente 7 se refiere a un estudio del efecto de la proteína HMGB1 sobre la migración y la proliferación de mesoangioblastos.

15 El Documento no de patente 12 se refiere a un estudio del efecto de la proteína HMGB1 sobre el reclutamiento de células madre.

El Documento no de patente 13 se refiere a un estudio en el motivo del extremo COOH en la anfoterina.

El Documento no de patente 14 es un artículo de revisión que se centra en la función de HMGB1 en el estrés oxidativo y estrategias antioxidantes basadas en tener como diana HMGB1.

Documentos del estado de la técnica

20 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

25 Documento de patente 5: WO2009/133940

Documento de patente 6: Publicación Kohyo de patente japonesa N° (JP-A) 2005-537253 (publicación japonesa en fase nacional no examinada correspondiente a una publicación internacional no japonesa)

Documento de patente 7: WO2004/004763

Documento de patente 8: US2004/031072

30 Documento de patente 9: WO2007/130725

Documento de patente 10: WO2004/044001

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Bustin et al., Mol Cell Biol, 19: 5237-5246, 1999

Documento no de patente 2: Hori et al., J. Biol. Chem., 270, 25752-25761, 1995

35 Documento no de patente 3: Wang et al., Science, 285: 248-251, 1999

Documento no de patente 4: Muller et al., EMBO J, 20: 4337-4340, 2001

Documento no de patente 5: Wang et al., Science, 285: 248-251, 1999

Documento no de patente 6: Germani et al., J Leukoc Biol. Jan; 81(1): 41-5, 2007

Documento no de patente 7: Palumbo et al., J. Cell Biol., 164: 441-449, 2004

40 Documento no de patente 8: Merenmies et al., J. Biol. Chem., 266: 16722-16729, 1991

Documento no de patente 9: Wu Y et al., Stem Cells, 25: 2648-2659, 2007

Documento no de patente 10: Tamai et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 4. [publicación electrónica antes de impresa], 108: 6609-6614, 2011

Documento no de patente 11: Yang et al., J Leukoc Biol. Jan; 81(1): 59-66, 2007

5 Documento no de patente 12: Palumbo y Bianchi, Biochem. Pharmacol., 68(6): 1165-1170, 2004

Documento no de patente 13: Huttunen et al., Cancer Research, 62(16): 4805-4811, 2002

Documento no de patente 14: Tang et al., Antioxidants & Redox Signaling, 14(7): 1315-1335, 2011

Divulgación de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

- 10 Los presentes inventores realizaron recientemente estudios para aclarar el mecanismo de regeneración de la epidermis exfoliada en "epidermólisis bullosa", que es un trastorno hereditario de la piel resistente al tratamiento que muestra exfoliación de la piel de todo el cuerpo y síntomas de tipo quemadura en todo el cuerpo debido a una anomalía en el gen de una molécula de adhesión en la región de la membrana basal de la piel. Usando ratones del modelo de epidermólisis bullosa trasplantados con células transgénicas de la médula ósea para proteína verde fluorescente (GFP), los presentes inventores revelaron que la proteína del grupo de alta movilidad de caja 1 (HMGB1) liberada de la epidermis exfoliada a la sangre estimula y recluta células positivas para el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR $\alpha$ ) de la médula ósea a la sangre y así promueve la acumulación de las células en el sitio de exfoliación epidérmica, y que las células PDGFR $\alpha$ -positivas localizadas en el sitio de exfoliación epidérmica se diferenciaron en fibroblastos y células epidérmicas y tuvieron una gran contribución a la regeneración de piel dañada. Los presentes inventores también revelaron que, cuando una proteína HMGB1 recombinante se administró por la vena caudal después de la inducción de úlcera de piel o infarto cerebral en ratones, las células PDGFR $\alpha$ -positivas se reclutaron de la médula ósea a la sangre y se acumularon en el sitio de ulceración de la piel o infarto cerebral, induciendo así fuertemente la regeneración de la ulceración de la piel o infarto cerebral. Se ha informado previamente que las células intramedulares PDGFR $\alpha$ -positivas son células madre mesenquimatosas capaces de diferenciar en hueso, cartílago y tejido adiposo, y también en neurona y epitelio. Así, se ha encontrado posible permitir que muchas células madre mesenquimatosas se acumulen en tejidos dañados en el organismo vivo administrando HMGB1 para movilizar las células madre mesenquimatosas intramedulares PDGFR $\alpha$ -positivas en la circulación periférica, sin realizar un cultivo *ex vivo* especial de células recogidas del cuerpo.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- Si HMGB1 se desarrolla en un agente farmacéutico para inducir la regeneración de tejidos dañados reclutando células madre mesenquimatosas de la médula ósea a la sangre en el cuerpo, cada instalación médica será capaz de realizar la medicina regenerativa basándose en las células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Esto resolverá muchos problemas a los que se enfrenta la actual medicina regenerativa basada en células madre mesenquimatosas de la médula ósea anteriormente mencionada.
- Como se ha descrito anteriormente, los productos farmacéuticos de HMGB1 son agentes terapéuticos revolucionarios que promueven el reclutamiento de células madre mesenquimatosas de la médula ósea en sangre y la acumulación de las células en tejidos dañados, induciendo así la regeneración de tejido en el cuerpo. En estudios previos realizados por los presentes inventores, no se observaron efectos secundarios incluso cuando se administró a ratones o ratas una alta concentración de proteína HMGB1 recombinante. En vista de esto, así como el hecho observado por los presentes inventores de que está presente un nivel significativamente alto de HMGB1 en la sangre periférica de pacientes con epidermólisis bullosa que no tienen síntomas graves, excepto exfoliación epidérmica, se espera que la administración de HMGB1 sea altamente segura.
- Sin embargo, también hay informes de que HMGB1 tiene un efecto inflamatorio. Como se ha descrito anteriormente, existen varios hallazgos sobre HMGB1; sin embargo, no se conoce nada sobre el efecto de los fragmentos de la proteína HMGB1 sobre células madre mesenquimatosas o qué funciones desempeñan en la regeneración de tejido.

[Medios para resolver los problemas]

- Los presentes inventores tenían un péptido que consistía en los aminoácidos en las posiciones 1 a 84 de una proteína HMGB1 y un péptido que consistía en los aminoácidos en las posiciones 85 a 169 de la proteína HMGB1, respectivamente, secretados como proteínas recombinantes en medios de células HEK293. Las proteínas de interés en los medios se purificaron cada una por cromatografía, y se examinó su actividad promotora de la migración sobre la línea de células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas. Como resultado, los presentes inventores encontraron que el péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 1 a 84 mostró actividad promotora de la migración.

Entonces, basándose en el péptido que consiste en los aminoácidos en las posiciones 1 a 84 de la proteína HMGB1 que se confirmó que tenía actividad promotora de la migración en MSC-1, los presentes inventores prepararon un péptido que consiste en los aminoácidos en las posiciones 1 a 44 y un péptido que consiste en los aminoácidos en las posiciones 45 a 84, y examinaron cada péptido para actividad promotora de la migración. Los resultados mostraron que ambos fragmentos de péptido presentaron actividad promotora de la migración en la línea de células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas.

Entonces, se sintetizaron químicamente diversos fragmentos de péptido que se superponen entre sí alrededor de los fragmentos anteriormente respectivos, y se evaluaron para su actividad promotora de la migración en la línea de células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas. Como resultado, los presentes inventores identificaron varios péptidos que muestran la actividad promotora de la migración.

Además, los presentes inventores confirmaron que los péptidos identificados tienen actividad promotora de la migración en fibroblastos de piel, que son PDGFR $\alpha$ -positivos, y tienen un efecto de reducción del tamaño de infartos cerebrales en un ratón de modelo de infarto cerebral.

Los presentes inventores tuvieron una proteína recombinante que consiste en los aminoácidos de las posiciones 2 a 84 de la proteína HMGB1 y una proteína recombinante que consiste en los aminoácidos de las posiciones 89 a 215 de la proteína HMGB1 expresada en *E. coli*. Las proteínas expresadas se purificaron por cromatografía en columna, y se examinaron para su actividad promotora de la migración en la línea de células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas y en células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas. Como resultado, los presentes inventores confirmaron la actividad promotora de la migración del péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 2 a 84 y el péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 89 a 215.

A continuación, basándose en el péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 2 a 84 que se confirmó que tenía actividad promotora de la migración en MSC-1 y células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas, los presentes inventores prepararon un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 2 a 44 y un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 45 a 84, y los examinaron para sus actividades promotoras de la migración. El resultado mostró que ambos fragmentos de péptido preparados presentaron actividad promotora de la migración en MSC-1 y células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas.

A continuación, basándose en el péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 89 a 215 que se confirmó que tenía actividad promotora de la migración en MSC-1 y células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas, los presentes inventores prepararon péptidos con el extremo C cada vez más acortado, es decir, un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 89 a 205, un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 89 a 195 y un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 89 a 185, y examinaron cada uno de ellos para actividad promotora de la migración. El resultado mostró que entre los fragmentos de péptido preparados, aquellos con un extremo C más corto demostraron actividad promotora de la migración más potenciada en la línea de células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas y células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas.

Además, cuando se generaron tres tipos de péptidos de fusión añadiendo al péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 2 a 84, una cola ácida parcial o completa del extremo C que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico (secuencia de 10, 20 o 30 aminoácidos), se encontró sorprendentemente que se redujo extremadamente la actividad promotora de la migración del péptido 2-84 para todos los péptidos de fusión. Esto muestra que una cola ácida parcial o completa regula supresivamente la actividad promotora de la migración de HMGB1 de longitud completa. Fue evidente de la fragmentación anterior que existen al menos tres o más dominios de actividad promotora de la migración, y que sugiere que estos dominios en su estado de longitud completa se podrían suprimir por la cola ácida.

Además, los inventores confirmaron que los péptidos identificados tienen efecto terapéutico en un modelo de piel dañada.

Basándose en estos hallazgos, la presente solicitud proporciona lo siguiente:

[1] un péptido que consiste en una porción de una proteína HMGB1 y que tiene una actividad de estimulación de la migración de una célula, donde dicho péptido consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos a continuación:

(1) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(2) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 70 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(3) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

- (4) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 170 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- (5) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 5 (6) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- (7) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 10 (8) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 70 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- (9) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- (10) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 170 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 15 (11) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- (12) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 20 (13) la secuencia de aminoácidos de la posición 17 a la posición 25 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- (14) la secuencia de aminoácidos de la posición 45 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- (15) la secuencia de aminoácidos de la posición 85 a la posición 169 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 25 (16) la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- (17) la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5; y
- 30 (18) la secuencia de aminoácidos de la posición 93 a la posición 215 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- [2] el péptido del punto 1, que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos a continuación y tiene una actividad de estimulación de la migración de una célula:
- (1) la secuencia de aminoácidos de la posición 17 a la posición 25 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 35 (2) la secuencia de aminoácidos de la posición 85 a la posición 169 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- (3) la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- [3] el péptido del punto 1 o 2, que es un péptido sintético;
- 40 [4] el péptido del punto 1 o 2, que es un péptido producido usando una célula;
- [5] el ADN que codifica el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 4;
- [6] un vector que comprende el ADN del punto 5; y
- [7] una célula transformada que comprende el ADN del punto 5 o el vector del punto 6.

La Fig. 1 muestra un vector de expresión para producir péptidos y proteínas usando células HEK293.

La Fig. 2A es una fotografía que muestra la actividad de migración de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida hacia péptidos. Se hicieron comparaciones con HMGB1 de longitud completa de control positivo (1-215), un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 1 a 84 (1-84), un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 85 a 169 (85-169), un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 1 a 44 (1-44), un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 45 a 84 (45-84). Todos estos péptidos se produjeron usando HEK293. La Fig. 2B muestra la transferencia Western que confirma si PDGFR $\alpha$  se expresó en células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas.

La Fig. 3 es una fotografía que muestra la actividad de migración de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida hacia péptidos. Se hizo una comparación entre un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 45 a 215 (45-215) de HMGB1 y un péptido que consiste en los aminoácidos de las posiciones 63 a 215 (63-215). Estos péptidos se produjeron todos usando HEK293.

La Fig. 4 es un conjunto de fotografías que muestran la fluorescencia de GFP de células CD11b-positivas y CD11b-negativas aisladas usando MACS después de recoger las células de la médula ósea de un ratón PDGFR $\alpha$ -GFP, y cultivarlas durante un cierto periodo de tiempo usando placas de cultivo celular adherente.

La Fig. 5 es una fotografía que muestra la actividad de migración de células mesenquimatosas de la médula ósea primarias cultivadas hacia el péptido HMGB1\_1-44.

La Fig. 6 es un conjunto de fotografías que muestran la capacidad de diferenciación de hueso (A) y la capacidad de diferenciación de adipocitos (B) de células mesenquimatosas de la médula ósea de cultivo primario (PDGFR $\alpha$ -positivas, Lin-negativas y c-kit negativas).

La Fig. 7 es un conjunto de fotografías que muestran la actividad de migración de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida hacia diversos péptidos sintéticos.

La Fig. 8A es un conjunto de fotografías que muestran la actividad de migración de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida hacia diversos péptidos sintéticos. La Fig. 8B es un gráfico que muestra la actividad de migración cuantificada en la fotografía inferior izquierda en la Fig. 8A. El número de células que migró hacia cada uno de los péptidos sintéticos y el control negativo se midió bajo el microscopio. Los valores se representaron cada uno con el valor promedio del control negativo establecido a 100. La Fig. 8C es una fotografía que muestra la actividad promotora de la migración de cada péptido en células madre mesenquimatosas de la médula ósea (MSC-1). El gráfico muestra la relación del número promedio de células medido para cada mancha en la fotografía con respecto al control negativo.

La Fig. 9 es una fotografía que muestra la actividad de migración de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida hacia diversos péptidos sintéticos.

La Fig. 10 es una fotografía y un diagrama que muestran la actividad de migración de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida hacia diversos péptidos. El péptido HMGB1\_1-44 (1-44) producido por las células HEK293 con secreción de péptido constante, células HEK293 con secreción de péptido mediante transfección transitoria de plásmido, *E. coli*, y síntesis de péptidos, se compararon con HMGB1 de longitud completa de control positivo.

La Fig. 11 muestra el análisis de FACS de PDGFR $\alpha$ , marcador de linaje y CD44 en una célula madre mesenquimato de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positiva establecida.

La Fig. 12A es una fotografía que muestra la actividad de migración de queratinocitos de ratón hacia el péptido HMGB1\_1-34. B es un conjunto de fotografías de inmunohistoquímica de queratina 5 en piel de ratones PDGFR $\alpha$ -GFP. Los queratinocitos que son células queratina 5-positivas no expresaron PDGFR $\alpha$ .

La Fig. 13A es una fotografía que muestra la actividad de migración de fibroblastos dérmicos de ratón hacia el péptido HMGB1\_1-34 (1-34). B es un conjunto de fotografías de inmunohistoquímica de vimentina en piel de ratones PDGFR $\alpha$ -GFP. Algunos de los fibroblastos dérmicos, que son vimentina-positivos, expresaron PDGFR $\alpha$ .

La Fig. 14 muestra análisis de FACS de los fibroblastos dérmicos de ratones PDGFR $\alpha$ -GFP y los fibroblastos dérmicos de ratones no mutantes (ratón C57/B16). Casi el 98 % y más de los fibroblastos dérmicos de ratones expresaron PDGFR $\alpha$ .

La Fig. 15 muestra la movilización de células PDGFR $\alpha$ -positivas CD44-positivas dentro de sangre por un péptido sintético (1-44) demostrado por FACS.

La Fig. 16 es una fotografía en sección transversal del modelo de infarto cerebral de rata administrada con un péptido sintético (1-44) o un control negativo, PBS. Se observó reducción del tamaño del infarto cerebral por el péptido sintético (1-44).

5 La Fig. 17 es un conjunto de diagramas y una fotografía que muestra la relación del área de lesión de infarto cerebral con respecto al área derecha del cerebro del modelo de infarto cerebral de rata administrada con un péptido sintético (1-44) o un control negativo, PBS. Se produjeron cuatro secciones transversales del mismo cerebro, y se midieron sus áreas respectivas.

10 La Fig. 18A muestra la adición de una marca 6xHis y una secuencia de escisión por proteasa TEV al extremo N de HMGB1 humana. Se preparó recientemente un ADNC que expresaba esta proteína y se insertó en un vector de expresión de *E. coli*.

15 La Fig. 18B es una fotografía que muestra la actividad de migración de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida hacia fragmentos de HMGB1. Los fragmentos se produjeron todos usando *E. coli*. La Fig. 18C es un diagrama obtenido cuantificando la actividad de migración de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida hacia los fragmentos de HMGB1, y representando los valores promedio de las actividades respectivas. La Fig. 18D es una tabla que muestra los valores promedio de la actividad de migración cuantificada de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida hacia los fragmentos de HMGB1.

20 La Fig. 19A es una fotografía de SDS-PAGE de fracciones obtenidas por purificación en columna de intercambio aniónico de un fragmento de HMGB1 que consiste en los aminoácidos de las posiciones 89 a 215 que se produjo usando *E. coli* y se somete a purificación por afinidad por níquel (I: entrada). M es un marcador de peso molecular. Se eluyó un fragmento de 15,5 kDa (\*3) bajo una baja concentración de sales; y se eluyeron un fragmento de 16 kDa (\*2) y un fragmento de 17 kDa (\*1) con el fin de que aumentara la concentración de sales. Se supone que (\*3) y (\*2) son productos de degradación de (\*1).

25 B es una fotografía que muestra la actividad promotora de la migración de las fracciones obtenidas en la Fig. A en una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida. NC es control negativo, y 2-215 es control positivo. Se encontró que el fragmento con el peso molecular más bajo (\*3), que se consideró que era un fragmento escindido, tenía una actividad más fuerte que los fragmentos más largos (\*1) y (\*2). La actividad fue superior a la de 2-215. C es una fotografía de SDS-PAGE de fracciones obtenidas por columna de intercambio aniónico de un fragmento de HMGB1 que consiste en los aminoácidos de las posiciones 89 a 205 que se produjo usando *E. coli* y se somete a purificación por afinidad por níquel (I: entrada). El fragmento más corto (\*4) se eluyó bajo una baja concentración de sales; y a medida que aumentó la concentración de sales, se eluyeron fragmentos más largos (\*5) y (\*6). Se predice que (\*5) y (\*6) son productos de degradación de (\*4).

30 Por tanto, se ejecutaron en SDS-PAGE al mismo tiempo fragmentos de HMGB1 purificados 89-195 y 89-185. M es un marcador de peso molecular. D es una fotografía que muestra la actividad promotora de la migración de las fracciones obtenidas en la Fig. C en una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas establecida. NC es control negativo. Se encontró que el fragmento con el peso molecular más bajo (\*4), que se consideró que era un fragmento escindido, tenía una actividad más fuerte que los fragmentos más largos (\*5) y (\*6). Mientras tanto, los fragmentos HMGB1 cuyo extremo C se acortó adicionalmente de antemano, es decir, 89-195 y 89-185, mostraron una actividad mucho más fuerte.

35 La Fig. 20A es una fotografía que muestra la actividad promotora de la migración del fragmento de HMGB1 85-169. Se observó una actividad más fuerte que la del control positivo, fragmento de HMGB1 2-215. B es un gráfico de valores promedio de las actividades de migración cuantificadas en la Fig. A. C es una tabla que muestra los valores promedio en la Fig. B.

40 La Fig. 21-1A muestra la actividad de migración de la línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea (MSC-1) hacia HMGB1 fragmentos producidos usando *E. coli*: 2-215, 2-205, 2-195 y 2-185. B es una fotografía que muestra la actividad promotora de la migración de fragmentos de HMGB1 producidos usando *E. coli* en células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas.

45 La Fig. 21-2C muestra una tinción con proteína CBB de un gel sobre el que se sometieron a electroforesis por SDS-PAGE los fragmentos de fusión (2-84)+(186-215), (2-84)+(186-205) y (2-84)+(186-195), que se obtuvieron añadiendo al fragmento de HMGB1 humano purificado (2-84) un fragmento de la cola ácida de HMGB1 humana ((186-215), (186-205) o (186-195)). Cada fragmento purificado se confirmó. D es un diagrama en el que se examinó la actividad promotora de la migración en MSC-1 usando los fragmentos purificados. No se mostró actividad promotora de la migración para ninguno de los fragmentos de fusión obtenidos añadiendo una secuencia de cola ácida al fragmento 2-84. Mientras tanto, el propio fragmento 2-84 mostró actividad promotora de la migración.

50 La Fig. 22 es un conjunto de fotografías que muestran el colgajo cutáneo hecho sobre el lomo de una rata, que se tomaron una semana después. PBS es el grupo de control negativo. Se compararon los grupos administrados con HMGB1 que contenía la longitud completa producida por células HEK293 (1-215 (HEK) y

administrados con un péptido sintético de aminoácidos de las posiciones 1 a 44 (1-44 (péptido sintético)). Las flechas muestran tejido de piel necrosado.

5 La Fig. 23 es un conjunto de fotografías que muestran el colgajo cutáneo hecho sobre el lomo de una rata, que se tomaron cinco semanas después. PBS es el grupo de control negativo. Se compararon los grupos administrados con HMGB1 que contenía la longitud completa producida en células HEK293 (1-215 (HEK)) y administrados con un péptido sintético de aminoácidos de las posiciones 1 a 44 (1-44 (péptido sintético)). Las secciones de color rojo son donde se formaron úlceras de la piel.

10 La Fig. 24 es un conjunto de fotografías que muestran el colgajo cutáneo hecho sobre el lomo de una rata, que se tomaron siete semanas después. PBS es el grupo de control negativo. Se compararon los grupos administrados con HMGB1 que contenía la longitud completa producida en células HEK293 (1-215 (HEK)) y administrados con un péptido sintético de aminoácidos de las posiciones 1 a 44 (1-44 (péptido sintético)).

15 La Fig. 25 es un gráfico que muestra el área cuantificada de la sección de herida (sección necrosada) que se desarrolló en el colgajo cutáneo sobre el lomo de la rata. Se confirmó un efecto de encogimiento de la sección de la herida en los grupos administrados con HMGB1 que contenía la longitud completa producida en células HEK293 (1-215 (HEK)) y administrados con un péptido sintético de aminoácidos de las posiciones 1 a 44 (1-44 (péptido sintético)) en comparación con el grupo de control negativo una a tres semanas después de que se hiciera el colgajo cutáneo. Después de cuatro semanas y después, se observó un efecto de encogimiento adicional en 1-44 (péptido sintético) en comparación con los otros dos grupos.

20 Fig. 26 Se administraron a la vena caudal de una rata con lesión de piel producida los péptidos HMGB1 (1-44) y (17-25) químicamente sintetizados. La figura muestra los porcentajes respectivos del área del sitio de lesión de la piel con respecto al área completa del colgajo cutáneo dos semanas y seis semanas después de que se hiciera el colgajo cutáneo.

[Modos para llevar a cabo la invención]

25 La presente invención proporciona un péptido que consiste en una porción de una proteína HMGB1 y tiene una actividad de estimulación de la migración de una célula, donde dicho péptido consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos a continuación:

(1) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

30 (2) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 70 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5; y

(3) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(4) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 170 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

35 (5) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(6) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

40 (7) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(8) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 70 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(9) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

45 (10) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 170 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(11) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

50 (12) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(13) la secuencia de aminoácidos de la posición 17 a la posición 25 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(14) la secuencia de aminoácidos de la posición 45 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

5 (15) la secuencia de aminoácidos de la posición 85 a la posición 169 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

(16) la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

10 (17) la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5; y

(18) la secuencia de aminoácidos de la posición 93 a la posición 215 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5.

15 En la presente invención, la actividad de estimulación de la migración celular se refiere a una actividad que estimula la migración celular. En la presente memoria descriptiva, la actividad de estimulación de la migración celular también se expresa como actividad de inducción de la migración celular o actividad de atracción celular.

20 Las células reclutadas a un tejido en necesidad de regeneración se diferencian en diversos tipos de células que contribuyen a la regeneración funcional del tejido en necesidad de regeneración y mantenimiento/potenciamiento de las funciones. En la presente divulgación, ejemplos de tejido en necesidad de regeneración incluyen, pero no se limitan a, tejidos dañados por diversas afecciones patológicas debido a condiciones isquémicas/hipoperfusivas/hipóxicas, traumatismo, quemaduras, inflamación, autoinmunidad, anomalías génicas y similares.

25 Los tejidos en la presente divulgación no se limitan particularmente, en tanto que sean tejidos en los que se pueden diferenciar células derivadas de la médula ósea. Ejemplos incluyen todos los tipos de tejidos en el cuerpo vivo, tales como tejido de piel, tejido de hueso, tejido de cartílago, tejido de músculo, tejido adiposo, tejido de músculo cardíaco, tejido neurológico, tejido muscular, tejidos gastrointestinales, tejidos hepáticos/biliares/pancreáticos y órganos genitourinarios. Además, con el uso de las composiciones anteriores, los tratamientos para inducir la regeneración funcional de tejido llegan a ser posibles no solo en enfermedades cutáneas tales como úlceras cutáneas resistentes al tratamiento, heridas de la piel, bullosis y alopecia, sino también en tejidos en necesidad de regeneración tales como infarto cerebral, infarto de miocardio, fractura de hueso, infarto pulmonar, úlceras gástricas y enteritis. La especie de animal que se administra con las composiciones anteriores no se limita particularmente, e incluye mamíferos, aves, peces, y similares. Los mamíferos incluyen animales humanos y no humanos, que se pueden ejemplificar por, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, ratas, monos, cerdos, perros, conejos, hámsteres, cobayas, caballos, ovejas y ballenas.

30 35 Ejemplos del tejido distinto de un tejido en necesidad de regeneración incluyen tejidos de sangre, tejidos de músculo, tejidos subcutáneos, tejidos intradérmicos, cavidad abdominal, y similares.

Los tejidos nerviosos incluyen tejido nervioso central, pero no se limitan a éstos.

40 Las composiciones usadas para regenerar tejidos nerviosos se pueden usar para tratar, por ejemplo, sin limitación, infarto cerebral, hemorragia cerebral y contusión cerebral. Las composiciones usadas para regenerar tejidos de hueso se pueden usar para tratar, por ejemplo, sin limitación, fractura de hueso. Además, las composiciones usadas para regenerar tejidos de piel se pueden usar para tratar, por ejemplo, sin limitación, úlceras de la piel, cierre de sutura insuficiente de heridas quirúrgicas, quemaduras, cortes, cardenales, erosiones de la piel y abrasiones.

45 En la presente divulgación, las células que se estimulan para migrar o las células movilizadas desde la médula ósea hasta la sangre periférica incluyen células no diferenciadas y células en diversos estadios de diferenciación, pero no se limitan a éstas. En la presente divulgación, las células que se estimulan para migrar o las células movilizadas desde la médula ósea hasta la sangre periférica incluyen células madre, células no madre, y similares, pero no se limitan a éstas. 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 sangre.

50 55 Además, las células estimuladas para migrar o las células movilizadas desde la médula ósea hasta la sangre periférica incluyen células derivadas de la médula ósea y células madre hematopoyéticas, pero no se limitan a éstas. En la presente memoria descriptiva, las "células madre hematopoyéticas" son células madre que se pueden diferenciar en glóbulos sanguíneos 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-positivos y CD133-positivos en seres humanos, y CD34-negativos, c-Kit-

positivos, Sca-1-positivos y marcador de linaje-negativos en el ratón. Las células madre hematopoyéticas son difíciles de cultivar solas cuando se cultivan en placas de cultivo, y se necesita que se co-cultiven con células del estroma.

5 En la presente memoria descriptiva, "células de la médula ósea" significa células presentes dentro de la médula ósea mientras que "células derivadas de la médula ósea" significa "células de la médula ósea" movilizadas desde la médula ósea hasta fuera de la médula ósea. Las "células de la médula ósea" incluyen células que contienen poblaciones de células progenitora de tejido presentes dentro de la médula ósea. Además, las "células derivadas de la médula ósea" pueden ser células que contienen mesoangioblastos o células libres de mesoangioblastos.

10 Las células progenitoras de tejido se definen como células no diferenciadas que tienen una potencia unidireccional para diferenciarse en células de un tejido específico distinto del aparato circulatorio, e incluyen células no diferenciadas que tienen la potencia para diferenciarse en tejidos mesenquimatosos, tejidos epiteliales, tejidos nerviosos, órganos parenquimatosos y endotelio vascular como se ha mencionado anteriormente.

15 Las "células de la médula ósea" y las "células derivadas de la médula ósea" son células madre hematopoyéticas y células diferenciadas derivadas de las mismas, tales como leucocitos, eritrocitos, plaquetas, osteoblastos y fibroblastos, o son células madre representadas por células que se han denominado hasta ahora células madre mesenquimatosas de la médula ósea, células madre pluripotentes del estroma de la médula ósea, o células madre pluripotentes de la médula ósea. Como se usa en el presente documento, "células madre de la médula ósea" se refieren a células madre presentes dentro de la médula ósea, mientras que las "células madre derivadas de la médula ósea" se refieren a "células madre de la médula ósea" movilizadas desde la médula ósea hasta fuera de la médula ósea. En la presente divulgación, las células estimuladas para migrar o movilizarse desde la médula ósea a la sangre periférica incluyen las "células madre derivadas de la médula ósea", pero no se limitan a estas. Las "células de la médula ósea" y las "células derivadas de la médula ósea" se pueden aislar por recogida de médula ósea (recogida de células de la médula ósea) o recogida de la sangre periférica. Las células madre hematopoyéticas son no adherentes, mientras que algunas de las "células de la médula ósea" y "células derivadas de la médula ósea" se obtienen como células adherentes mediante un cultivo celular de una fracción de monocitos de sangre obtenida mediante la recogida de médula ósea (recogida de células de la médula ósea) o recogida de sangre periférica.

20 Además, las "células de la médula ósea" y las "células derivadas de la médula ósea" incluyen células madre mesenquimatosas, y tienen el potencial de diferenciarse en, preferentemente, osteoblastos (que se puede identificar observando la calcificación después de inducir la diferenciación), condrocitos (que se pueden identificar por tinción positiva con azul alcián, tinción positiva con safranina O, o similares), adipocitos (que se pueden identificar por tinción positiva con Sudán III), y otras células mesenquimatosas tales como fibroblastos, células de músculo liso, células del estroma y células de tendón; y además células nerviosas, células epiteliales (por ejemplo, los queratinocitos epidérmicos y las células epiteliales intestinales expresan la familia de la citoqueratina) y células endoteliales vasculares. Las células que se van a diferenciar no se limitan a las células anteriores, y también se incluye el potencial para diferenciar en células de órganos parenquimatosos tales como hígado, riñón y páncreas.

25 En el presente documento, "células madre mesenquimatosas de la médula ósea", "células pluripotentes del estroma de la médula ósea" o "células madre pluripotentes de la médula ósea" se refieren a células que existen en la médula ósea, que se recogen directamente de la médula ósea o se recogen indirectamente de otros tejidos (sangre, piel, grasa y otros tejidos), y se pueden cultivar y proliferar como células adherentes sobre una placa de cultivo (hecha de plástico o vidrio). Estas células se caracterizan por que tienen un potencial para diferenciarse en tejidos mesenquimatosos tales como hueso, cartílago y grasa (células madre mesenquimatosas), o en músculo esquelético, músculo de corazón, tejidos nerviosos y tejidos epiteliales (células madre pluripotentes), y se pueden obtener por recogida de células de la médula ósea.

30 Por otra parte, "células madre mesenquimatosas de la médula ósea derivadas de la médula ósea", "células pluripotentes del estroma de la médula ósea derivadas de la médula" o "células madre pluripotentes de la médula ósea derivada de la médula ósea" movilizadas desde la médula ósea hasta fuera de la médula ósea son células que se pueden obtener por recogida de sangre periférica, tejidos mesenquimatosos tales como grasa, tejidos epiteliales tales como la piel, o tejidos nerviosos tales como el cerebro.

35 Ademá, estas células también se caracterizan por que tienen un potencial para diferenciarse en tejidos epiteliales tales como queratinocitos que constituyen la piel, o tejidos nerviosos que constituyen el cerebro, cuando se administran a un área de lesión del cuerpo vivo inmediatamente después de la recogida o después de una vez que se han adherido sobre una placa de cultivo.

40 Las células madre mesenquimatosas de la médula ósea, células madre pluripotentes del estroma de la médula ósea, células madre pluripotentes de la médula ósea, o estas células reclutadas desde la médula ósea hasta fuera de la médula ósea, tienen preferentemente una potencia para diferenciarse en: osteoblastos (que se pueden identificar observando la calcificación después de la inducción de diferenciación), condrocitos (que se pueden identificar por tinción positiva con azul alcián, tinción positiva con safranina O, o similares), adipocitos (que se pueden identificar por tinción positiva con Sudán III), y otras células mesenquimatosas tales como fibroblastos, células de músculo liso, células de músculo esquelético, células del estroma y células de tendón; células nerviosas,

5 células del pigmento, células epidérmicas, células del folículo piloso (que expresan la familia de la citoqueratina, familia de la queratina del pelo, o similares), células epiteliales (por ejemplo, los queratinocitos epidérmicos y las células epiteliales intestinales expresan la familia de la citoqueratina o similares), y células endoteliales; y además preferentemente en células de órganos parenquimatosos tales como hígado, riñón y páncreas. Sin embargo, las células diferenciadas no se limitan a las células anteriores.

10 Las células de la médula ósea humanas y las células derivadas de la médula ósea humanas se pueden ejemplificar por, pero no se limitan a, células que se pueden obtener directamente recogiendo médula ósea (células), sangre periférica, o grasa, u obtener como células adherentes mediante cultivo de una fracción de monocitos aislada. Los marcadores para células de la médula ósea humanas y células derivadas de la médula ósea humanas incluyen, por ejemplo, todos o algunos de los siguientes, pero no se limitan a éstos: PDGFR $\alpha$ -positivas, Lin-negativas, CD45-negativas, CD44-positivas, CD90-positivas, y CD29-positivas, Flk-1-negativas, CD105-positivas, CD73-positivas, CD90-positivas, CD71-positivas, Stro-1-positivas, CD106-positivas, CD166-positivas y CD31-negativas.

15 Además, las células de la médula ósea de ratón y las células derivadas de la médula ósea de ratón se pueden ejemplificar por, pero no se limitan a, células que se pueden obtener directamente recogiendo médula ósea (células), sangre periférica, o grasa, u obtener como células adherentes mediante cultivo de una fracción de monocitos aislada. Los marcadores para células de la médula ósea de ratón y células derivadas de la médula ósea de ratón incluyen, por ejemplo, todos o algunos de los siguientes, pero no se limitan a éstos: CD44-positivas, PDGFR $\alpha$ -positivas, PDGFR $\beta$ -positivas, CD45-negativas, Lin-negativas, Sca-1 positivas, c-kit negativas, CD90-positivas, CD29-positivas y Flk-1-negativas.

20 20 En la presente divulgación, las células estimuladas para migrar o movilizadas desde la médula ósea hasta la sangre periférica son, por ejemplo, células PDGFR $\alpha$ -positivas, pero no se limitan a estas. Además, se pueden ejemplificar marcadores distintos de PDGFR $\alpha$  por todos o algunos de CD29-positivas, CD44-positivas, CD90-positivas, CD271-positivas, CD11b-negativas y Flk-1-negativas, pero no se limitan a estos. Las células PDGFR $\alpha$ -positivas incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, células derivadas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas, células madre 25 mesenquimatosas de la médula ósea derivadas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas, células tisulares que residen en tejidos PDGFR $\alpha$ -positivos (por ejemplo, fibroblastos y similares), células derivadas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas obtenidas como células adherentes mediante el cultivo celular de una fracción de monocitos de sangre obtenida mediante la recogida de médula ósea (recogida de células de la médula ósea) o recogida de sangre periférica.

30 30 La proteína HMGB1 en la presente divulgación incluye, pero no se limita a, por ejemplo, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como una proteína HMGB1 derivada de humano, y ADN que codifica dicha proteína incluye, pero no se limita a, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.

35 35 Además, la proteína HMGB1 derivada de ratón incluye, pero no se limita a, por ejemplo, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y ADN que codifica dicha proteína incluye, pero no se limita a, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

Además, la proteína HMGB1 derivada de rata incluye, pero no se limita a, por ejemplo, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y ADN que codifica dicha proteína incluye, pero no se limitan a, por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6.

40 40 La actividad estimulante de la migración celular de un péptido que consiste en una porción de una proteína HMGB1 se puede verificar por, por ejemplo, los métodos descritos en los ejemplos y métodos mostrados a continuación, sin limitación; y también se puede medir usando otro método *in vitro* o *in vivo* para medir la capacidad de migración celular.

- 45 - Método en el que un tubo de silicona insertado con una proteína HMGB1 o péptido se implanta bajo la piel y similares, y se saca después de un cierto periodo de tiempo para observar las células que migran dentro del tubo.
- Método en el que perlas de resina y similares unidas a una proteína HMGB1 o péptido se implantan en un tejido del cuerpo, y se sacan después de un cierto periodo de tiempo para observar las células que migran dentro de las perlas.
- 50 - Método en el que polímeros que tienen una acción de liberación sostenida, tales como gelatina y ácido hialurónico, se impregnan con una proteína HMGB1 o péptido y se implantan en un tejido del cuerpo, y se sacan después de un cierto periodo de tiempo para observar las células que migran dentro de los polímeros.

55 En la presente invención, el péptido que consiste en una porción de una proteína HMGB1 y que tiene actividad estimulante de la migración celular puede estar ejemplificado por los péptidos a continuación, pero no se limita a estos.

En la presente invención, el péptido que consiste en una porción de una proteína HMGB1 y que tiene actividad estimulante de la migración celular incluye, por ejemplo, un péptido que tiene una actividad de movilización de células desde la médula ósea hasta la sangre periférica, o una actividad de fomento de la regeneración tisular.

- 5 En la presente invención, el péptido que consiste en una porción de una proteína HMGB1 y que tiene actividad estimulante de la migración celular incluye, por ejemplo, un péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos a continuación y tiene actividad estimulante de la migración celular:
- (1) la secuencia de aminoácidos de la posición 17 a la posición 25 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 10 (2) la secuencia de aminoácidos de la posición 85 a la posición 169 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5; y
- (3) la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5.
- 15 En la presente invención, el péptido que consiste en una porción de una proteína HMGB1 y que tiene actividad estimulante de la migración celular incluye un péptido que tiene actividad estimulante de la migración celular que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 17 a la posición 25 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5. Ejemplos adicionales de los péptidos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3 y 5, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 170 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 44 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5.
- 20 25 El péptido que consiste en una porción de una proteína HMGB1 y que tiene actividad estimulante de la migración celular en la presente invención es uno cualquiera de los siguientes péptidos:
- <1> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 30 <2> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- <3> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 17 a la posición 25 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- <4> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 45 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 35 <5> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 70 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- <6> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 170 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 40 <7> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- <8> un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 70 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- <9> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 45 <10> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 170 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- <11> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 85 a la posición 169 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
- 50 <12> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

<13> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

<14> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 93 a la posición 215 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

5 <15> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

<16> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;

10 <17> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5; y

<18> un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5.

La secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 85 y la secuencia de aminoácidos de la posición 86 a la posición 169 en HMGB1 de ratón, rata y humano se conocen como caja A y caja B, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las posiciones 1 a 169 de ratón, rata y humano son todas idénticas y mantienen una identidad de un 100%. Asimismo, las secuencias de aminoácidos de la posición 14 a la posición 25 en HMGB2 de ratón, rata y humana son idénticas a HMGB1.

20 La presente invención proporciona péptidos que tienen la actividad estimulante de la migración celular mencionada anteriormente. La presente invención proporciona además ADN que codifican esos péptidos, vectores con los ADN insertados y células transformadas en las que se han introducido los vectores. Los ADN que codifican los péptidos de la presente invención, los vectores con los ADN insertados y las células transformadas en las que se han introducido los vectores se producen utilizando técnicas conocidas. Los ADN anteriores pueden ser, por ejemplo, ADN artificialmente sintetizados (por ejemplo, mutantes degenerados) en tanto que codifiquen péptidos de la presente invención.

25 La presente invención también proporciona péptidos de la presente invención producidos usando células, y péptidos de la presente invención sintetizados artificialmente. Los péptidos de la presente invención se pueden obtener como recombinantes incorporando un ADN que codifica el péptido en un sistema de expresión apropiado, o se pueden sintetizar artificialmente. Para obtener un péptido de la presente invención por métodos de ingeniería genética, se incorpora un ADN que codifica el péptido en un sistema de expresión apropiado y se permite que exprese el péptido.

30 Así, la presente divulgación proporciona un método de producción de un péptido de la presente invención, que comprende las etapas (a) y (b) a continuación:

- (a) introducir un ADN que codifica un péptido de la presente invención en células, y expresar dicho péptido; y
- (b) recoger dicho péptido de las células.

35 Los hospedadores que se pueden aplicar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células procariotas y células eucariotas. Además, los hospedadores que se pueden aplicar en la presente invención también incluyen, pero no se limitan a, bacterias (por ejemplo, *E. coli*), levaduras, células de animales (por ejemplo, células de mamífero tales como célula HEK293 y célula CHO, y células de insecto tal como células de gusano de seda), células vegetales, y similares.

40 Los ejemplos de sistemas hospedador/vector aplicables en la presente invención incluyen el vector de expresión pGEX y *E. coli*. Con pGEX, los genes exógenos se pueden expresar como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST) (Gene, 67: 31-40, 1988). pGEX con ADN incorporado que codifica un péptido de la presente invención se introduce en una cepa de *E. coli* tal como BL21 mediante choque térmico, se incuba durante un tiempo apropiado y a continuación se añade isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) para inducir la expresión de un péptido fusionado a GST. Ya que la GST de la presente invención se adsorbe sobre Glutatión Sepharose 4B, el producto de expresión se separa y purifica mediante cromatografía en columna de afinidad fácilmente.

45 Además, los siguientes también se pueden aplicar como sistemas hospedador/vector para obtener recombinantes genéticos de los péptidos de la presente invención. En primer lugar, cuando se utilizan bacterias como hospedadores, los vectores de expresión para las proteínas de fusión que utilizan marcas y similares están comercializados.

50 Con respecto a las levaduras, se conocen las levaduras que pertenecen al género *Pichia* por ser eficaces para la expresión de proteínas que contienen cadenas de azúcar. En términos de la adición de cadenas de azúcar, también son útiles los sistemas de expresión que utilizan vector de baculovirus con células de insecto como hospedador (Bio/Technology, 6: 47-55, 1988). Además, usando células de mamífero, se lleva a cabo transfección de un vector

usando promotores tales como CMV, RSV y SV40. Se pueden usar cualquiera de estos sistemas de hospedador/vector como sistema de expresión de los péptidos de la presente invención. Además, también se pueden introducir genes usando vectores plasmídicos y vectores virales tales como vectores de retrovirus, vectores de lentivirus, vectores de adenovirus, vectores de virus adeno-associado, vectores de virus Sendai, vectores de la envuelta del virus Sendai y vectores del virus del papiloma, sin limitación a éstos. Los vectores también pueden 5 contener una secuencia de ADN promotora que induce eficazmente la expresión génica, un factor que regula la expresión génica, y cualquier molécula necesaria para mantener la estabilidad del ADN.

Las proteínas así obtenidas de la presente invención se pueden aislar de dentro o fuera (medio y similares) de las 10 células hospedadoras, y se pueden purificar como proteínas que son sustancialmente puras y homogéneas. Las proteínas se pueden separar y purificar usando métodos de separación y purificación que se usan comúnmente en la purificación de proteínas, y no se limitan particularmente. Por ejemplo, las proteínas se pueden separar y purificar seleccionando y combinando apropiadamente columnas de cromatografía, filtros, ultrafiltración, insolubilización por salado, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque, electroforesis, diálisis, recristalización, y similares.

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

20 Además, los péptidos de la presente invención son preferentemente péptidos sustancialmente purificados. Aquí, el término "sustancialmente purificado" significa que la pureza del péptido de la presente invención (proporción del péptido de la presente invención en componentes de proteína total) es 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 100 % o próxima al 100 %. El límite superior para "próxima al 100 %" depende de 25 las técnicas de purificación y técnicas analíticas de los expertos en la técnica, ejemplos de los cuales son 99,999 %, 99,99 %, 99,9 %, 99 %, y similares.

Además, una proteína sustancialmente purificada incluye cualquier proteína purificada por cualquier método de purificación, en tanto que la pureza de la proteína sea como se ha mencionado anteriormente. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, proteínas sustancialmente purificadas seleccionando y combinando apropiadamente las 30 columnas de cromatografía anteriormente mencionadas, filtros, ultrafiltración, insolubilización por salado, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque, electroforesis, diálisis, recristalización, y similares.

En la presente invención, también se pueden producir del siguiente modo las células que secretan un péptido de la 35 presente invención. Se produce un vector insertando un ADN que codifica el péptido unido con un ADN que codifica la señal de secreción (por ejemplo, ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC; SEQ ID NO: 10) en un vector de expresión conocido o un vector de terapia génica. El vector producido se introduce en células de mamífero tales como fibroblastos (tales como fibroblastos de piel normal y líneas celulares derivadas de los mismos), células de insecto, y otras células. Ejemplos de ADN que codifican las señales de secreción incluyen, pero no se limitan a, ADN que tienen la secuencia anteriormente 40 descrita. Además, no existen limitaciones particulares en las especies de animal de las que derivan estas células, aunque se usan preferentemente células de las especies diana de animal sometidas a administración de vector, las células de la propia diana, o células derivadas de un parente consanguíneo de la diana sometida a administración de vector.

Mientras tanto, se pueden sintetizar artificialmente los péptidos que consisten en una porción de HMGB1. Para los 45 métodos de síntesis de péptidos en la presente invención, los péptidos se pueden sintetizar químicamente por cualquiera de un método de síntesis de péptidos en fase líquida o un método de síntesis de péptidos en fase sólida. En la presente invención, se prefieren los péptidos que se sintetizan usando un método de síntesis de péptidos en fase sólida. La síntesis de péptidos en fase sólida es uno de los métodos generalmente usados en la síntesis de péptidos química. Se puede usar como fase sólida perlas de gel de poliestireno con un diámetro de 50 aproximadamente 0,1 mm, modificados con grupos amino sobre su superficie, o similares, y se extiende una cadena de aminoácidos uno a uno por reacción de deshidratación. Cuando se desarrolla la secuencia de un péptido de interés, se escinde de la superficie en fase sólida para obtener la sustancia de interés. Por síntesis en fase sólida, es posible sintetizar péptidos de ribosoma, que son difíciles de sintetizar dentro de bacterias, para introducir aminoácidos no naturales tales como D-aminoácidos o derivados de átomos pesados, para modificar esqueletos de péptido y de proteína, y similares. En la síntesis en fase sólida, se pueden sintetizar largas cadenas de péptidos de 55 70 a 100 o más aminoácidos usando ligación química nativa para unir dos cadenas de péptidos.

En el presente documento a continuación, la presente invención se ilustrará adicionalmente con referencia a ejemplos, pero no se debe interpretar como que se limita a éstos.

[Ejemplo 1]

Purificación de HMGB-1 y péptidos derivados de HMGB1 usando HEK293

Se extrajo ARN de piel de ratón recién nacido usando Trizol (Invitrogen), y entonces se sintetizó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript III (Invitrogen). Usando este ADNc como molde, se amplificó ADNc de HMGB1 por

5 reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADNc resultante se insertó en pCAGGS, un vector plasmídico para la expresión de proteínas en células de mamífero, de forma que el vector expresara la proteína unida con una secuencia señal de la cadena κ de IgG como una señal de secreción, y con una marca HA, marca GST y secuencias de marca 6xHis en el extremo N de su secuencia de aminoácidos por comodidad de purificación (Fig. 1). Además, se insertó una secuencia escindida por HRV3C entre la marca His y la proteína o péptido de interés.

10 Después de la digestión con HRV3C, se unirá un fragmento de péptido de Gly Pro Gly Thy Gln (SEQ ID NO: 7) al extremo N de la proteína o péptido de interés. Mientras tanto, los sitios de restricción se añadieron al ADNc de HMGB1 de longitud completa o péptido por PCR, y el ADNc se insertó en el sitio del vector KpnI/EcoRI.

15 Se transfectó el vector de expresión pCAGGS producido anteriormente en una línea de células cultivadas derivadas de células de riñón fetal humanas HEK293 usando polietilenimina (PEI). Después de 48 horas, se recogieron las células y el sobrenadante de cultivo. Las células y el sobrenadante de cultivo se recogieron por separado por centrifugación a 4.400 g a 4 °C durante cinco minutos. Entonces, el sobrenadante recogido se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa que tenía poros con un diámetro de 0,8 μm y entonces a través de un filtro de nitrocelulosa que tenía poros con un diámetro de 0,45 μm para preparar una muestra retirada de fracciones insolubles. La muestra se cargó sobre HisTrap FF de 5 ml (GE) equilibrada con 50 ml de Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM, y entonces los componentes absorbidos se lavaron con Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM e imidazol 10 mM para eliminar los componentes no específicamente adsorbidos. Los componentes específicamente adsorbidos se eluyeron de la columna usando Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM e imidazol 100 mM. Las fracciones adsorbidas se fraccionaron en tubos de plástico recubiertos de silicona (500 μl/tubo). Se combinaron juntas las fracciones que contenían proteína y entonces se retiró el imidazol

20 usando una columna de desalación PD10 (GE). Las fracciones se eluyeron usando Tris HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM. Se añadió HRV3C (Novagen) a las muestras eluidas y la mezcla se incubó a 4 °C durante ocho horas. Después de la escisión de las marcas, la muestra se cargó sobre una columna de heparina HiTrap de 1 ml (GE) equilibrada con Tris HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM. El interior de la columna se lavó con Tris HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 1.000 mM.

Ensayo de migración

30 Se desprendieron de las placas usando tripsina células de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea de ratón (células MSC-1, establecidas por Tamai *et al.* de la Universidad de Osaka (se movilizan células PDGFRα-positivas en médula ósea por grupo de alta movilidad de caja 1 (HMGB1) para regenerar epitelios lesionados. (Tamai *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. Apr. 4, 2011))), y se recogieron por centrifugación a 1200 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Se soltó el sedimento resultante y se suspendió a una concentración de células de 2,0 x 10<sup>6</sup> a 3,0 x 10<sup>6</sup> células/ml añadiendo medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) que contenía 10 % de suero bovino fetal (FBS). Se diluyeron con D-MEM que contenía 10 % de FBS la proteína recombinante y los péptidos producidos en HEK293. El control negativo usado fue solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se usó una cámara acrílica de Boyden; se colocaron células de la línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea de ratón preparadas a una concentración de células de 3 x 10<sup>6</sup> células/ml en su capa superior, mientras que una proteína o péptido diluido se añadió a la capa inferior. Más específicamente, se añadió una alícuota de 28 μl de una solución de proteína o péptido a cada pocillo de la placa inferior de una cámara de quimiotaxis de 48 pocillos (NEURO PROBE 48WELL CHEMOTAXIS CHAMBER), y se colocó una membrana de policarbonato con poros de 8 μm (Neuro Probe, Inc, Cat: 866-417-0014) en la placa inferior. Entonces, se colocó una placa superior sobre la membrana y se enroscó fuertemente. Se añadieron a los pocillos de la placa superior 50 μl de células de la línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea de ratón después del ajuste de concentración. La cámara se colocó en una estufa de incubación bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Después de cuatro horas, la membrana se retiró de la cámara y se tiñó con Dif-Quik (Sysmex, Cat: 16920) para detectar células que migraron a través de los poros de la membrana al compartimento inferior.

Resultados

55 Se evaluaron HMGB1 de ratón completa (1-215), y un péptido de las posiciones 1 a 84 (1-84), un péptido de las posiciones 85 a 169 (85-169), un péptido de las posiciones 1 a 44 (1-44), un péptido de las posiciones 45 a 84 (45-84) y el control negativo (PBS) para la presencia de actividad promotora de la migración. Toda la proteína y los péptidos se usaron a 50 μg/ml. 85-169 no mostró actividad promotora de la migración detectable, mientras que los restantes 1-215, 1-84, 1-44 y 45-84 mostraron actividad promotora de la migración (Fig. 2).

Además, se usaron un péptido de las posiciones 45 a 215 (45-215) y un péptido de las posiciones 63 a 215 (63-215) a concentraciones de 5, 15 y 25 μg/ml para probar la actividad promotora de la migración (Fig. 3).

## Discusión

En HMGB1 de ratón, rata y humana (SEQ ID NO: 3, 5 y 1, respectivamente), la secuencia de aminoácidos que engloba las posiciones 1 a 85 se conoce como la caja A, mientras que la secuencia de aminoácidos que engloba las posiciones 86 a 169 se conoce como la caja B. Entre ratón, rata y humano, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 185 es completamente idéntica, manteniendo el 100 % de identidad. La secuencia de aminoácidos desde las posiciones 186 hasta 215 es una secuencia repetida de ácido glutámico y ácido aspártico, que es 100 % idéntica entre ratón y rata y solo se diferencia en dos aminoácidos de la secuencia humana. Fue indetectable la actividad promotora de la migración del fragmento 85-169, sugiriendo que carece de actividad o tiene la actividad por debajo del límite de detección en las condiciones del presente experimento. Por otra parte, 1-84, 1-44 y 45-84 mostraron excelente actividad promotora de la migración. Por tanto, se predice que un dominio con actividad promotora de la migración existe al menos en dos localizaciones: dentro de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 44 y la secuencia de aminoácidos de las posiciones 45 a 84. Se conoce que HMGB1 promueve la migración de células tales como células dendríticas, y se cree que la migración se induce cuando HMGB1 estimula un receptor denominado RAGE. Se conoce que el dominio de unión a RAGE se sitúa en la región correspondiente a las posiciones de aminoácidos 150 a 181 en HMGB1. Es sorprendente el presente descubrimiento de que al menos dos dominios diferentes del dominio de unión a RAGE promovieron la migración de células madre mesenquimatosas de la médula ósea.

Tanto 45-215 como 63-215 presentaron actividad promotora de la migración de un modo dependiente de la concentración. La actividad de 45-215 fue más fuerte en comparación con 63-215. Por tanto, se predice que existe al menos un dominio con actividad promotora de la migración dentro de los aminoácidos desde las posiciones 63 hasta 84. Además, los siguientes péptidos producidos usando HEK293 también mostraron la actividad de promover la migración de la línea madre mesenquimatosa MSC-1 de la médula ósea:

- un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 42 (1-42),
- un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 43 (1-43),
- 25 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 45 (1-45),
- un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 46 (1-46),
- un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 47 (1-47),
- un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 48 (1-48),
- un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 49 (1-49),
- 30 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 50 (1-50),
- un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 51 (1-51),
- un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 52 (1-52), y
- un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 62 (1-62).

35 [Ejemplo 2] Clasificación de las células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas cultivadas primarias y evaluación de la actividad promotora de la migración

Se cortaron fémures y huesos tibiales de ratones donantes: B6.129S4-Pdgfratm11(EGFP)Sor/J (Ratón PDGFR $\alpha$ -GFP). Despues de retirar músculos unidos y otros tejidos, los huesos se machacaron finamente y se incubaron con 0,2 % de colagenasa (Roche, REF: 10103586001)/DMEM/2 % de FBS (filtrado) a 37 °C durante 40 minutos. Entonces, se retiraron los agregados celulares y los tejidos de músculo por filtración a través de una malla de nailon de 40  $\mu$ m. Despues de la centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos, las células resultantes se suspendieron en aMEM que contenía 10 % de FBS y 1 % de P/S y se cultivaron en una estufa de incubación bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C hasta que alcanzaron 100 % de confluencia. Se recogieron las células y se llevó a cabo el siguiente experimento según el protocolo adjunto a CD11b MicroBeads (Miltenyi Biotec; pedido N°: 130-049-601). Las células se ajustaron a 10<sup>7</sup> células/90  $\mu$ l con PBS(-), y se añadieron CD11b MicroBeads a 10  $\mu$ l/10<sup>7</sup> células. Despues de 40 15 minutos de reacción a 4 °C, las células se lavaron dos veces y se suspendieron en 500  $\mu$ l de PBS(-). El tubo se colocó en el separador AutoMACS y las células se recogieron según el programa de separación "Depletes". Las células recogidas se sembraron sobre una placa de cultivo de células adherentes. Despues de la adhesión, se observó la fluorescencia de GFP usando un microscopio de fluorescencia. Se probó el péptido 1-44 anteriormente descrito producido en HEK293 para la actividad promotora de la migración usando células CD11b-negativas. El péptido se usó a una concentración de 40  $\mu$ g/ml.

### Resultados

Las células PDGFR $\alpha$ GFP fueron apenas detectables entre las células CD11b-positivas, mientras que se observó un gran número de células PDGFR $\alpha$ GFP entre las células CD11b-negativas (Fig. 4). Mientras tanto, el péptido 1-44 producido usando HEK293 presentó una fuerte actividad promotora de la migración en células CD11b-negativas, PDGFR $\alpha$ -positivas (Fig. 5).

5 Discusión

Se considera que las células CD11b-negativas, PDGFR $\alpha$ -positivas, contienen un gran número de células madre mesenquimatosas de la médula ósea, que son un tipo de células madre multipotentes de la médula ósea. Se espera que el péptido 1-44 muestre actividad promotora de la migración no solo en la línea establecida de célula madre mesenquimato de la médula ósea, sino también en células madre mesenquimatosas de la médula ósea de cultivo primario.

10 Prueba para la expresión de proteína PDGFR $\alpha$  en células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas

Métodos

15 Se cultivaron células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) (Takara Bio; producto Nº PT034) usando el kit de medio químicamente definido de células madre mesenquimatosas humanas (MSCGM-CD(tm) BulletKit(tm)) (Takara Bio; producto Nº B0632) según el manual de producto. Se usaron en los experimentos al menos células que se habían sometido a pases cinco veces o menos.

20 Para la transferencia Western, se recogieron aproximadamente  $5 \times 10^7$  células y se suspendieron en 1 ml de PBS. La suspensión de células se combinó con 200  $\mu$ l de tampón de muestra 6x SDS-PAGE, y se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Se disolvió en el tampón de muestra un lisado de células bacterianas de *E. coli* (JM109) que expresaba PDGFR $\alpha$  de rata y se usó como control positivo. Entonces, se sometieron a electroforesis en un gel al 7,5 % de SDS-PAGE 20  $\mu$ l de cada muestra y Precision Plus Dual color Standard (Bio-Rad (cat Nº: 161-0374) como marcadores de peso molecular. Despues de la electroforesis, el gel se guardó y se transfirió sobre una membrana de PVDF según un método convencional. La membrana de PVDF de muestra transferida se bloqueó sumergiendo en 2 % de leche desnatada / 0,1 % de Tween20 (PBS-T) a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó el exceso de leche desnatada sobre la membrana usando PBS-T. Se diluyó 3000 veces con PBS-T/2 % de leche desnatada el anticuerpo polyclonal de conejo anti-humano contra PDGFR $\alpha$  (Lifespan Bioscience (cat Nº: LS-C9640) como anticuerpo primario, y la membrana bloqueada se sumergió en él durante una hora. Entonces, la membrana se lavó un total de tres veces sumergiendo en PBS-T durante 10 minutos. Se diluyó 15000 veces con PBS-T/2 % de leche desnatada Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (GE healthcare (cat Nº: NA934) como anticuerpo secundario, y la membrana se sumergió en él durante una hora. Entonces, la membrana se lavó un total de tres veces sumergiendo en PBS-T durante 10 minutos. Se detectaron bandas de PDGFR $\alpha$  usando ECL Prime (GE healthcare (cat Nº: RPN2232) según el manual de producto.

25 Resultados

30 Se detectó el control positivo, PDGFR $\alpha$  de rata producida en *E. coli*, como una banda con un tamaño de aproximadamente 170 kDa. Mientras tanto, se detectó PDGFR $\alpha$  de células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas en una posición de un peso molecular un poco mayor (Fig. 2B).

35 Discusión

40 Se detectó por transferencia Western la expresión de proteínas PDGFR $\alpha$  no solo en células madre mesenquimatosas de la médula ósea ratón, sino también en humanas. El motivo por el que el tamaño fue un poco mayor que el de PDGFR $\alpha$  de rata producida en *E. coli* puede ser debido a la presencia de modificación tal como glucosilación. Se demostró que PDGFR $\alpha$  también se expresaba en células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas.

45 [Ejemplo 3] Evaluación de células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas de cultivo primario para multipotencia

50 Clasificación por FACS de células PDGFR $\alpha$ -positivas, linaje-negativas, c-kit-negativas

Bajo anestesia suficientemente profunda con isoflurano, se sacrificaron por inhalación de dióxido de carbono ratones C57B16 (macho, 6 semanas de edad). Se cortaron los fémures y huesos tibiales y se retiraron de ellos la grasa y los tejidos de músculo. Los huesos se sumergieron en EtOH para retirar minuciosamente de ellos los tejidos unidos. Se obtuvieron tejidos de médula ósea usando una jeringa con aguja 26G. Las células de la médula ósea obtenidas se combinaron con DMEM que contenía 0,2 % de colagenasa A y se incubaron a 37 °C durante 40 minutos. Despues de añadir DMEM que contenía 10 % de FBS, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se recogieron las células de la médula ósea precipitadas.

Las células se sembraron en una placa de cultivo con un diámetro de 10 cm y se cultivaron usando D-MEM que contenía 10 % de FBS complementado con 1x estreptomicina-penicilina en una estufa de incubación bajo 5 % de

CO<sub>2</sub> a 37 °C. El medio se cambió con fresco una vez cada tres días. Se desechó el medio de las células adherentes y las células se lavaron dos veces añadiendo 10 ml de PBS. Después de añadir 5 ml de 0,25 % de tripsina, las células se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Se recogieron las células desprendidas de la placa de cultivo y se añadió D-MEM que contenía 10 % de FBS para detener la reacción de tripsina. Las células se centrifugaron a 5 1200 rpm durante 3 minutos. Se recogieron las células precipitadas, se suspendieron a 1 x 10<sup>6</sup> células/100 µl en PBS que contenía 2 % de FBS, y se dispensaron en cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadió la mezcla de anticuerpos APC-mouse Lineage (BD Phamingen; Cat. 558074) como anticuerpo primario en 10 µl/pocillo. Se añadieron 1 µl de cada uno de PE-mouse CD140a (PDGFR $\alpha$ ) (BD Bioscience; Cat. 12-1401-81) y FITC-mouse c-kit (BD Bioscience) a cada pocillo. Las células se incubaron a 4 °C en la oscuridad durante 10 20 minutos. Después de añadir 200 µl de PBS que contenía 2 % de FBS a cada pocillo, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante. Entonces, las células se lavaron dos veces del mismo modo. Las células se clasificaron usando el clasificador de células BD FACSaria.

#### Inducción de diferenciación osteogénica

15 Cuando las células se cultivaron a 70 % de confluencia, el medio se cambió con un medio de diferenciación osteogénica (R & D; preparado con SC010) cada dos a tres días. Se cultivaron las células en una estufa de incubación a 37 °C bajo 5 % de CO<sub>2</sub>. El cultivo continuó durante aproximadamente tres semanas.

#### Tinción con ALP

20 Las células sometidas a inducción de diferenciación osteogénica se fijaron durante 10 segundos con la disolución fijadora del kit (preparada de antemano a partir de la disolución de preparación de fijador), y se tiñeron a 37 °C durante tres minutos con una disolución de sustrato preparada de Fast Blue RR Salt y la disolución madre de sustrato (Muto Pure Chemicals; Cat. Nº 1568-2). Las células ALP-positivas se tiñeron de púrpura azulado.

#### Inducción de diferenciación adipogénica

25 Cuando las células se cultivaron a 100 % de confluencia, el medio se cambió con un medio de diferenciación adipogénica (R & D; preparado con SC010) cada tres a cuatro días. Las células se cultivaron en una estufa de incubación a 37 °C bajo 5 % de CO<sub>2</sub>. El cultivo continuó durante aproximadamente dos semanas.

#### Tinción con Oil Red

Las células sometidas a inducción de diferenciación adipogénica se fijaron con la disolución fijadora de propilenglicol unida al kit, y entonces se tiñeron adipocitos usando disolución de Oil Red O (DBS; artículo Nº KT 025).

#### Resultados

30 Se observaron células teñidas de púrpura azulado entre las células sometidas a inducción de diferenciación osteogénica, que indica que las células se diferenciaron en células de osteoblastos (Fig. 6A). Mientras tanto, se observaron adipocitos que contenían gotas de aceite teñidas de rojo entre las células sometidas a inducción de diferenciación adipogénica, que indica que las células se diferenciaron en adipocitos (Fig. 6B).

#### Discusión

35 Se espera que las células PDGFR $\alpha$ -positivas de médula ósea contengan al menos células madre mesenquimatosas de la médula ósea capaces de diferenciación osteogénica y adipogénica.

#### [Ejemplo 4] Evaluación de péptidos sintéticos para actividad promotora de la migración

40 Los péptidos enumerados a continuación se sintetizaron personalizados usando el método en fase sólida por Medical & Biological Laboratories (MBL). Los péptidos se sintetizaron basándose en la secuencia de HMGB1 de ratón (SEQ ID NO: 3). Los péptidos sintéticos descritos en los ejemplos posteriores también se prepararon basándose en la secuencia de HMGB1 de ratón.

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

45 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 1 hasta 34 de HMGB1 (1-34);

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 37 hasta 62 de HMGB1 (37-62);

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 27 hasta 62 de HMGB1 (27-62);

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 56 hasta 72 de HMGB1 (56-72);

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 20 de HMGB1 (11-20);

5 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 25 de HMGB1 (11-25);

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 30 de HMGB1 (11-30);

10 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 34 de HMGB1 (11-34);

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 44 de HMGB1 (11-44);

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 17 hasta 44 de HMGB1 (17-44);

15 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 1 hasta 25 de HMGB1 (1-25); y

se ajustó a 100 µg/ml HMGB1 de ratón completa producida en HEK293 (1-215(HEK)) como control positivo y se dispuso en la capa inferior de una cámara de quimiotaxis para evaluar la actividad promotora de la migración sobre la línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea (MSC-1).

20 Resultados

Se encontró que al menos los péptidos sintéticos (11-34), (1-34), (11-44), (1-44) y (11-30) tenían actividad comparable o superior a la del control positivo (Fig. 7). Además, también se encontró que los péptidos sintéticos (11-25) y (1-25) tenían actividad (Fig. 7).

Discusión

25 Se predice a partir de los resultados del Ejemplo 1 que las secuencias de aminoácidos de las posiciones 1 a 44 y las posiciones 45 a 84 contenían cada una al menos una región que tiene la actividad promotora de la migración. A partir de los resultados del presente experimento del Ejemplo 4, se predice que el péptido sintético (11-34) tiene una fuerte actividad promotora de la migración y existe un centro activo al menos en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 34. Además, también se encontró que el péptido sintético (11-25) tenía la actividad aunque 30 fue ligeramente más débil. Se espera que exista una región de centro activo dentro de la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 25, y las secuencias de aminoácidos localizadas antes y después del centro potencian la actividad.

[Ejemplo 5]

Métodos

35 Con el fin de restringir la localización del centro activo, se sintetizaron los péptidos más cortos enumerados a continuación.

Un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 27 de HMGB1 (11-27),

40 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 28 de HMGB1 (11-28),

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 29 de HMGB1 (11-29),

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 12 hasta 30 de HMGB1 (12-30),

45 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 13 hasta 30 de HMGB1 (13-30),

un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 14 hasta 30 de HMGB1 (14-30),

- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 15 hasta 30 de HMGB1 (15-30),
- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 16 hasta 30 de HMGB1 (16-30),
- 5 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 17 hasta 30 de HMGB1 (17-30),
- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 18 hasta 30 de HMGB1 (18-30),
- 10 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 19 hasta 30 de HMGB1 (19-30),
- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 20 hasta 30 de HMGB1 (20-30),
- 15 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 21 hasta 30 de HMGB1 (21-30),
- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 10 hasta 25 de HMGB1 (10-25),
- 20 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 25 de HMGB1 (11-25),
- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 12 hasta 25 de HMGB1 (12-25),
- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 13 hasta 25 de HMGB1 (13-25),
- 25 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 14 hasta 25 de HMGB1 (14-25),
- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 15 hasta 25 de HMGB1 (15-25),
- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 16 hasta 25 de HMGB1 (16-25),
- 30 un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 17 hasta 25 de HMGB1 (17-25), y
- un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 186 hasta 215 de HMGB1 (186-215).

Como controles positivos, se usaron sobrenadante centrifugado de la piel de un ratón de un día de edad (un individuo) incubado en PBS a 4 °C durante 12 horas, y la HMGB1 de ratón completa (HMGB1(HEK\_1-215)) producida en HEK293. Se colocaron células de una línea de células madre mesenquimatosas de la médula ósea (MSC-1) en la capa superior de una cámara de quimiotaxia, y se añadieron la proteína y los péptidos sintéticos a una concentración de 5 µM o 10 µM a la capa inferior de la cámara de quimiotaxia. El ensayo de migración se llevó a cabo por el mismo método que se describe en el Ejemplo 1.

#### Resultados

40 Al menos los péptidos sintéticos (11-27), (11-28), (11-29), (12-30), (13-30), (14-30) y (10-25) presentaron una fuerte actividad promotora de la migración a 5 µM. Mientras tanto, los péptidos sintéticos (11-25), (12-25), (13-25), (14-25), (15-25), (15-30), (16-25), (16-30), (17-25) y (17-30) mostraron una débil actividad (Fig. 8A y 8B).

#### Discusión

45 Se predice de los resultados del Ejemplo 4 que un dominio que tiene actividad promotora de la migración se localiza dentro de la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 11 hasta 25. Así, se espera que uno de los dominios que tiene actividad promotora de la migración esté presente en los aminoácidos desde las posiciones 17 hasta 25 (9 aminoácidos).

Comparación de fragmentos de HMGB1 para actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea

## Métodos

Se comparó cada uno de los péptidos sintéticos 15-30, 16-30, 17-30, 17-44, 45-74 y 55-84, que consiste en un fragmento de HMGB1, con un control negativo (PBS) para el nivel de la actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea. Se usó el método de la cámara de Boyden del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Cada péptido se añadió a 10  $\mu$ M a la capa inferior de la cámara. Se colocaron  $1.5 \times 10^6$  células dispersas en 1 ml de DMEM que contenía 10 % de FBS en la capa inferior de la cámara. Se insertó una membrana de policarbonato que tenía poros con un diámetro de 8  $\mu$ m entre las capas superior e inferior. Después de cuatro horas de incubación en una estufa de incubación bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, se retiró la membrana y se trató con Dif-Quik stain™ para teñir solo las células que migraron a la capa inferior. Después de la tinción, las células se secaron al aire, y las células que migraron a la capa inferior se contaron bajo un microscopio. Se calculó el número promedio.

## Resultados

Todos los péptidos presentaron actividad promotora de la migración más fuerte que la del control negativo.

## Discusión

La síntesis de péptidos es un método de producción altamente excelente para la producción farmacéutica, debido a que, en comparación con los métodos de producción que usan HEK293 o bacterias tales como *E. coli*, pueden garantizar una cantidad de producción coherente a bajos costes y prevenir la contaminación con toxinas biológicamente derivadas y similares. Por otra parte, a diferencia de la producción en organismos, la modificación y plegamiento post-traduccionales no ocurren apropiadamente, y, por tanto, péptidos de bajo peso molecular que contienen aminoácidos altamente hidrófobos se vuelven frecuentemente muy insolubles en disoluciones acuosas. En el presente ejemplo, puesto que la actividad promotora de la migración de péptidos fue relativamente débil, se midió correctamente usando un microscopio la intensidad de la actividad en comparación con el control negativo. Se detectó para todos los péptidos una fuerte actividad promotora de la migración en comparación con el control negativo (Fig. 8C).

### [Ejemplo 6] Evaluación de péptidos sintéticos para la actividad promotora de la migración

Se probaron por ensayo de migración los péptidos sintéticos (1-44) y (1-34) usados en el Ejemplo 4, el péptido (45-74) que consiste en los aminoácidos de las posiciones 45 a 74 y el péptido (55-84) que consiste en los aminoácidos de las posiciones 55 a 84, usando una cámara de quimiotaxis del mismo modo que se describe en el Ejemplo 5. El ensayo se llevó a cabo simultáneamente a dos concentraciones de 10  $\mu$ M y 5  $\mu$ M.

## Resultados

Ambos péptidos sintéticos (45-74) y (55-84) presentaron actividad promotora de la migración que fue, sin embargo, más débil en comparación con los péptidos sintéticos (1-44) y (1-34) (Fig. 9).

## Discusión

Los resultados del Ejemplo 1 mostraron que los péptidos (1-84), (1-44) y (45-84) producidos en HEK293 tuvieron fuerte actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas PDGFR $\alpha$ -positivas. Los resultados del Ejemplo 4 mostraron que los péptidos sintéticos (1-44) y (1-34) retuvieron la fuerte actividad. Mientras tanto, los resultados del Ejemplo 6 aquí revelaron que los péptidos sintéticos (45-74) y (55-84) también presentaron actividad promotora de la migración aunque fue ligeramente más débil.

Se conoce que los péptidos y las proteínas se someten a modificación tal como glucosilación cuando se sintetizan en células eucariotas tales como HEK293. Por otra parte, los péptidos sintéticos no experimentan modificación. El hecho de que la actividad promotora de la migración del péptido (45-84) producida en HEK293 fuera mayor en comparación con los péptidos sintéticos "(45-74) y (55-84)" que consisten en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 45 a 84 sugiere que el péptido se sometió a cierta modificación.

Mientras tanto, un experimento anterior usando mesoangioblastos (Palumbo et al., J. Cell Biol., 164: 441-449, 2004) ha mostrado que la secuencia que consiste en los aminoácidos de las posiciones 1 a 187 resultante de la escisión en el extremo C retiene la actividad promotora de la migración celular de HMGB1 (215 aminoácidos de longitud entera), mientras que casi no tiene actividad la secuencia que consiste en los aminoácidos de las posiciones 1 a 89, la secuencia que consiste en los aminoácidos de las posiciones 90 a 176 y la secuencia que consiste en los aminoácidos de las posiciones 1 a 176. Por otra parte, la porción que se predice que es un ligando para RAGE, que es uno de los receptores de HMGB1 conocidos, corresponde a la secuencia que consiste en los aminoácidos de las posiciones 150 a 181. El documento descrito anteriormente también muestra que la actividad promotora de la migración se suprime por un negativo dominante de RAGE. Además, otro informe (Yang et al., J Leukoc Biol. Jan;81(1): 59-66, 2007) muestra que el receptor de RAGE también se utiliza cuando HMGB1 promueve la migración de células dendríticas. Así, para la actividad promotora de la migración de HMGB1, previamente se ha prestado atención al péptido del extremo C de HMGB1, que es una porción de ligando para RAGE.

Los presentes ejemplos tuvieron éxito en identificar dos regiones que tenían actividad promotora de la migración celular dentro del péptido del extremo N, que se había creído que no tenían la actividad promotora de la migración celular. Se conoce que la excesiva inflamación es un factor inhibidor en la regeneración de tejido. Puesto que las regiones activas descubiertas en los presentes ejemplos son completamente diferentes del ligando para RAGE, se espera que permitan el reclutamiento de células madre PDGFR $\alpha$ -positivas mientras que se evita el reclutamiento de células inflamatorias tales como células dendríticas y, por tanto, será posible el desarrollo de productos farmacéuticos con muchos menos efectos secundarios.

[Ejemplo 7] Comparación cuantitativa del péptido (1-44) y HMGB1 completa para la actividad promotora de la migración

10 Se transfecaron células HEK293 con el vector de expresión para HMGB1 de ratón (1-44) usando polietilenimina, y se recogió HMGB1 secretada en sobrenadante de células y se purificó (HEK293 transitorias) del mismo modo que se describe en el Ejemplo 1. Por tanto, después de la transfección por el mismo procedimiento, se añadieron 2  $\mu$ g/ml de puromicina al medio de cultivo, y se seleccionaron por el fármaco las células que secretan constantemente HMGB1 (1-44). Se purificó la HMGB1 secretada a este sobrenadante de células (HMGB1-estables).

15 Producción de péptidos derivados de HMGB1 usando *E. coli*

Con el fin de producir el péptido de aminoácidos 1-44 usando *E. coli*, se insertó en el vector pENTR (Invitrogen) un ADNc para la expresión de un péptido quimérico que se iba a añadir al lado del extremo N de ADNc que codifica los aminoácidos de las posiciones 1 a 44 de ratón HMGB1 que se van a escindir por HRV3C. Se llevó a cabo la reacción de LR para la transferencia en el vector pDEST17. El vector de expresión tiene un promotor T7 y es capaz de la expresión de proteínas en *E. coli*. Además, añade la marca 6xHis al extremo N. Como resultado de la escisión por HRV3C, se retira la marca 6xHis y se añade un fragmento de péptido de Gly Pro Gly Thy Gln (SEQ ID NO: 7) al extremo N del péptido.

20 Se transformó BL21 de *E. coli* (DE3) con el vector de expresión anteriormente descrito por electroporación. Después de añadir medio SOC, se cultivó *E. coli* en un agitador a 37 °C durante 60 minutos. Las células se sembraron en una placa de agar de LB que contenía carbenicilina, y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Se recogieron colonias individuales y se combinaron con LB que contenía carbenicilina, y se cultivaron en un agitador a 37 °C. Cuando la D.O. 600 alcanzó 0,4-0,5, se añadió IPTG a una concentración final de 0,1 mM, y se agitó a 30 °C. Despues de 6 horas, se recogió *E. coli*, y se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos. Se recogió la *E. coli* precipitada, y se añadió a ésta Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM y urea 6 M. Se lisó la *E. coli* por pipeteado y se cargó sobre HisTrap FF(GE) de 5 ml equilibrada con Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM y urea 6 M. Entonces, el material adsorbido se lavó con Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM, urea 6 M e imidazol 10 mM para retirar los componentes no específicamente adsorbidos. El material específicamente adsorbido se eluyó de la columna con Tris HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 50 mM, urea 6 M e imidazol 300 mM. El material adsorbido se fraccionó en fracciones de 500  $\mu$ l en tubos de plástico recubiertos de silicona, y se combinaron juntas las fracciones que contenían proteína. Entonces, se retiró el imidazol usando una columna de desalación PD10 (GE) y la elución se llevó a cabo usando Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM. Se añadió HRV3C (Novagen) a la muestra eluida y se permitió que reaccionara a 4 °C durante 8 horas. Despues de la escisión de la marca, la muestra se cargó sobre una columna HisTrap FF de 1 ml equilibrada con Tris HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM, y el péptido se recogió como una fracción no unida.

40 Se preparó el péptido sintético (1-44) del mismo modo que se ha descrito anteriormente.

Se usaron los péptidos y la proteína a una concentración de 2  $\mu$ M para el ensayo de migración usando una línea de células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea. Se midieron el área de poros de la cámara de quimiotaxis y el área de células migradas usando software de análisis de imágenes.

### Resultados

45 Cuando se comparó por mol igual, el péptido (1-44) producido en HEK293 y el péptido (1-44) producido en *E. coli* presentaron ambos actividad promotora de la migración aproximadamente 1,6 veces superior a la de HMGB1 de longitud completa. Cuando se compara por masa igual, el péptido (1-44) producido en HEK293 y el péptido (1-44) producido en *E. coli* presentaron ambos actividad promotora de la migración aproximadamente 8 veces superior a la de HMGB1 de longitud completa. Mientras tanto, la actividad promotora de la migración del péptido sintético (1-44) fue 0,57 veces superior y 2,86 veces superior a HMGB1 de longitud completa cuando se compara por mol igual y por masa igual, respectivamente (Fig. 10).

### Discusión

55 Los resultados de los Ejemplos 1 y 6 y otros sugieren que existen al menos uno o más sitios de centro activo para la actividad promotora de la migración en cada una de la secuencia de aminoácidos de 1 a 44 y la secuencia de aminoácidos de las posiciones 45 a 84, y así existe un total de dos o más sitios de centro activo. Además, los resultados del presente Ejemplo 7 demostraron que el péptido (1-44) producido en HEK293 tenía actividad promotora de la migración casi 8 veces la de HMGB1 de longitud completa cuando se compara por masa igual

(aproximadamente 1,6 veces cuando se compara por número igual de moles). Además, el péptido (45-84) producido en HEK293 también tiene actividad promotora de la migración comparable (Fig. 2). Los hallazgos descritos anteriormente demuestran que HMGB1 tiene al menos dos regiones que tienen mayor actividad promotora de la migración que el mismo número de moles de HMGB1 de longitud completa, que se localizan dentro de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 44 y la secuencia de aminoácidos de las posiciones 45 a 84, y la actividad de HMGB1 de longitud completa es significativamente más baja que la suma de la actividad de las dos regiones. Puesto que el péptido de las posiciones 1 a 44 y el péptido de las posiciones 45 a 84 fueron adyacentes entre sí según el resultado de análisis cristalográficos de HMGB1 de longitud completa, se predice que estas regiones inhiben la actividad entre sí. Se sugiere que la separación en péptidos produjo la eliminación de la inhibición y un aumento en la actividad de cada uno.

[Ejemplo 8] Análisis de FACS de la línea de células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea para la expresión de PDGFR $\alpha$ , marcador de linaje y CD44

Se sembraron en una placa de cultivo con un diámetro de 10 cm células de la línea de células madre mesenquimatosas MSC-1 de la médula ósea derivadas de ratón y se cultivaron en una estufa de incubación bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C usando D-MEM que contenía 10 % de FBS complementado con 1x estreptomicina-penicilina. Despues de que se cultivaran las células hasta 80-90 % de confluencia, se desechó el medio y las células se lavaron dos veces añadiendo 10 ml de PBS. Entonces, se añadieron 5 ml de 0,25 % de tripsina y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Se recogieron las células desprendidas de la placa de cultivo y se añadió DMEM que contenía 10 % de FBS para detener la reacción de tripsina. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos. Se recogieron las células precipitadas y se suspendieron a 1 x 10<sup>6</sup> células/100  $\mu$ l de PBS que contenía 2 % de FBS. Las células se dispensaron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadió a 10  $\mu$ l/pocillo la mezcla de anticuerpo APC-mouse Lineage (BD Phamingen; Cat. 558074) como anticuerpo primario. Se añadieron a cada pocillo 1  $\mu$ l de cada uno de PE-mouse CD140a (PDGFR $\alpha$ ) (BD Bioscience; Cat. 12-1401-81) y FITC-mouse CD44 (BD Bioscience; Cat. 553-133). Las células se incubaron a 4 °C en la oscuridad durante 20 minutos. Se añadió a cada pocillo una alícuota de 200  $\mu$ l de PBS que contenía 2 % de FBS. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante resultante. Entonces, las células se lavaron dos veces del mismo modo. Las células se suspendieron en 100  $\mu$ l de PBS y se analizaron con BD FACSCantTMII.

### Resultados

Las células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea fueron PDGFR $\alpha$ -positivas, linaje-negativas y CD44-positivas (Fig. 11).

### Discusión

Las células usadas para la actividad promotora de la migración retienen las propiedades de las células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFR $\alpha$ -positivas.

[Ejemplo 9] Actividad promotora de la migración de péptido sintético (1-34) en queratinocitos de ratón

Se sacrificaron ratones C57/B16 recién nacidos usando inhalación de isoflurano y dióxido de carbono. Entonces, los ratones se lavaron minuciosamente con EtOH y PBS. Se exfolió la piel junto con la dermis y se lavó la sangre con PBS. Se dispuso la piel exfoliada en dispasa I (Sanko Junyaku Co., Cat: GD81060) a 4 °C durante 16 horas. Se desprendieron la epidermis y la dermis con pinzas, y la epidermis se puso en tripsina (Nacalai tesque, Cat: 3554-64) a 37 °C durante 10 minutos. Cuando empezó a aparecer turbidez blanca, la reacción se detuvo con S-MEM (GIBCO, Cat: 11380)/15 % de FBS(Ca-)P/S. Las células resultantes se centrifugaron a 160 x g durante 5 minutos, y se suspendieron en medio CnT-07 (CELLnTEC, Cat: CnT-07 BM) y se pusieron en una placa de 10 cm. Las células se cultivaron bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C y el medio se cambió cada tres días. Las células se sometieron a pasas cuando alcanzaron 80 % a 90 % de confluencia. Las células se recogieron de la placa usando tripsina. Despues de la inactivación de tripsina con DMEM que contenía 10 % de FBS, se examinó un péptido sintético que consistía en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 34 (1-34) para la actividad promotora de la migración según el método del ensayo de migración descrito anteriormente.

### Expresión de PDGFR $\alpha$ en queratinocitos de ratón

Se fijaron por perfusión con 4 % de PFA ratones B6.129S4-Pdgfratm11(EGFP)Sor/J recién nacidos. Se escindió un área de 1,0 x 1,0 cm<sup>2</sup> de la piel del recién nacido, y se fijó adicionalmente por inmersión con 4 % de PFA durante 12 horas y entonces con 30 % de sacarosa durante 12 horas a 4 °C. Despues de lavar con PBS(-), la piel se crioincorporó en el compuesto OTC y se hicieron cortes en crio secciones de 8  $\mu$ m en un criostato. Las secciones se lavaron dos veces con PBS para lavar el compuesto, y se bloquearon con 10 % de suero de cabra en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. El anticuerpo primario usado fue conejo anti-queratina 5 (Covance, Cat: PRB-160P) o conejo anti-vimentina (Abcam, Cat: ab7783-500) diluido 500 veces con PBS que contenía 10 % de suero de cabra. Despues de cinco horas de incubación con el anticuerpo primario a 4 °C, las secciones se lavaron dos veces con PBS. El anticuerpo secundario usado fue Alexa Fluor 546-IgG(H+L) de cabra anti-conejo (Invitrogen, Cat: A11035) diluido 500 veces con PBS que contenía 10 % de suero de cabra. Despues de 45 minutos de incubación

con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente, las secciones se lavaron dos veces con PBS, y se incubaron con 2 µg/ml de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) a temperatura ambiente durante 3 minutos. Entonces, después de lavar dos veces con PBS, las secciones se montaron con un medio de montaje que contenía un montante de fluorescencia.

5 Resultados

El péptido sintético (1-34) no mostró la actividad promotora de la migración en queratinocitos de ratón (Fig. 12A). Además, no se observó la fluorescencia de GFP en células positivas para queratina 5, que es un marcador de queratinocitos de ratón (Fig. 12B).

Discusión

10 Los queratinocitos no expresaron PDGFR $\alpha$ . Además, el péptido sintético (1-34) no tuvo actividad promotora de la migración en queratinocitos.

[Ejemplo 10] Actividad promotora de la migración del péptido sintético (1-34) en fibroblastos de piel de ratón

Se sacrificaron ratones C57/B16 recién nacidos usando inhalación de isoflurano y dióxido de carbono. Entonces, los ratones se lavaron minuciosamente con EtOH y PBS. Se exfoliaron la piel junto con la dermis y se lavó la sangre con PBS. Se dispuso la piel exfoliada en trozos finos con tijeras. Los trozos de piel se colocaron en DMEM (Nacalai tesque, Cat: 08458-45) que contenía 0,2 % de colagenasa (Roche, REF: 10103586001) y se agitaron a 37 °C

15 durante 30 minutos. La reacción se detuvo con DMEM/30 % de FBS/P/S. Se centrifugaron a 160 x g durante 5 minutos las células resultantes y se colocaron en una placa de 10 cm. Las células se cultivaron bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C y el medio se cambió cada tres días. Las células se sometieron a pases cuando alcanzaron 80 % a 90 % de confluencia. Las células se recogieron de la placa usando tripsina. Después de la inactivación de tripsina con D-MEM que contenía 10 % de FBS, se evaluó un péptido sintético que consistía en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 34 (1-34) para actividad promotora de la migración según el método del ensayo de migración descrito anteriormente.

25 Se fijaron por perfusión con 4 % de PFA ratones B6.129S4-Pdgfratm11(EGFP)Sor/J recién nacidos. Se escindió un área de 1,0 x 1,0 cm<sup>2</sup> de la piel del recién nacido, y se fijó adicionalmente por inmersión con 4 % de PFA durante 12 horas y luego con 30 % de sacarosa a 4 °C. Después de lavar con PBS(-), la piel se crioincorporó en el compuesto OTC y se hicieron cortes en criosecciones de 8 µm en un criostato.

30 Las secciones se lavaron dos veces con PBS para lavar el compuesto, y se bloquearon con 10 % de suero de cabra en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. El anticuerpo primario usado fue conejo anti-vimentina (Abcam; Cat. ab7783-500) diluido 500 veces con PBS que contenía 10 % de suero de cabra. Después de cinco horas de incubación con el anticuerpo primario a 4 °C, las secciones se lavaron dos veces con PBS. El anticuerpo secundario usado fue Alexa Fluor 546-cabra IgG(H+L) anti-conejo (Invitrogen; Cat. A11035) diluido 500 veces con PBS que contenía 10 % de suero de cabra. Después de 45 minutos de incubación con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente, las secciones se lavaron dos veces con PBS, y se incubaron con 2 µg/ml de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) a temperatura ambiente durante 3 minutos. Entonces, después de lavar dos veces con PBS, las secciones se montaron con un medio de montaje que contenía montante de fluorescencia.

35 Resultados

40 El péptido sintético (1-34) presentó actividad promotora de la migración en fibroblastos de piel (Fig. 13A). Además, se observaron células positivas por fluorescencia de GFP entre las células positivas para vimentina, que es un marcador de fibroblastos (Fig. 13B).

Discusión

45 Los fibroblastos de piel expresaron PDGFR $\alpha$ . El péptido sintético (1-34) tuvo actividad promotora de la migración en fibroblastos de piel. Tanto las células madre mesenquimatosas de la médula ósea como los fibroblastos de piel de recién nacido fueron positivos para PDGFR $\alpha$ . El péptido (1-34) mostró actividad promotora de la migración en ambas células, pero no en queratinocitos, que son células PDGFR $\alpha$ -negativas. Se espera que PDGFR $\alpha$  sea útil como un marcador para células en las que las secuencias de aminoácidos que comprenden el péptido (1-34) presentan actividad promotora de la migración.

[Ejemplo 11] Evaluación de la expresión de PDGFR $\alpha$  en fibroblastos de piel de ratón usando FACS

50 Se lavaron minuciosamente con EtOH y PBS ratones B6.129S4-Pdgfratm11(EGFP)Sor/J recién nacidos. La piel se desprendió de los músculos y se cortó en trozos pequeños con una anchura de 3 mm. Los trozos de piel se transfirieron a DMEM/5 % de FBS que contenía 500 unidades/ml de dispasa y se incubó a 4 °C durante 18 horas. Se exfoliaron la dermis de la epidermis y se cortó en trozos finos con tijeras. Los trozos finos de dermis se colocaron en DMEM que contenía 0,2 % de colagenasa y se agitaron a 37 °C durante 30 minutos. Después de añadir DMEM que contenía 30 % de FBS, las células resultantes se centrifugaron a 160 x g durante 5 minutos. Las células precipitadas

se sembraron en una placa de 10 cm y se cultivaron bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. El medio se cambió cada tres días y las células se sometieron a pases cuando alcanzaron 80 % a 90 % de confluencia. Las células se recogieron de la placa usando tripsina, y después de añadir D-MEM que contenía 10 % de FBS, las células se recogieron por centrifugación. Se detectó la fluorescencia de GFP de las células y se analizó con BD FACSCantTMII.

5 Resultados

98 % o más de los fibroblastos en piel de ratón recién nacido fueron positivos para PDGFRα (Fig. 14).

Discusión

Se cuantificaron usando FACS células PDGFRα-positivas. Se mostró que casi todos los fibroblastos eran células PDGFRα-positivas, como en el resultado de inmunohistoquímica.

10 [Ejemplo 12]

Métodos

Se disolvió en 200 µl de PBS 10 µg de péptido sintético (aminoácidos de las posiciones 1 a 44) y se administró a ratones C57B16 (hembra, 8 semanas de edad) mediante la vena caudal usando una jeringa con aguja de 30 de calibre. Se administró un volumen igual de PBS como control negativo. Después de 12 horas, se recogió sangre periférica del ventrículo izquierdo del corazón bajo anestesia sistémica con isoflurano. Después de añadir 3 ml de PBS (Nacalai tesque; Cat. 14249-95), se recubrieron 3 ml de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare; Cat. 17-1440-02) sobre la sangre. La sangre se centrifugó en una centrifugadora a 400 g y 25 °C durante 45 minutos. Se desecharó la capa de suero superior, y solo se recogieron las células observadas como una banda blanca en la capa intermedia. Entonces, se añadieron 45 ml de PBS a las células recogidas, y se centrifugaron en una centrifugadora a 800 g y 25 °C durante 20 minutos. Después de desechar el sobrenadante, se añadieron 10 ml de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm y 25 °C durante 10 minutos. Se desecharó el sobrenadante y se añadió 1 ml de tampón de hemólisis (HLB; Immuno-Biological Laboratories) a las células. Después de pipetear, las células se dejaron reposar durante 5 minutos. Entonces, se añadieron 10 ml de PBS a las células y se centrifugaron a 1500 rpm y 25 °C durante 10 minutos. Se recogieron las células mononucleares precipitadas y se ajustaron a 1 x 10<sup>6</sup> células/100 µl (PBS que contenía 2 % de FBS) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadió 1 µl de cada uno de PE-mouse CD140a (PDGFRα) (BD Bioscience; Cat. 12-1401-81) o FITC-mouse CD44 (BD Bioscience, Cat. 553-133) a cada pocillo que contenía las células mononucleares. Las células se incubaron a 4 °C en la oscuridad durante 20 minutos. Se añadieron 200 µl de PBS a cada pocillo, y se centrifugaron a 1500 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Se desecharó el sobrenadante y otra vez se añadieron 200 µl de PBS a cada pocillo. Las células se centrifugaron a 1500 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Las células se suspendieron en 100 µl de PBS, y se añadieron a éstas 300 µl de 1 % de paraformaldehído. Se preparó un control usando un anticuerpo de control de isotipo del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Las células preparadas como se ha descrito anteriormente se analizaron usando FACSCant™ II.

Resultados

35 En el grupo de control negativo (grupo de administración de PBS), la proporción de células PDGFRα-positivas, CD44-positivas en la sangre periférica fue 1,33 % en promedio. Mientras tanto, en el grupo de administración de péptido (1-44), la proporción aumentó a 4,33 % en promedio (Fig. 15)

Discusión

40 Cuando se sintetizó un péptido de las posiciones de aminoácidos 1 a 44 de HMGB1 y se administró a ratones, las células PDGFRα-positivas, CD44-positivas, aumentaron después de 12 horas. En el Ejemplo 8, el péptido presentó *in vitro* actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea PDGFRα-positivas, CD44-positivas. El presente ejemplo demuestra que el péptido también recluta células PDGFRα-positivas, CD44-positivas, a la sangre periférica *in vivo*. Tanto la positividad de PDGFRα como la positividad de CD44 son marcadores para células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Se conoce que las células madre mesenquimatosas de la médula ósea son útiles en medicina regenerativa. Así, se espera que la administración intravenosa del péptido sea eficaz para tratar tejidos dañados.

[Ejemplo 13] Creación del modelo de oclusión por hilo de la arteria cerebral media

50 Se usaron ratas Wister macho de ocho a diez semanas de edad. Las ratas se anestesiaron por inhalación de isoflurano mientras que se calentaban en una estera de mantenimiento en caliente con una monitorización de la temperatura corporal. Después de confirmar que el efecto anestésico fue suficiente, se retiró pelo cervical para exponer la piel. Se esterilizó el sitio quirúrgico con alcohol. A lo largo de la línea media cervical, se cortó la piel con un bisturí. Después de ligar la arteria carótida externa derecha y presurizar la arteria carótida común derecha para bloquear temporalmente la circulación sanguínea, se insertó en la arteria carótida externa derecha hacia la arteria carótida interna derecha un hilo de oclusión hecho de nailon de monofilamento Nº 4 con punta siliconizada. Mientras 55 que se soltaba la presión en la arteria carótida común, se avanzó el hilo de oclusión junto con la circulación

sanguínea desde la arteria carótida interna hasta la bifurcación hasta la arteria cerebral media de manera que se bloqueara la circulación sanguínea. Además, se ligó el hilo alrededor de la arteria carótida común derecha para bloquear completamente la circulación sanguínea durante 50 minutos. Después de retirar el hilo de la oclusión y aflojar la ligadura en la arteria carótida común, se suturó la piel para completar la cirugía.

5 Administración de agentes terapéuticos

Se administraron 50 µg de péptido sintético (1-44) en la vena caudal. La primera administración se llevó a cabo 6 horas después de la producción de infarto cerebral. Entonces, el péptido se administró cinco veces a intervalos de 24 horas (cinco días en total).

Determinación del tamaño del infarto cerebral

- 10 Después de 14 días de la administración del fármaco final, las ratas se administraron con anestesia suficientemente profunda, y se pusieron en un recipiente lleno de dióxido de carbono. Se confirmó la parada completa del latido del corazón y la respiración. Se cortaron los cerebros y se fijaron inmediatamente por inmersión en 10 % de formalina tamponada. Después de la incorporación en parafina, se prepararon secciones delgadas y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se prepararon cuatro secciones a partir de cada cerebro 1,92 mm anterior al bregma (1,92), 15 0,60 mm anterior al bregma (0,60), 1,56 mm posterior al bregma (-1,56) y 3,24 mm posterior al bregma (-3,24), y se compararon las áreas.

Resultados

- 20 En el grupo de administración (N=10) de péptido sintético (1-44), solo un ratón mostró expansión del infarto a la corteza, mientras que en los 9 ratones restantes el infarto se limitó en el núcleo basal (Fig. 16 A1; (1,92 mm anterior al bregma), B1 (0,60 mm anterior al bregma), C1 (1,56 mm posterior al bregma) y D1 (3,24 mm posterior al bregma)). Mientras tanto, en el grupo de control negativo (N=11), 8 ratones mostraron expansión del infarto desde el núcleo basal hasta la corteza (Fig. 16 A2; (1,92 mm anterior al bregma), B2 (0,60 mm anterior al bregma), C2 (1,56 25 mm posterior al bregma) y D2 (3,24 mm posterior al bregma)). Además, en cada una de las cuatro secciones preparadas, se midió el área de infarto cerebral en el cerebro derecho para determinar el % de relación con respecto al área de cerebro normal en el cerebro derecho. En todas las secciones, el área de infarto en el grupo de administración de péptido sintético se redujo significativamente en comparación con el grupo de control negativo (Fig. 17).

Discusión

- 30 Se ha informado recientemente que el pronóstico de pacientes con infarto cerebral mejora por la administración intravenosa de células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Así, se ha venido constatando el efecto terapéutico de las células intramedulares sobre el infarto cerebral. Además, aunque se conoce de los experimentos en roedores que las células madre mesenquimatosas de la médula ósea se diferencian en osteoblastos, condrocitos, adipocitos, y similares, también se ha revelado que se diferencian en diversas células tales como 35 células epiteliales y neuronas. Además, puesto que las células de la médula ósea secretan una variedad de factores de crecimiento y factores de crecimiento celular, se puede esperar que sustancias secretadas por las células de la médula ósea que migraron a sitios de infarto produzcan efectos neuroprotectores.

- 40 En el caso de ratas, se conoce que 48 horas después de la isquemia, el infarto cerebral está casi establecido en 80 % a 90 % de su tamaño, y entonces se expandió gradualmente durante los 7 días posteriores. Además, se conoce que existe un área denominada "núcleo", que, una vez ocurre la isquemia, se necrosita inevitablemente independientemente del tratamiento, y un área denominada "penumbra", de la que se podría evitar la necrosis mediante tratamiento. Así, el prevenir la necrosis de penumbra antes de la expansión del infarto es un objetivo de la terapia de infarto cerebral.

- 45 El cerebro se divide principalmente en núcleo basal y corteza cerebral. En particular, el núcleo basal es más vulnerable a la hipoxia que la cerebral corteza, y se daña más fácilmente por infarto cerebral. El resultado del presente ejemplo también demuestra que la reducción del infarto por el péptido sintético (1-44) se observó principalmente en la corteza, mientras que el núcleo basal necrotizó en la mayoría de los casos. Puesto que la corteza cerebral es el centro de sensación y movimiento, la mejora de estas funciones es muy importante para la 50 rehabilitación en la sociedad después del tratamiento de infarto cerebral. En vista de las circunstancias existentes donde solo están disponibles un pequeño número de agentes terapéuticos eficaces para infarto cerebral, se espera que sea alta la necesidad de los péptidos de la presente invención como agentes farmacéuticos.

- 55 En el experimento del presente ejemplo, cuando el péptido se administró 6 horas después de la producción de infarto cerebral, se observó el efecto de reducir el tamaño del infarto cerebral después de 19 días. Se supone que el efecto terapéutico es debido a la acción neuroprotectora de células de la médula ósea y la regeneración de tejido causado por la diferenciación de las células en tejidos neurales y similares. Se sugirió fuertemente que los péptidos que consisten en una porción de HMGB 1 podrían reclutar células a un sitio dañado no solo cuando se administran en o cerca del sitio dañado, sino también cuando se administran en una vena que es un sitio diferente y distal al sitio dañado. Mientras tanto, los péptidos descritos en los Ejemplos 4, 5 y 6 incluyen algunos péptidos cuya actividad

promotora de la migración parece ser demasiado débil para ser detectada. Se considera que algunos de estos péptidos tienen actividad que está por debajo del límite de detección del método de ensayo. La actividad se podría detectar optimizando el medio para disolver los péptidos, el tiempo de medición para la actividad promotora de la migración y el número de células puestas en la capa superior de la cámara. Con respecto a tPA, que es un fármaco actualmente usado para tratar infarto cerebral, existen estrictos criterios de administración para garantizar la prevención de efectos secundarios tales como hemorragia post-infarto: por ejemplo, se tiene que administrar en el plazo de cuatro horas después de la aparición del infarto cerebral, y se requiere obtención de imágenes de diagnóstico. Puesto que el infarto cerebral ocurre repentinamente, es difícil de predecir la aparición de antemano. Por este motivo, la mayoría de las personas que han desarrollado infarto cerebral frecuentemente ya no son adecuadas para tPA cuando se observan en instituciones médicas debido a la finalización del límite de tiempo. Por otra parte, en el presente ejemplo, el efecto terapéutico se obtuvo administrando el péptido 6 horas después de la producción de infarto cerebral. Puesto que se considera que el presente péptido no tiene actividad anticoagulante, se puede administrar incluso después de 6 horas. Así, se espera que el péptido se use para muchas personas con infarto cerebral. Mientras tanto, en este ejemplo, el péptido se administró a ratas (aproximadamente 250 g/cabeza) a 50 µg/cabeza/administración. Esto corresponde a 200 µg/kg de peso, y se considera apropiado como una dosis de administración transvenosa a pacientes con infarto cerebral.

[Ejemplo 14] Construcción de vectores de expresión para fragmentos de HMGB1, expresión de proteína y péptido, y método de ensayo de migración de células madre mesenquimatosas de la médula ósea

Se delecionó la metionina del extremo N (M) de HMGB1 humana, y en su lugar se añadió MKHHHHHHENLYFQ (SEQ ID NO: 11). HHHHHH (SEQ ID NO: 12) es una marca (marca 6xHis) para uso en la purificación de una proteína o péptido expresado usando una columna de níquel. ENLYFQG (SEQ ID NO: 13) es una secuencia que es reconocida por la proteasa TEV (Fig. 18A). Además, se construyeron vectores en los que se insertaron en la dirección 3' del promotor T7 y el operador lac un ADNc que codifica una proteína o péptido de interés (2-215, 2-84, 2-44, 45-84, 2-62, 2-70, 2-81, 2-170, 93-215, o 85-169), el gen de resistencia a fármaco fue un gen de resistencia a kanamicina, y los orígenes de replicación fueron pBR322 ori y f1 ori. Se puede preparar una proteína HMGB1 humana o péptido que empieza desde el segundo aminoácido escindiendo con la proteasa TEV una proteína o péptido obtenido usando el vector de expresión anteriormente descrito. Se transformó BL-21(DE3) con los plásmidos construidos. Las bacterias se cultivaron en LB que contenía kanamicina mientras que se agitaban a 37 °C durante la noche, y se transfirieron 5 ml de suspensión bacteriana a 100 ml de LB. Las bacterias se cultivaron mientras se agitaban a 140 rpm y 37 °C. Se midió la turbidez con un turbidímetro, y, cuando DO alcanzó 0,5 a 0,7, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Después de cinco horas de cultivo con agitación a 37 °C para 2-215, 2-84, 2-70, 2-81, 2-170, 93-215 y 85-169, o después de cultivo con agitación durante la noche a 15 °C para 2-44, 45-84 y 2-62, se recogieron las bacterias resultantes. Se evaluaron la proteína expresada y los péptidos por SDS-PAGE, seguido por tinción de proteína y transferencia Western con un anticuerpo contra la marca o anticuerpo anti-HMGB1.

Purificación de fragmentos de HMGB1 respectivos (2-215, 2-84, 2-44, 45-84, 2-62, 2-70, 2-81, 2-170 y 93-215)

Se añadieron 3 ml de tampón de equilibrio (PBS (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KCl 2,68 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM), imidazol 10 mM; pH 7,4) a células bacterianas recogidas. Se sonicaron las células bacterianas y se centrifugaron a 15.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante. Se cargó 1 ml de resina His-Pur<sup>TM</sup> Ni-NTA (Thermo Scientific) en la columna Micro Bio-Spin (Bio-Rad) y se equilibró con el tampón de equilibrio. Se cargó una disolución de proteína sobre la columna. Después de dos minutos de centrifugación a 2000 rpm, la resina se lavó con tampón de lavado (PBS, imidazol 25 mM; pH 7,4). La columna se eluyó con tampón de elución (PBS, imidazol 250 mM o 500 mM) de un modo escalonado. Cada fracción se sometió a SDS-PAGE (15 % de e-PAGE<sup>®</sup> (ATTO)) para confirmar la proteína eluida. Después de la purificación por afinidad con una columna de níquel, se realizó cromatografía de intercambio iónico usando Q sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (GE Healthcare) para 2-215; usando Q sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (GE Healthcare) y SP sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (GE Healthcare) para 93-215; o usando SP sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (GE Healthcare) para los péptidos restantes.

Fragmentos de HMGB1 humana (2-215, 2-84, 2-44, 45-84, 2-62, 2-70, 2-81 y 2-170)

Se cargó 1 ml de cada Sepharose en la columna Micro Bio-Spin (Bio-Rad) y se equilibró con PBS. Después de cargar una disolución de proteína purificada por afinidad, la columna se lavó con PBS, y se eluyó con tampón de elución (HEPES 20 mM, NaCl 1 M; pH 7,5).

Cada fracción se examinó por SDS-PAGE.

Fragmento de HMGB1 humana (93-215)

Se sometió a intercambio aniónico y catiónico usando Q y SP Sepharose, respectivamente, una disolución de proteína purificada por afinidad. Entonces, se cargó la fracción de flujo a través de SP sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow sobre Q sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow para realizar el intercambio aniónico.

Cada fracción se examinó por SDS-PAGE.

## Fragmento de HMGB1 humana (85-169)

Se añadió un ml de tampón (PBS, imidazol 10 mM; pH 7,4) a 0,1 g de cada una de las células bacterianas recogidas. Se sonicaron las células bacterianas y se centrifugaron a 20.000 rpm y 4 °C durante una hora. Se recogió el sobrenadante y se purificó por cromatografía en columna usando BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Primero, se llevó a cabo la purificación por afinidad con 5 ml de HisTrap™ FF (GE Healthcare) usando un tampón de lisis bacteriano (PBS, imidazol 10 mM (pH 7,4)) como Tampón A y PBS (pH 7,4) que contenía imidazol 500 mM como Tampón B. Después de que se equilibrara la columna con Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación. El programa usado es del siguiente modo: Flujo isocrático (Tampón A: 97 %, Tampón B: 3 %, 20 ml) → Gradiente lineal (Tampón A: 97 % → 0 %, Tampón B: 3 % → 100 %, 20 ml) → Flujo isocrático (Tampón B: 100 %, 20 ml) → Recogida de fracciones (2 ml cada una; 20 a 40 ml)

10 Cada fracción se examinó por SDS-PAGE.

15 Entonces, se realizó purificación por intercambio iónico usando una columna de 5 ml de HiTrap™ SP HP (GE Healthcare) para 85-169, y PBS (pH 7,4) como Tampón A, y tampón HEPES 20 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 1 M como Tampón B. Después de que se equilibrara la columna con una cantidad apropiada de Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína purificada por afinidad. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación. El programa usado es del siguiente modo:

20 Flujo isocrático (Tampón A: 100 %, Tampón B: 0 %, 10 ml) → Flujo isocrático (Tampón A: 50 %, Tampón B: 50 %, 2 ml) → Flujo isocrático (Tampón A: 0 %, Tampón B: 100 %, 20 ml) → Recogida de fracciones (1 ml cada una; 10 a 32 ml)

25 Cada fracción se examinó por SDS-PAGE.

#### Determinación de la concentración

Se determinó la concentración de cada fragmento en equivalentes de BSA usando el método de Bradford (ensayo de proteína Bio-Rad).

#### Ensayo de migración

25 Se evaluó cada uno de los péptidos anteriormente descritos para la actividad promotora de la migración en la línea de células madre mesenquimatosas MSC-1 de la médula ósea. Se diluyó cada fragmento en tampón fosfato que contenía NaCl 500 mM a una concentración final de 2  $\mu$ M con dos volúmenes de DMEM, y se añadió a la capa inferior de una cámara, mientras que MSC-1 suspensas en DMEM que contenía 10 % de FBS se pusieron en la capa superior. Se insertó membrana de policarbonato con poros de 8  $\mu$ m entre ambas capas. Después de 30 cuatro horas de incubación en una estufa de incubación bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, se detectaron las células que migraron desde la capa superior hasta la capa inferior usando Dif-Quik stain™.

#### Resultados

35 Todos de 2-215, 2-84, 2-44, 45-84, 2-62, 2-70, 2-81, 2-170 y 93-215 mostraron actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea (Fig. 18B). Cuando la actividad promotora de la migración de 2-215 se considera 1, las actividades de 2-84, 2-44, y 45-84 por concentración molar fueron 2,37, 1,82 y 2,04 veces, respectivamente, y aquella por masa igual fueron 5,5, 7,1 y 8,1 veces, respectivamente (Fig. 18C y D).

#### Discusión

40 La fragmentación del extremo N de HMGB1 humana (2-215) producida en *E. coli* produjo un aumento en la actividad promotora de la migración. Además, al menos dos regiones en el lado del extremo N, 2-44 y 45-84, presentaron actividad promotora de la migración. Esto está de acuerdo con el resultado para los fragmentos de HMGB1 producidos por cultivo celular eucariota (células HEK293). Se supone que la fragmentación da como resultado la exposición de epítopes al receptor en MSC-1, y así facilita la unión al receptor. Aunque algunas proteínas pierden su actividad por fragmentación, la presente proteína mostró actividad bastante elevada como resultado de la fragmentación. Se sabe que las proteínas expresadas en células eucariotas tales como HEK293 experimentan modificación post-traduccional tal como glucosilación. La presencia de tal modificación puede afectar la actividad de ligandos de receptor. Así, el hecho de que no solo la proteína producida en *E. coli*, que no realiza la misma modificación post-traduccional que las células eucariotas, sino que los fragmentos producidos en *E. coli* también retengan la actividad, sugiere que la modificación post-traduccional no es esencial para la actividad de los fragmentos. Los hallazgos descritos anteriormente demuestran que la fragmentación de HMGB1 permite el desarrollo de agentes altamente activos para reclutar células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Además, puesto que no es esencial la modificación post-traduccional, son posibles métodos de producción usando *E. coli* o síntesis química, que permiten la producción de preparaciones de calidad más estable a costes más bajos. Además, la comparación entre los péptidos descritos en este ejemplo y los descritos en otros ejemplos (por ejemplo, comparación entre 1-44 y 2-44 o entre 1-84 y 2-84) reveló que la actividad promotora de la migración no se vio afectada por la presencia de la primera metionina en la proteína HMGB1. Por tanto, cuando un péptido tiene

actividad promotora de la migración, también se considera que un péptido en el que se elimina la primera metionina del péptido tiene actividad promotora de la migración. Alternativamente, cuando un péptido que carece de la primera metionina tiene actividad promotora de la migración, también se considera que un péptido al que se añade la primera metionina tiene actividad promotora de la migración.

5 [Ejemplo 15]

#### Métodos

Se delecionó la metionina del extremo N (M) de HMGB1 humana, y en su lugar se añadió MKHHHHHHENLYFQ (SEQ ID NO: 11), al extremo N HHHHHH (SEQ ID NO: 12) es una marca (marca 6xHis) para uso en la purificación de una proteína o péptido expresado usando una columna de níquel. ENLYFQG (SEQ ID NO: 13) es una secuencia que es reconocida por la proteasa TEV (Fig. 18A). Además, se construyeron vectores en los que se insertaron en la dirección 3' del promotor T7 y el operador lac un ADNc que codifica una proteína o péptido de interés (89-215, 89-205, 89-195 o 89-185), y el gen de resistencia a fármaco fue un gen de resistencia a kanamicina, y los orígenes de replicación fueron pBR322 ori y f1 ori. Se puede preparar una proteína HMGB1 humana o péptido que empieza desde el segundo aminoácido escindiendo con la proteasa TEV una proteína o péptido obtenido usando el vector de expresión anteriormente descrito.

Se transformó BL-21(DE3) con los plásmidos construidos. Las bacterias se cultivaron en LB que contenía kanamicina mientras que se agitaban a 37 °C durante la noche, y se transfirieron 5 ml de suspensión bacteriana a 100 ml de LB. Las bacterias se cultivaron mientras se agitaban a 140 rpm y 37 °C. Se midió la turbidez con un turbidímetro, y, cuando DO alcanzó 0,5 a 0,7, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Después del cultivo con agitación durante la noche a 15 °C, se recogieron las células bacterianas para los fragmentos de HMGB1 humana (89-215, 89-205, 89-195 y 89-185). Se evaluaron la proteína expresada y los péptidos por SDS-PAGE, seguido por tinción de proteína y transferencia Western con un anticuerpo contra la marca o anticuerpo anti-HMGB1.

#### Purificación de fragmentos de HMGB1 respectivos (89-215, 89-205, 89-195 y 89-185)

25 Se añadieron dos ml de tampón (PBS, imidazol 10 mM; pH 7,4) a 0,1 g de cada una de las células bacterianas recogidas. Se sonicaron las células bacterianas y se centrifugaron a 20.000 rpm y 4 °C durante una hora. Se recogió el sobrenadante y se purificó por cromatografía en columna usando BioLogic DuoFlow (Bio-Rad).

#### Fragmento de HMGB1 humana (89-215)

30 Se añadió un ml de tampón (PBS, imidazol 10 mM; pH 7,4) a 0,1 g de cada una de las células bacterianas recogidas. Se sonicaron las células bacterianas y se centrifugaron a 20.000 rpm y 4 °C durante una hora. Se recogió el sobrenadante y se purificó por cromatografía en columna usando BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Primero, se llevó a cabo la purificación por afinidad con 5 ml de HisTrap™ FF (GE Healthcare) usando un tampón de lisis bacteriano (PBS, imidazol 10 mM (pH 7,4)) como Tampón A y PBS (pH 7,4) que contenía imidazol 500 mM como Tampón B. Después de que se equilibrara la columna con Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación. El programa usado es del siguiente modo:

Flujo isocrático (Tampón A: 97 %, Tampón B: 3 %, 20 ml) → Gradiente lineal (Tampón A: 97 % → 0 %, Tampón B: 3 % → 100 %, 20 ml) → Flujo isocrático (Tampón B: 100 %, 20 ml) → Recogida de fracciones (2 ml cada una; 20 a 40 ml)

Cada fracción se examinó por SDS-PAGE.

40 Entonces, se realizó purificación por intercambio iónico usando 5 ml de HiTrap™ Q HP (GE Healthcare) para 89-215, y PBS (pH 7,4) como Tampón A, y tampón HEPES 20 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 1 M como Tampón B. Después de que se equilibrara la columna con una cantidad apropiada de Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína purificada por afinidad. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación. El programa usado es del siguiente modo:

45 Flujo isocrático (Tampón A: 100 %, Tampón B: 0 %, 10 ml) → Flujo isocrático (Tampón A: 50 %, Tampón B: 50 %, 2 ml) → Flujo isocrático (Tampón A: 0 %, Tampón B: 100 %, 20 ml) → Recogida de fracciones (1 ml cada una; 10 a 32 ml)

Cada fracción se examinó por SDS-PAGE.

#### Fragmentos de HMGB1 humana (89-205, 89-195 y 89-185)

50 Se prepararon disoluciones de proteínas solubles del mismo modo que el fragmento de HMGB1 humana (89-215). Entonces, se realizó la siguiente elución en gradiente por cada cromatografía en columna.

Primero, se llevó a cabo purificación por afinidad usando 5 ml de HisTrap™ FF, Tampón A (PBS (pH 7,4) que contenía imidazol 10 mM), y Tampón B (PBS (pH 7,4) que contenía imidazol 500 mM). Después de que se

equilibrara la columna con Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación. El programa usado es del siguiente modo:

→ Flujo isocrático (Tampón A: 97 %, Tampón B: 3 %, 50 ml) → Gradiente lineal (Tampón A: 97 % → 0 %, Tampón B: 3 % → 100 %, 120 ml) → Recogida de fracciones (5 ml cada una; 50 a 170 ml)

5 Cada fracción se examinó por SDS-PAGE.

Entonces, se realizó purificación por intercambio iónico usando una columna de 5 ml de HiTrap™ Q HP para fragmentos de HMGB1 humana (89-215) y (89-205), y columna de 5 ml de HiTrap™ SP HP para los otros fragmentos. Se usó PBS (pH 7,4) como Tampón A, mientras que se usó 7x PBS (pH 7,4) como Tampón B. Después de que la columna se equilibrara con una cantidad apropiada de Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína purificada por afinidad. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación. El programa usado es del siguiente modo:

Flujo isocrático (Tampón A: 100 %, Tampón B: 0 %, 50 ml) → Gradiente lineal (Tampón A: 100 % → 0 %, Tampón B: 0 % → 100 %, 50 ml) → Flujo isocrático (Tampón A: 0 %, Tampón B: 100 %, 5 ml) → Recogida de fracciones (3 ml cada una; 50 a 105 ml)

15 Cada fracción se examinó por SDS-PAGE.

#### Determinación de la concentración

Se determinó la concentración de cada fragmento en equivalentes de BSA usando el método de Bradford (ensayo de proteína Bio-Rad).

#### Ensayo de migración

20 Se examinó cada uno de los péptidos anteriormente descritos para la actividad promotora de la migración en la línea de células madre mesenquimatosas MSC-1 de la médula ósea. Se diluyó cada fragmento en tampón fosfato que contenía NaCl 500 mM a una concentración final de 2  $\mu$ M con dos volúmenes de DMEM, y se añadió a la capa inferior de una cámara, mientras que MSC-1 suspensas en DMEM que contenía 10 % de FBS se pusieron en la capa superior. Se insertó membrana de policarbonato con poros de 8  $\mu$ m entre ambas capas. Después de cuatro horas de incubación en una estufa de incubación bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, se detectaron las células que migraron desde la capa superior hasta la capa inferior usando Dif-Quik stain™.

#### Resultados

Después de la purificación por afinidad del fragmento de HMGB1 humana (89-215) con una columna de níquel, se realizó elución en gradiente con concentración de sales creciente usando cromatografía de intercambio iónico (columna Q). Se fraccionó un péptido de 15,5 kDa en las fracciones 6 y 7; los péptidos de 15,5, 16 y 17 kDa se fraccionaron en las fracciones 8 y 9; y los péptidos de 16 y 17 kDa se fraccionaron en las fracciones 10 y 11 (Fig. 19A).

35 Se probó una mezcla mixta (6+7) de fracciones 6 y 7, y fracciones 9 y 10, para la actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea. La actividad de la muestra mixta de fracciones 6 y 7 (6+7) fue fuerte, mientras que la de las fracciones 9 y 10 fue débil (Fig. 19B)

40 Despues de la purificación por afinidad del fragmento de HMGB1 humana (89-205) con una columna de níquel, se realizó elución en gradiente con concentración de sales creciente usando cromatografía de intercambio iónico (columna Q). Se eluyó primero el fragmento más corto (\*4) en la fracción 6, y el siguiente fragmento más corto (\*5) y entonces el fragmento más largo (\*6) se eluyeron en la fracción 7. Mientras tanto, se purificaron 89-195 y 89-185 como un único fragmento por purificación por afinidad usando una columna de níquel (Fig. 19C).

Se examinaron las fracciones 6, 7 y 8 para la actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea (MSC-1). La fracción 6 mostró fuerte actividad, y se redujo la actividad a medida que aumentó el número de fracción. Mientras tanto, 89-195 y 89-185 mostraron actividad más fuerte que cualquiera de los fragmentos entre las posiciones 89 y 215 (Fig. 19D)

45 Discusión

50 Se prepararon usando *E. coli* fragmentos de HMGB1 humana (89-215, 89-205, 89-195 y 89-185). 89-215 y 89-205 presentaron actividad promotora de la migración débil en células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Sin embargo, experimentaron escisión que pareció que se causó por la proteasa derivada de *E. coli* (Fig. 19A y C), y fragmentos cortos presentaron fuerte actividad (Fig. 19B y D). Mientras tanto, 89-195 y 89-185 mostraron fuerte actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea (Fig. 19C y D). Los aminoácidos del extremo C de las posiciones 186 a 215 de HMGB1 contienen una secuencia repetida de glutamina y ácido aspártico. Se dice que la secuencia contribuye a la estabilización de las proteínas. El presente estudio demostró por primera vez que esta porción suprimió la actividad promotora de la migración del fragmento de HMGB1

(89-215) y así se podría aumentar la actividad eliminando esta secuencia. La secuencia repetida de ácido glutámico/ácido aspártico del extremo C (la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 186 hasta 215) en HMGB1 se denomina "cola ácida", y se ha informado que es esencial para la unión a RAGE. Mientras tanto, basándose en el hecho de que RAGE sirve de receptor responsable de la migración de células dendríticas mediada por HMGB1, y similares, se predijo una vez que la porción del extremo C y la porción de RAGE del ligando serían indispensables para ejercer la actividad promotora de la migración. Sorprendentemente, en realidad, se encontró que la ausencia del extremo C era más ventajosa para la actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Esto no se conocía hasta que se descubrió que, cuando el fragmento de HMGB1 que contenía el extremo C se produjo en *E. coli*, productos de degradación que parecía que se produjeron por proteasa derivada de *E. coli* presentaron actividad promotora de la migración más fuerte que el fragmento de HMGB1 intacto y que cuando se produjo un fragmento de HMGB1 que carecía del extremo C, presentó actividad más fuerte que el fragmento de HMGB1 intacto del extremo C. En general, una actividad de proteína particular es contribuida por solo una única región; sin embargo, sorprendentemente, HMGB1 tuvo múltiples regiones que contribuyeron a su actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea, y más sorprendentemente, la actividad de cada región por número igual de moléculas fue aproximadamente dos veces la de HMGB1 de longitud completa. Además, aunque péptidos biológicamente activos llegan a ser en general más inestables y menos activos a medida que su longitud se vuelve más corta, sorprendentemente, algunos fragmentos más cortos tuvieron actividad más fuerte que otros fragmentos más largos.

[Ejemplo 16]

## 20 Métodos

Se seleccionó la metionina del extremo N (M) de HMGB1 humana, y en su lugar se añadió MKHHHHHHHENLYFQ (SEQ ID NO: 11) al extremo N. HHHHHH (SEQ ID NO: 12) es una marca (marca 6xHis) para uso en la purificación de una proteína o péptido expresado usando una columna de níquel. ENLYFQG (SEQ ID NO: 13) es una secuencia que es reconocida por la proteasa TEV (Fig. 18A). Además, se construyeron vectores en los que se insertaron en la dirección 3' del promotor T7 y el operador lac un ADNc que codifica una proteína o péptido de interés (85-169, 2-215), el gen de resistencia a fármaco fue un gen de resistencia a kanamicina, y los orígenes de replicación fueron pBR322 ori y f1 ori. Se puede preparar una proteína HMGB1 humana o péptido que empieza desde el segundo aminoácido escindiendo con la proteasa TEV una proteína o péptido obtenido usando el vector de expresión anteriormente descrito.

30 Se transformó BL-21(DE3) con los plásmidos construidos. Las bacterias se cultivaron en LB que contenía kanamicina mientras que se agitaban a 37 °C durante la noche, y se transfirieron 5 ml de suspensión bacteriana a 100 ml de LB. Las bacterias se cultivaron mientras se agitaban a 140 rpm y 37 °C. Se midió la turbidez con un turbidímetro, y, cuando DO alcanzó 0,5 a 0,7, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Después del cultivo con agitación durante la noche a 15 °C, se recogieron las células bacterianas para el fragmento de HMGB1 humana (85-169). Se examinaron la proteína expresada y los péptidos por SDS-PAGE, seguido por tinción de proteína y transferencia Western con un anticuerpo contra la marca o anticuerpo anti-HMGB1.

40 Se añadió un ml de tampón (PBS, imidazol 10 mM; pH 7,4) a 0,1 g de cada una de las células bacterianas recogidas. Se sonicaron las células bacterianas y se centrifugaron a 20.000 rpm y 4 °C durante una hora. Se recogió el sobrenadante y se purificó por cromatografía en columna usando BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Primero, se llevó a cabo la purificación por afinidad con 5 ml de HisTrap™ FF (GE Healthcare) usando un tampón de lisis bacteriano (PBS, imidazol 10 mM (pH 7,4)) como Tampón A y PBS (pH 7,4) que contenía imidazol 500 mM como Tampón B. Después de que se equilibrara la columna con Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación. El programa usado es del siguiente modo:

45 Flujo isocrático (Tampón A: 97 %, Tampón B: 3 %, 20 ml) → Gradiente lineal (Tampón A: 97 % → 0 %, Tampón B: 3 % → 100 %, 20 ml) → Flujo isocrático (Tampón B: 100 %, 20 ml) → Recogida de fracciones (2 ml cada una; 20 a 40 ml)

Cada fracción se examinó por SDS-PAGE.

### Determinación de la concentración

50 Se determinó la concentración de cada proteína recombinante en equivalentes de BSA usando el método de Bradford (ensayo de proteína Bio-Rad).

### Ensayo de migración

55 Se examinó cada uno de los péptidos anteriormente descritos para la actividad promotora de la migración en la línea de células madre mesenquimatosas MSC-1 de la médula ósea. Se diluyó cada fragmento en tampón fosfato que contenía NaCl 500 mM a una concentración final de 2 μM con dos volúmenes de DMEM, y se añadió a la capa inferior de una cámara, mientras que MSC-1 dispersas en DMEM que contenía 10 % de FBS se pusieron en la capa superior. Se insertó membrana de policarbonato con poros de 8 μm entre las capas superiores e inferiores. Después

de cuatro horas de incubación en una estufa de incubación bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, se detectaron las células que migraron desde la capa superior hasta la inferior usando Dif-Quik stain™.

## Resultados

El fragmento de HMGB1 humana (85-169) presentó actividad promotora de la migración más fuerte en células madre mesenquimatosas de la médula ósea que el fragmento de HMGB1 humana (2-215) (Fig. 20A). Cuando la actividad promotora de la migración se considera 1, la actividad por mol fue 1,59 veces, y la actividad por masa igual fue 3,6 veces (Fig. 20B y C).

## Discusión

Al igual que los fragmentos de HMGB1 humana (89-195) y (89-185), el fragmento de HMGB1 humana (85-169) mostró actividad promotora de la migración más fuerte en células madre mesenquimatosas de la médula ósea que (2-215). A partir del hallazgo anteriormente descrito, se supone que al menos una secuencia con la actividad de reclutar células madre mesenquimatosas de la médula ósea está presente dentro de los aminoácidos de las posiciones 85-185. En el Ejemplo 1, el fragmento de HMGB1 85-169 producido en HEK293 no mostró actividad promotora de la migración. En el presente ejemplo, sin embargo, el fragmento de HMGB1 85-169 producido en *E. coli* presentó actividad promotora de la migración. Esta diferencia es supuestamente debida a una reducción significativa o pérdida de la actividad promotora de la migración dependiendo del método de producción. Puesto que eucariotas tales como HEK293 y procariotas tales como *E. coli* son diferentes en la modificación post-traduccional, plegamiento, y similares, incluso las mismas proteínas o péptidos producidos por ellos tienen frecuentemente propiedades diferentes.

El presente estudio reveló que la secuencia de aminoácidos de HMGB1 tiene al menos tres secuencias con la actividad de reclutar células madre mesenquimatosas de la médula ósea, y su actividad se reguló mediante la supresión por la secuencia repetida de ácido glutámico/ácido aspártico del extremo C. Preparando fragmentos de HMGB1 que carecen de la secuencia supresora del extremo C, es posible producir preparaciones altamente activas que tienen el efecto de reclutar las células madre de médula ósea.

[Ejemplo 17] Actividad de migración de células madre mesenquimatosas de ratón (1)

## Métodos

### Purificación de fragmentos de HMGB1

Se llevó a cabo PCR inversa usando KOD-Plus-ver. 2 (Toyobo). Se usó el vector de expresión anteriormente descrito para el fragmento de HMGB1 que contenía los aminoácidos de las posiciones 2 a 215 de HMGB1 humana como plásmido molde. Se amplificaron por PCR los ADNc que codificaban los aminoácidos de las posiciones 2 a 205, los aminoácidos de las posiciones 2 a 195, los aminoácidos de las posiciones 2 a 185, junto con la marca de histidina del extremo N, la secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV y el esqueleto de plásmido. Los productos génicos preparados a partir de los productos de PCR son proteínas en las que una marca de histidina, una secuencia de reconocimiento de proteasa TEV y un fragmento de HMGB1 humana están alineados en tándem. Se digirió el plásmido molde añadiendo enzima de restricción DpnI (Toyobo) a los productos de PCR. Entonces, los productos de PCR se fosforilaron usando cinasa de polinucleótido T4 (NEB), y se auto-ligaron con ligasa (2x Quick Ligase (NEB); o Ligation Convenience kit (Nippongene)). Los productos se usaron para transformar JM109 de *E. coli*, y se obtuvieron colonias mediante selección con kanamicina. La extracción del plásmido se llevó a cabo usando GenElute Plasmid Miniprep kit (SIGMA-ALDRICH). Despues de determinar las secuencias de nucleótidos por análisis de secuenciación, se transformó BL21 de *E. coli* (DE3) con los plásmidos dando colonias.

### Inducción de la expresión

Se cultivó cada colonia en un medio que contenía kanamicina a una concentración final de 50 mg/l mientras que se agitaba a 37 °C durante la noche. Se transfirieron 5 ml de la suspensión bacteriana a 100 ml de LB. Las bacterias se cultivaron a 37 °C mientras que se agitaban a 140 rpm. Se midió la turbidez con un turbidímetro, y, cuando DO alcanzó 0,5 a 0,7, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Despues del cultivo con agitación durante la noche a 15 °C, se recogieron las células bacterianas.

### Purificación de proteínas recombinantes

Se añadieron 12 ml (25-50 mg/ml) de tampón de equilibrio (PBS (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KCl 2,68 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM), imidazol 10 mM; pH 7,4) a las células bacterianas recogidas, y se añadió clorhidrato de leupeptina a una concentración final de 5 µg/ml a éstas. Las células bacterianas se sonicaron y se centrifugaron a 15.000 rpm y 4 °C durante 60 minutos. Se recogió el sobrenadante y se examinó una alícuota del mismo por transferencia Western usando un anticuerpo anti-HMGB1 humana para confirmar la expresión de la proteína de interés. Se esterilizó el sobrenadante restante filtrando a través de un filtro de 0,45 µm. La proteína de interés se purificó por cromatografía en columna usando BioLogic DuoFlow (Bio-Rad).

Primero, se realizó purificación por afinidad con 5 ml de HisTrap™ FF usando Tampón A (PBS, imidazol 10 mM (pH7,4) y Tampón B (PBS, imidazol 500 mM (pH 7,4)). Después de que la columna se equilibrara con Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación.

5 Programa:

Flujo isocrático (Tampón A: 97 %, Tampón B: 3 %, 50 ml)

Gradiente lineal (Tampón A: 97 % → 0 %, Tampón B: 3 % → 100 %, 120 ml)

Recogida de fracciones (5 ml cada una; 50 a 170 ml)

Cada fracción se examinó por SDS-PAGE (5-20 % de e-PAGE® (ATTO)).

10 Entonces, se realizó purificación por intercambio iónico usando una columna de 5 ml de HiTrap™ Q HP para GNX-E-022 solo, y 5 ml de HiTrap™ SP HP para las otras. Se usó PBS (pH 7,4) como Tampón A, mientras que se usó 7x PBS (pH 7,4) como Tampón B. Después de que la columna se equilibrara con una cantidad apropiada de Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína purificada por afinidad. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación.

15 Programa:

Flujo isocrático (Tampón A: 100 %, Tampón B: 0 %, 50 ml, 4 ml/min)

Gradiente lineal (Tampón A: 100 % → 0 %, Tampón B: 0 % → 100 %, 50 ml, 4 ml/min)

Flujo isocrático (Tampón A: 0 %, Tampón B: 100 %, 5 ml, 4 ml/min)

Recogida de fracciones (3 ml cada una; 50 a 105 ml)

20 Cada fracción se sometió a SDS-PAGE, seguido por tinción de proteína para confirmar las proteínas purificadas.

Determinación de la concentración

Se determinó la concentración de proteínas recombinantes en equivalentes de BSA usando el método de Bradford (ensayo de proteína Bio-Rad).

Ensayo de migración

25 Se examinó cada uno de los péptidos anteriormente descritos para la actividad promotora de la migración en la línea de células madre mesenquimatosas MSC-1 de la médula ósea. Se diluyó cada fragmento en tampón fosfato que contenía NaCl 500 mM a una concentración final de 2 µM con dos volúmenes de DMEM, y se añadió a la capa inferior de una cámara, mientras que MSC-1 dispersas en DMEM que contenía 10 % de FBS se pusieron en la capa superior. Se insertó membrana de policarbonato con poros de 8 µm entre las capas superior e inferior. Después de 30 cuatro horas de incubación en una estufa de incubación bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, se detectaron las células que migraron desde la capa superior hasta la inferior usando Dif-Quik stain™.

Resultados

Los fragmentos 2-195 y 2-185 mostraron actividad promotora de la migración más fuerte que los fragmentos 2-215 y 2-205 (Fig. 21A).

35 Discusión

El fragmento desde las posiciones 186 hasta 215 es una secuencia repetida de ácido aspártico/ácido glutámico de 30 aminoácidos en total, y se denomina "cola ácida". Los datos descritos anteriormente sugieren que la actividad promotora de la migración de HMGB1 en células madre mesenquimatosas de la médula ósea se suprime fuertemente por la cola ácida, y en particular la secuencia de 20 aminoácidos del extremo C participa en la supresión. Basándose en los datos descritos anteriormente, se identificaron varios dominios activos para el efecto promotor de la migración de HMGB1 en células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Se necesitaron experimentos detallados adicionales para aclarar si la cola ácida suprime o no la actividad de todos estos dominios.

Actividad de migración de células madre mesenquimatosas humanas (2)

Métodos

45 Se produjeron en *E. coli* fragmentos de HMGB1 humana (2-215, 2-84, 2-44, 45-84, 85-169, 89-185, 89-195 y 89-205) y se purificaron usando columnas apropiadas del mismo modo que se describe en los Ejemplos 14, 15 y 16 anteriormente. Sin embargo, se purificó 89-215 por el mismo método que se usa para 89-205 en el Ejemplo 15.

Determinación de la concentración

Se determinó la concentración de cada fragmento en equivalentes de BSA usando el método de Bradford (ensayo de proteína Bio-Rad).

Ensayo de migración

- 5 Usando las células madre mesenquimatosas de la médula ósea derivadas de humano, se examinó cada fragmento por el mismo ensayo de migración realizado en células madre mesenquimatosas (MSC-1) de la médula ósea derivadas de ratón como se ha descrito anteriormente. Los fragmentos se usaron a una concentración final de 2  $\mu$ M. Las células madre mesenquimatosas de la médula ósea derivadas de humano usadas fueron hMSC (célula madre mesenquimato humana, Takara) en el cuarto pase. El medio de crecimiento usado fue un medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (medio MF, TOYOB0). Las células se cultivaron en una estufa de incubación bajo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. El medio se cambió con un medio fresco cada dos a cuatro días. Las células se sometieron a pases cuando alcanzaron 80 % de confluencia.

## Resultados

- 15 Con respecto a los fragmentos de HMGB1 humana (2-215, 2-84, 2-44 y 45-84), la actividad de fragmentos de HMGB1 (2-84, 2-44 y 45-84) fue superior a la del fragmento de HMGB1 humana (2-215) como con el caso del Ejemplo 14. En cuanto a los fragmentos de HMGB1 humana (89-185, 89-195, 89-205 y 89-215), fragmentos activos de HMGB1 humana (89-185 y 89-195) con una cola ácida del extremo C acortada presentaron actividad más fuerte como con el caso del Ejemplo 15. Mientras tanto, la actividad del fragmento de HMGB1 humana (85-169) fue superior a la del fragmento de HMGB1 humana (2-215) como con el caso del Ejemplo 16 (Fig. 21B).

## 20 Discusión

Todos los fragmentos mostraron actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea derivadas de humano como con el caso de células madre mesenquimatosas de la médula ósea derivadas de ratón. Se demostró que dominios independientes que tenían actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas se localizaron al menos en fragmentos de HMGB1 humana (2-44, 45-84 y 85-169). Puesto que proteínas típicas tienen solo un sitio para actividad particular, es sorprendente la existencia de múltiples sitios activos. Además, también es sorprendente que la actividad de cada fragmento sea mayor que la de la secuencia (2-215), que consiste en casi la longitud completa. Mientras tanto, aunque el dominio de unión a RAGE es la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 150 hasta 183, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 89 a 169 también tiene actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas, sugiriendo que la actividad promotora de la migración puede no requerir RAGE. Con respecto a los fragmentos de HMGB1 humana (89-185, 89-195, 89-205 y 89-215), los fragmentos que carecen de la cola ácida del extremo C mostraron actividad más fuerte, como con el caso de células derivadas de ratón. Este hallazgo sugiere entonces que el extremo C también suprime la actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea humanas, y, por tanto, se pueden producir fragmentos más activos de HMGB1 por acortamiento o eliminación de la cola ácida del extremo C.

Actividad promotora de la migración alterada de fragmentos de fusión en los que el fragmento de cola ácida de HMGB1 humana 186-215, 186-205 o 186-195 se añade al fragmento de HMGB1 humana 2-84

## Métodos

- 40 Se construyeron ADNc de fusión de forma que el fragmento de HMGB1 humana 186-215, 186-205 o 186-195 se añadió al extremo C del fragmento de HMGB1 humana 2-84. Como se ha descrito anteriormente, se diseñaron vectores de expresión de forma que, en un fragmento expresado en *E. coli*, se delecionó la metionina del extremo N (M) de HMGB1 humana y en su lugar se añadió MKHHHHHHENLYFQ (SEQ ID NO: 11) a su extremo N. HHHHHH (SEQ ID NO: 12) es una marca (marca 6xHis) para uso en la purificación de una proteína expresada o péptido usando una columna de níquel. ENLYFQG (SEQ ID NO: 13) es una secuencia que es reconocida por la proteasa TEV (Fig. 18). Además, se construyeron vectores en los que el ADNc descrito anteriormente se insertó en la dirección 3' del promotor T7 y el operador lac, el gen de resistencia a fármaco era un gen de resistencia a kanamicina, y los orígenes de replicación fueron pBR322 ori y f1 ori. Se puede preparar una proteína HMGB1 humana o péptido que empieza desde el segundo aminoácido escindiendo con la proteasa TEV una proteína o péptido obtenido usando el vector de expresión anteriormente descrito.
- 50 Se transformó BL-21(DE3) con los plásmidos construidos. Las bacterias se cultivaron en LB que contenía kanamicina mientras que se agitaban a 37 °C durante la noche, y se transfirieron 5 ml de suspensión bacteriana a 100 ml de LB. Las bacterias se cultivaron mientras se agitaban a 140 rpm y 37 °C. Se midió la turbidez con un turbidímetro, y, cuando DO alcanzó 0,5 a 0,7, se añadió isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Después del cultivo con agitación durante la noche a 15 °C, se recogieron las células bacterianas.

## Purificación de fragmentos de HMGB1 respectivos (2-84+186-215, 2-84+186-205 y 2-84+186-195)

Se añadió tampón de equilibrio (PBS (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KCl 2,68 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM), imidazol 10 mM; pH 7,4) a las células bacterianas recogidas de manera que la concentración final fuera 5 µg/ml. Se sonicaron las células bacterianas, y se centrifugaron a 15.000 rpm y 4 °C durante 60 minutos. Se recogió el sobrenadante, y se esterilizó el sobrenadante restante filtrando a través de un filtro de 0,45 µm. La proteína de interés se purificó por cromatografía en columna usando BioLogic DuoFlow (Bio-Rad).

Entonces, se realizó purificación de intercambio iónico usando 5 ml de HiTrap™ Q HP (GE Healthcare) durante 2-84+186-215, 2-84+186-205 y 2-84+186-195. Se usó PBS (pH 7,4) como Tampón A, mientras que se usó 7x PBS (pH 7,4) como Tampón B. Despues de que la columna se equilibrara con una cantidad apropiada de Tampón A, se cargó en ella una disolución de proteína purificada por afinidad. Se realizaron el lavado y la purificación con el programa descrito a continuación. El programa usado es del siguiente modo:

Flujo isocrático (Tampón A: 100 %, Tampón B: 0 %, 50 ml, 4 ml/min)

Gradiente lineal (Tampón A: 100 % → 0 %, Tampón B: 0 % → 100 %, 50 ml, 4 ml/min)

Flujo isocrático (Tampón A: 0 %, Tampón B: 100 %, 5 ml, 4 ml/min)

15 Recogida de fracciones (3 ml cada una; 50 a 105 ml)

Cada fracción se examinó por SDS-PAGE, seguido por tinción de proteína del gel para confirmar las proteínas purificadas.

Cada fragmento se sometió a transferencia Western usando un anticuerpo que reconoce HMGB1 humana para confirmar si es o no el fragmento de interés.

20 Ensayo de migración de fragmento de HMGB1 (2-84), y fragmentos de fusión de HMGB1 (2-84+186-215, 2-84+186-205, y 2-84+186-195) usando MSC-1

Se usaron fragmentos preparados por los métodos descritos anteriormente para realizar el ensayo de migración usando la línea de células madre mesenquimatosas MSC-1 de la médula ósea. El ensayo de migración se realizó del mismo modo que se ha descrito anteriormente.

25 Resultados

El fragmento 2-84 presentó actividad promotora de la migración, mientras que ninguno de los fragmentos de fusión de HMGB1 humana con 10 aminoácidos, 20 aminoácidos o 30 aminoácidos de la secuencia de la cola ácida mostró la actividad (Fig. 21C).

Discusión

30 Como se muestra en los ejemplos anteriormente mencionados, el fragmento de HMGB1 humana 89-215 tiene solo actividad promotora de la migración extremadamente débil en células madre mesenquimatosas; sin embargo, la truncación sucesiva de la cola ácida del extremo C aumenta la actividad promotora de la migración. Los resultados descritos anteriormente y el presente ejemplo demuestran que la cola ácida tiene la función de reducir la actividad promotora de la migración de fragmentos 2-84 y 89-185. El fragmento 2-84 tiene múltiples regiones de núcleo con actividad promotora de la migración. Puesto que la fusión del fragmento 2-84 con el fragmento 186-215 produjo pérdida casi completa de la actividad promotora de la migración, se supone que la supresión actúa en todas las regiones de núcleo en 2-84. Es un descubrimiento sorprendente que una única molécula de HMGB1 contuviera al menos tres o más secuencias de núcleo con actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Otro descubrimiento muy sorprendente es que la cola ácida del extremo C de

35 solo 30 aminoácidos suprime casi completamente la actividad promotora de la migración de al menos dos secuencias de núcleo en el fragmento 2-84 del extremo N de HMGB1 y también suprime la actividad promotora de la migración de la secuencia de núcleo en el fragmento 85-185, dando como resultado una disminución en la actividad promotora de la migración global de HMGB1. Se cree que el fragmento de HMGB1 1-85 tiene un efecto antiinflamatorio contra la inflamación inducida por LPS (lipopolisacárido) y similares. Wei Gong *et al.* han informado que un fragmento de 1-85 fusionado con el fragmento 186-215 reduce la tasa de muerte causada por la administración de LPS más que el fragmento 1-85 (Journal of Biomedicine and Biotechnology Volumen 2010, Artículo ID 915234, doi: 10.1155/2010/915234). El artículo de Wei Gong *et al.* sugiere que se requiere la cola ácida para aumentar el efecto antiinflamatorio de 1-85. Por otra parte, la presente invención demostró que la cola ácida inhibió más bien la migración de células madre mesenquimatosas de la médula ósea. En vista de la presente invención, se espera que el acortamiento o la eliminación completa de la cola ácida puedan lograr más mejora de los efectos terapéuticos en enfermedades en las que la administración de células madre mesenquimatosas de la médula ósea tiene efectos terapéuticos.

## [Ejemplo 18]

## Métodos

Los animales experimentales usados fueron ratas SD (macho, ocho semanas de edad). Después de anestesia suficientemente profunda por inhalación de isoflurano, se hizo en el lomo una incisión en la piel rectangular de 3 cm

5 de anchura x 7 cm de longitud. Se dejó sin cortar el lado cefálico, y la piel se desprendió minuciosamente de los tejidos subcutáneos. Se suturaron los tres lados cortados a la piel de alrededor usando sutura de seda Nº 4, y se protegió con Tegaderm (3M) para prevenir la infección bacteriana.

Se diluyeron a 200 µl con tampón fosfato HMGB1 de ratón de longitud completa (100 µg/administración/día) producida en HEK293 y péptido HMGB1 químicamente sintetizado (aminoácidos 1 a 44; 50 µg/administración/día) y

10 se administraron a ratas mediante la vena caudal. La primera administración se realizó 6 horas después de la cirugía, y entonces los agentes se administraron cada 24 horas un total de cinco veces. Se administró como control negativo solución salina fisiológica tamponada con fosfato. Se retiró Tegaderm después de una semana, y se observó semanalmente la región de la herida para medir las áreas de necrosis y ulceración.

## Resultados

15 Una semana después de la cirugía, la necrosis de la piel se desarrolló en cuatro de las cinco ratas del grupo de control negativo. En el grupo administrado con HMGB1 de longitud completa, la necrosis de la piel se desarrolló en tres de las cinco ratas. En el grupo de péptido HMGB1 (aminoácidos 1-44), la necrosis de la piel se desarrolló en una de las cinco ratas. Siete semanas después de la cirugía, aunque la contractura grave de la piel ocurrió en cuatro de las cinco ratas del grupo de control negativo, tres de las cinco ratas del grupo administrado con HMGB1 de longitud completa y dos de las cinco ratas del grupo de péptido HMGB1 (aminoácidos 1-44) mostraron tal contractura (Fig. 24).

## Discusión

25 Se observó el efecto de encogimiento sobre tejidos necrotizantes después de una semana en el grupo administrado con HMGB1 de longitud completa producida en HEK293 y en el grupo de administración de péptido HMGB1 (aminoácidos 1-44). El efecto de encogimiento fue más fuerte en el grupo de péptido HMGB1 (aminoácidos 1-44). Despues de una, dos y tres semanas, se redujo el área de la herida a la mitad del área del grupo de control negativo. Despues de la tercera semana, el área de la herida en el grupo de administración de péptido HMGB1 (aminoácidos 1-44) se redujo adicionalmente en comparación con los otros dos grupos. Durante el proceso de curación de 7 semanas, también hubo una tendencia a que el área de la herida fuera más pequeña en el grupo de péptido HMGB1 (aminoácidos 1-44). La contractura en el sitio de herida después de siete semanas también fue la más leve en el grupo de péptido HMGB1 (aminoácidos 1-44). Se conoce que las células madre mesenquimatosas de la médula ósea potencian el crecimiento de células de la piel en condiciones de bajo oxígeno. Se supone que las células madre mesenquimatosas de la médula ósea reclutadas por HMGB1 potenciaron la cicatrización, suprimiendo la expansión de necrosis de la piel debido a la desnutrición e hipoxia causada por la producción de colgajos cutáneos. Se sugiere que tales efectos son ventajosos no solo en suprimir la expansión del daño causado por la isquemia de la piel, lesión y cirugía, sino también en el aspecto cosmético después de la curación.

## [Ejemplo 19]

## Métodos

40 Los animales experimentales usados fueron 15 ratas SD (macho, ocho semanas de edad) por grupo. Después de anestesia suficiente por inhalación de isoflurano, se hizo en el lomo una incisión de la piel rectangular de 3 cm de anchura x 7 cm de longitud. Se dejó sin cortar el lado cefálico, y la piel se desprendió minuciosamente de los tejidos subcutáneos. Se suturaron los tres lados cortados a la piel de alrededor usando sutura de seda Nº 4, y se protegió con Tegaderm (3M) para prevenir la infección bacteriana.

45 Se diluyó a 200 µl con tampón fosfato péptido HMGB1 químicamente sintetizado (aminoácidos 1-44; 50 µg/administración/día) o péptido HMGB1 (aminoácidos 17-25; 50 µg/administración/día) y se administró a las ratas con herida experimental. La primera administración se realizó 6 horas después de la cirugía, y entonces los agentes se administraron cada 24 horas un total de cinco veces. Se administró como control negativo solución salina fisiológica tamponada con fosfato. Se retiró Tegaderm después de una semana, y se observó la herida dos semanas después de la producción de la herida. Se midieron las áreas sin curar (ulceración y necrosis).

50 Resultados

55 Se calculó la relación (%) del área sin curar con respecto al área de todo el colgajo cutáneo después de dos semanas de la producción de colgajos cutáneos. El área sin curar representó 14,1 % en promedio en el grupo de péptido HMGB1 (aminoácidos 1-44) y 9,1 % en promedio en el grupo de péptido HMGB1 (aminoácidos 17 a 25, 50 µg/administración/día). Además, la relación (%) del área sin curar con respecto al área de todo el colgajo cutáneo después de seis semanas de la producción de colgajos cutáneo fue 4,1 % en promedio en el grupo de péptido

HMGB1 (aminoácidos 1-44) y 3,5 % en promedio en el grupo de péptido HMGB1 (aminoácidos 17-25; 50 µg/administración/día) grupo (Fig. 26).

#### Discusión

En la prueba usando el modelo de daño de la piel en el Ejemplo 19, hubo una tendencia a que el área de herida durante el proceso de curación desde las semanas 1 hasta 7 después del daño fuera más pequeña en el grupo administrado con péptido HMGB1 químicamente sintetizado (aminoácidos 1-44) en comparación con el grupo administrado con HMGB1 de longitud completa producida en HEK293. Además, la prueba del presente ejemplo demostró que el efecto de mejora del daño de la piel observado en el grupo de péptido HMGB1 químicamente sintetizado (aminoácidos 17-25) era comparable o superior al observado en el grupo de péptido HMGB1 (aminoácidos 1-44, 50 µg/administración/día). Existen múltiples regiones (secuencias de núcleo) que tienen la actividad de reclutar células madre mesenquimatosas de la médula ósea *in vitro*. De éstas, la secuencia más corta conocida actualmente es la secuencia que consiste en 9 aminoácidos desde la posición 17 hasta 25. Las otras secuencias de núcleo con la actividad de reclutar células madre mesenquimatosas requieren 30 aminoácidos u 85 aminoácidos de longitud. El experimento de este ejemplo demostró que el grupo administrado con el péptido HMGB1 que consiste en solo 9 aminoácidos (aminoácidos 17-25) mostró mejora del daño de la piel no solo *in vitro*, sino también *in vivo*. Se espera que los péptidos que contienen los 9 aminoácidos como dominio de núcleo sean mucho más establemente producidos a coste más bajo en comparación con las preparaciones de proteína producidas de células cultivadas derivadas de eucariota tales como HEK293.

#### Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona péptidos que retienen la actividad de reclutar células PDGFR $\alpha$ -positivas, cuyos pesos moleculares son, por ejemplo, un décimo o menos en comparación con la proteína HMGB1 de longitud completa que consiste en aproximadamente 200 aminoácidos. Dichos péptidos se pueden producir por métodos de síntesis química usando sintetizadores de péptidos, así como métodos de producción usando células cultivadas de *E. coli* o derivadas de eucariota. Así, cuando los péptidos se producen como productos farmacéuticos, se puede esperar mejora de la pureza, producción estable y reducción de costes.

Además, cuando los péptidos recombinantes se produjeron en *E. coli* o células cultivadas, mostraron actividad mejorada que fue aproximadamente dos veces o aproximadamente seis veces la de HMGB1 de longitud completa cuando se compara por mol o por masa, respectivamente. Así, cuando los péptidos se usan clínicamente como productos farmacéuticos, es posible usar dosificaciones reducidas. Esto conduce a la reducción de costes y la prevención de efectos secundarios.

Además, se conoce HMGB1 de longitud completa por tener la actividad de unión con lipopolisacárido (LPS), que es una endotoxina. Además, existe un informe de que los fragmentos de HMGB1 de aminoácidos 1 a 79 o aminoácidos 88 a 162 de HMGB1 carecen de actividad de unión a LPS (Youn et al., J Immunol 2008, 180:5067-5074).

Cuando los productos farmacéuticos se contaminan con incluso una cantidad traza de LPS, causan fiebre y similares, frecuentemente dando como resultado efectos adversos graves. Por tanto, existen normas estrictas contra la contaminación de productos farmacéuticos con LPS. Puesto que HMGB1 tiene afinidad por LPS, es difícil retirar completamente el LPS contaminante de productos farmacéuticos. Sin embargo, puesto que la conversión en péptidos da como resultado la reducción de la afinidad por LPS, se espera que se pueda reducir esa contaminación de productos farmacéuticos con LPS. Así, usando péptidos que consisten en una porción identificada en la presente invención como células PDGFR $\alpha$ -positivas reclutadoras, es posible desarrollar productos farmacéuticos mucho más seguros.

La administración de un péptido de la presente invención a un tejido en necesidad de regeneración o un tejido adyacente del mismo se puede inducir o promover la regeneración del tejido. Además, la administración de un péptido de la presente invención a un tejido distinto de un tejido en necesidad de regeneración por administración intravenosa, y similares, puede inducir o promover la regeneración del tejido en necesidad de regeneración. Por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad de órgano ubicado profundo, tal como infarto cerebral, es difícil administrar un agente terapéutico directamente a un sitio dañado (cerebro). Por otra parte, en la presente invención, tal tratamiento se puede llevar a cabo por administración intravenosa, que se usa ampliamente en la práctica médica general. Es, por tanto, posible administrar un agente terapéutico en cualquier concentración y frecuencia de una manera segura y simple. Esto es un efecto superior en comparación con los métodos terapéuticos convencionales.

Mientras tanto, un método basado en células de médula ósea recientemente desarrollado que se conoce que es eficaz en el tratamiento de infarto cerebral implica la recogida de células de la médula ósea del paciente y la re-administración de las células en la circulación sanguínea. Este método está inevitablemente asociado a invasión grave, debido a que se necesita que se aspiren las células de la médula ósea con una aguja de taladro grande insertada en la médula ósea, que se localiza profunda dentro del cuerpo. A diferencia, la presente invención permite que las células de la médula ósea sean reclutadas directamente a la circulación sanguínea por administración intravenosa de un agente, y, por tanto, no implica invasión grave incluso cuando el agente se administró frecuentemente a pacientes con infarto cerebral.

Las células madre pluripotentes derivadas de médula ósea tienen la posible capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células, tales como células mesenquimatosas, células epiteliales y células nerviosas. Despues de migrar a un sitio dañado, pueden diferenciarse dependiendo de un entorno de nicho que rodea el sitio dañado, y entonces inducen la reparación de tejido. En la medicina regenerativa y la terapia celular, células madre pluripotentes de la médula ósea, que son células raras, se expanden por cultivo *ex vivo* antes de uso en el tratamiento. Sin embargo, esto requiere un control de seguridad adecuado debido a que, a diferencia de los agentes farmacéuticos convencionales, existe un riesgo de deterioro de células (canceración y contaminación con bacterias, virus, etc.) que se puede causar durante el proceso de cultivo. Por otra parte, la presente invención es altamente segura debido a que las células no se retiran del cuerpo para la manipulación artificial.

5 10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENOMIX CO., LTD. UNIVERSIDAD DE OSAKA

<120> Péptidos para inducir regeneración de tejido y uso de los mismos

15 15 <130> G6-X1001Y1P

<150> JP 2011-098270

<151> 26-04-2011

20 20 <150> JP 2011-219454

<151> 03-10-2011

<160> 14

25 25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 215

<212> PRT

30 30 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	
1						5				10				15	
Ala	Phe	Phe	Val	Gln	Thr	Cys	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro
						20				25				30	
Asp	Ala	Ser	Val	Asn	Phe	Ser	Glu	Phe	Ser	Lys	Lys	Cys	Ser	Glu	Arg
						35				40				45	
Trp	Lys	Thr	Met	Ser	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Lys	Phe	Glu	Asp	Met	Ala
						50				55				60	
Lys	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu	Arg	Glu	Met	Lys	Thr	Tyr	Ile	Pro
						65				70				75	80
Pro	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Pro	Lys	
						85				90				95	
Arg	Pro	Pro	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Ser	Glu	Tyr	Arg	Pro	Lys
						100				105				110	
Ile	Lys	Gly	Glu	His	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp	Val	Ala	Lys	Lys
						115				120				125	
Leu	Gly	Glu	Met	Trp	Asn	Asn	Thr	Ala	Ala	Asp	Asp	Lys	Gln	Pro	Tyr
						130				135				140	
Glu	Lys	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ile	Ala
						145				150				155	160
Ala	Tyr	Arg	Ala	Lys	Gly	Lys	Pro	Asp	Ala	Ala	Lys	Lys	Gly	Val	Val
						165				170				175	
Lys	Ala	Glu	Lys	Ser	Lys	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	
						180				185				190	
Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu
						195				200				205	
Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu								
						210				215					

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 648

5

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

10	atgggcaaag	gagatcccaa	gaagccgaga	ggcaaaatgt	catcatatgc	atttttgtg	60
	caaacttgtc	gggaggagca	taagaagaag	cacccagatg	cttcagtcaa	cttctcagag	120
	ttttctaaga	agtgctcaga	gagggtggaa	accatgtctg	ctaaagagaa	aggaaaattt	180
	gaagatatatgg	caaaagcgg	caaggcccgt	tatgaaaagag	aaatgaaaac	ctatatccct	240
	cccaaagggg	agacaaaaaaa	gaagttcaag	gatcccaatg	cacccaaagag	gcctccctcg	300
	gccttcttc	tcttctgctc	ttagtatcgc	ccaaaaatca	aaggagaaca	tcctggcctg	360
	tccattggtg	atgttgcgaa	gaaactggga	gagatgtgg	ataacactgc	tgcagatgac	420
	aagcagcctt	atgaaaagaa	ggctgcgaag	ctgaaggaaa	aatacgaaaa	ggatattgct	480
	gcatatcgag	ctaaagaaaa	gcctgatgca	gcaaaaaagg	gagttgtcaa	ggctgaaaaaa	540
	agcaagaaaa	agaaggaaga	ggaggaagat	gaggaagatg	aagaggatga	ggaggaggag	600
	gaagatgaag	aagatgaaga	tgaagaagaa	gatgatgatg	atgaataa		648

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 215

15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 3

# ES 2 788 394 T3

Met	Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	
1		5				10					15				
Ala	Phe	Phe	Val	Gln	Thr	Cys	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro
					20			25				30			
Asp	Ala	Ser	Val	Asn	Phe	Ser	Glu	Phe	Ser	Lys	Lys	Cys	Ser	Glu	Arg
					35			40				45			
Trp	Lys	Thr	Met	Ser	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Lys	Phe	Glu	Asp	Met	Ala
					50			55			60				
Lys	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu	Arg	Glu	Met	Lys	Thr	Tyr	Ile	Pro
					65			70			75			80	
Pro	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Pro	Lys	
					85			90			95				
Arg	Pro	Pro	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Ser	Glu	Tyr	Arg	Pro	Lys
					100			105			110				
Ile	Lys	Gly	Glu	His	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp	Val	Ala	Lys	Lys
					115			120			125				
Leu	Gly	Glu	Met	Trp	Asn	Asn	Thr	Ala	Ala	Asp	Asp	Lys	Gln	Pro	Tyr
					130			135			140				
Glu	Lys	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ile	Ala
					145			150			155			160	
Ala	Tyr	Arg	Ala	Lys	Gly	Lys	Pro	Asp	Ala	Ala	Lys	Lys	Gly	Val	Val
					165			170			175				
Lys	Ala	Glu	Lys	Ser	Lys	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Glu	Glu	
					180			185			190				
Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu							
					195			200			205				
Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu								
					210			215							

<210> 4

<211> 648

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 4

atgggcaaag	gagatcctaa	aaagccgaga	ggcaaaaatgt	cctcatatgc	atttttg	60
caaacttgc	gggaggagca	caagaagaag	cacccggatg	tttctgtcaa	tttctcagag	120
ttctccaaga	agtgc	tca	gagg	accatgtctg	ctaaagaaaa	180
gaagatatgg	caaaggctga	caaggctcg	tatgaaagag	aatgaaaaac	ctacatcccc	240
cccaaagggg	agacaaaaaa	gaagttcaag	gacccaatg	cacccaagag	gcctc	300
gccttcttct	tggttctt	tgagtaccgc	cccaaaatca	aaggcgagca	tcctggctta	360
tccatgg	atgttgc	aaa	gaaacttagga	gagatgtgg	acaacactgc	420
aagcagccct	atgagaagaa	agctgccaag	ctgaaggaga	agtatgagaa	agcagatgac	480
gcctacagag	ctaaaggaaa	acctgtatgc	gcgaaaaagg	gggtggtcaa	ggctgaaaag	540
10 agcaagaaaa	agaaggaaga	ggaagatgt	gaggaggatg	aagaggatga	ggaagaggag	600
gaagaagagg	aagacgaaga	tgaagaagaa	gatgtatgt	atgaataa		648

<210> 5

<211> 215

15 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

Met	Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	
1		5				10					15				
Ala	Phe	Phe	Val	Gln	Thr	Cys	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro
				20				25				30			
Asp	Ala	Ser	Val	Asn	Phe	Ser	Glu	Phe	Ser	Lys	Lys	Cys	Ser	Glu	Arg
				35			40					45			
Trp	Lys	Thr	Met	Ser	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Lys	Phe	Glu	Asp	Met	Ala
				50			55				60				
Lys	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Glu	Arg	Glu	Met	Lys	Thr	Tyr	Ile	Pro
				65			70			75			80		
Pro	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Pro	Lys	
				85			90				95				
Arg	Pro	Pro	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Ser	Glu	Tyr	Arg	Pro	Lys
				100			105				110				
Ile	Lys	Gly	Glu	His	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp	Val	Ala	Lys	Lys
				115			120				125				
Leu	Gly	Glu	Met	Trp	Asn	Asn	Thr	Ala	Ala	Asp	Asp	Lys	Gln	Pro	Tyr
				130			135				140				
Glu	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ile	Ala	
				145			150			155			160		
Ala	Tyr	Arg	Ala	Lys	Gly	Lys	Pro	Asp	Ala	Ala	Lys	Lys	Gly	Val	Val
				165			170				175				
Lys	Ala	Glu	Lys	Ser	Lys	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Glu	Glu	
				180			185				190				
Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu							
				195			200				205				
Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu								
				210			215								

&lt;210&gt; 6

5 &lt;211&gt; 648

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 6

10

atgggcaaag	gagatcctaa	gaagccgaga	ggcaaaatgt	cctcatatgc	attctttgtg	60
caaacctgcc	gggaggagca	caagaagaag	cacccggatg	cttctgtcaa	cttctcagag	120
ttctccaaga	agtgctcaga	gagggtggaa	accatgtctg	ctaaagaaaa	ggggaaattt	180
gaagatatgg	caaaggctga	caaggctcgt	tatgaaaagag	aaatgaaaac	ctacatcccc	240
cccaaagggg	agacaaaaaa	gaagttcaag	gaccccaatg	cccccaagag	gcctccctcg	300
gccttcttct	tgttctgttc	ttagtaccgc	ccaaaaatca	aaggcgagca	tcctggctta	360
tccattgggt	atgttgcgaa	gaaacttagga	gagatgtgg	acaacactgc	tgccgtatgac	420
aaggccct	atgaaaagaa	ggccgccaag	ctgaaggaga	agtatgagaa	ggatattgct	480
gcctacagag	ctaaagaaaa	acctgatgca	gcgaaaaagg	gggtggtcaa	ggctgagaag	540
agcaagaaaa	agaaggaaga	ggaagacgac	gaggaggatg	aagaggatga	ggaagaggag	600
gaagaggagg	aagacgaaga	tgaagaagaa	gatgatgatg	atgaataaa		648

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 5

15 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

<223> fragmento añadido a la proteína expresada o péptidos

<400> 7

5 Gly Pro Gly Tyr Gln  
1 5

<210> 8

<211> 60

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(60)

15 <223> secuencia de nucleótidos del sitio de clonación del vector pCAGGS

<400> 8

cat cac cat cac cat cac tcc gcg gct ctt gaa gtc ctc ttt cag gga  
His His His His His Ser Ala Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly  
1 5 10 15

48

ccc ggg tac cag  
Pro Gly Tyr Gln  
20

60

20 <210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> secuencia de aminoácidos del sitio de clonación del vector pCAGGS

<400> 9

His His His His His Ser Ala Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly  
1 5 10 15

30 Pro Gly Tyr Gln 20

<210> 10

<211> 63

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos artificialmente sintetizada que codifica la secuencia señal secretora

<400> 10

10

atggagacag acacactcct gctatggta ctgctgtctt gggttccagg ttccactggt	60
gac	63

<210> 11

<211> 14

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una marca 6xHis artificialmente sintetizada y sitio de reconocimiento de proteasa TEV

20

<400> 11

Met	Lys	His	His	His	His	His	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln
1												10

25

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Marca 6xHis

<400> 12

35

His	His	His	His	His	His
1					5
					44

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Sitio de reconocimiento de proteasa TEV

<400> 13

10

Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly
1					5	

<210> 14

<211> 228

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> hsHMGB1 recombinante con marca 6xHis y sitio de reconocimiento de proteasa TEV

20

<400> 14

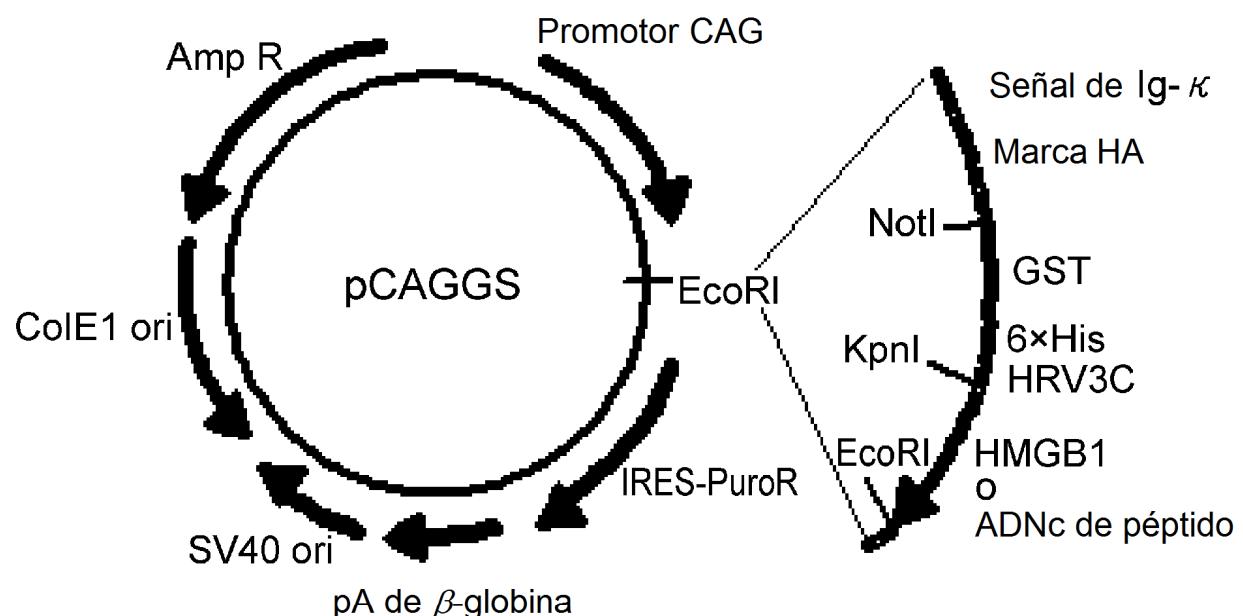
Met	Lys	His	His	His	His	His	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Lys	
1		5					10					15			
Gly	Asp	Pro	Lys	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Phe
			20				25					30			
Val	Gln	Thr	Cys	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro	Asp	Ala	Ser
	35				40			45							
Val	Asn	Phe	Ser	Glu	Phe	Ser	Lys	Lys	Cys	Ser	Glu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

ES 2 788 394 T3

Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys  
145 150 155 160  
Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg  
165 170 175  
Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu  
180 185 190  
Lys Ser Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu  
195 200 205  
Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp  
210 215 220  
Asp Asp Asp Glu  
225

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en una porción de una proteína HMGB1 y tiene una actividad de estimulación de la migración de una célula, donde dicho péptido consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos a continuación:
  - 5 (1) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (2) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 70 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - 10 (3) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (4) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 170 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (5) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - 15 (6) la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (7) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - 20 (8) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 70 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (9) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (10) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 170 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - 25 (11) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (12) la secuencia de aminoácidos de la posición 2 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - 30 (13) la secuencia de aminoácidos de la posición 17 a la posición 25 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (14) la secuencia de aminoácidos de la posición 45 a la posición 84 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (15) la secuencia de aminoácidos de la posición 85 a la posición 169 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - 35 (16) la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 185 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5;
  - (17) la secuencia de aminoácidos de la posición 89 a la posición 195 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5; y
  - 40 (18) la secuencia de aminoácidos de la posición 93 a la posición 215 en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3 y 5.
2. El péptido de la reivindicación 1, el cual es un péptido sintético.
3. El péptido de la reivindicación 1, el cual es un péptido producido usando una célula.
4. Un ADN que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Un vector que comprende el ADN de la reivindicación 4.
- 45 6. Una célula transformada que comprende el ADN de la reivindicación 4 o el vector de la reivindicación 5.



cat cac cat cac cat cac tcc gcg gct ctt  
 His His His His His Ser Ala Ala Leu

gaa gtc ctc ttt cag gga ccc ggg tac cag (SEQ ID NO:8)  
 Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Tyr Gln (SEQ ID NO:9)

↑  
 sitio de escisión por enzimas de HRV3C

Péptido y  
 proteína de  
 interés

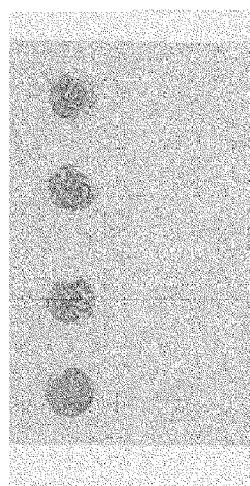
FIG. 1

A

HEK\_HMGB1

1-215

PBS



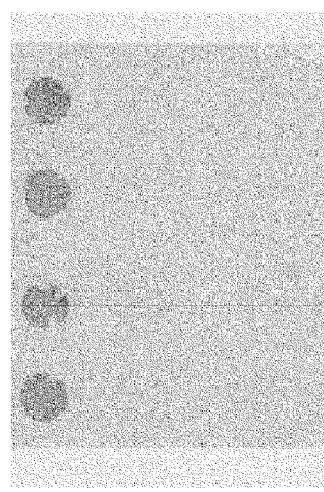
$\mu$  g/ml

50 0

1-84

85-169

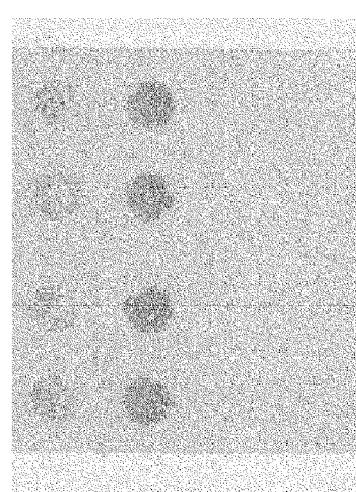
PBS



1-44

45-84

PBS



50 50 0

B

PC MSC humanas

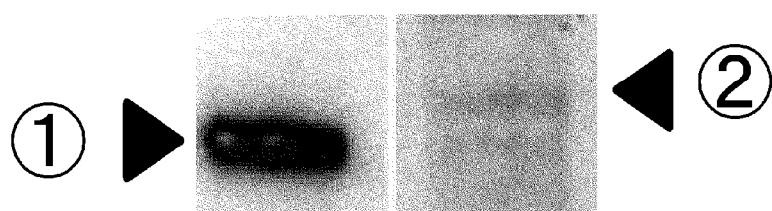


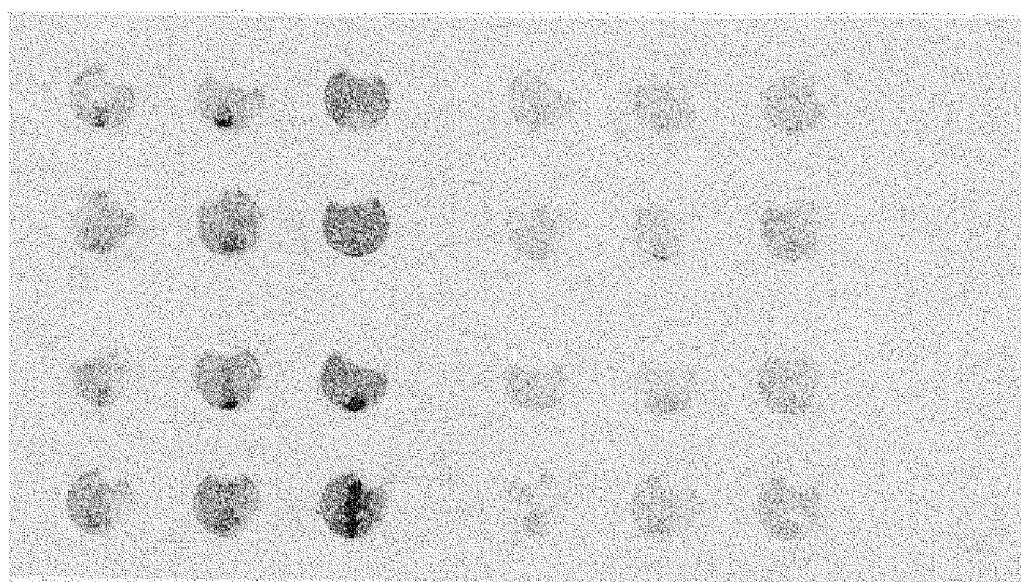
FIG. 2

HEK\_HMGB1

45-215

63-215

PBS



$\mu$  g/ml 5 15 25 5 15 25 0

FIG. 3

Actividad promotora de la migración en células madre mesenquimatosas de cultivo primario  
Células de médula ósea de ratones C57/Bl6

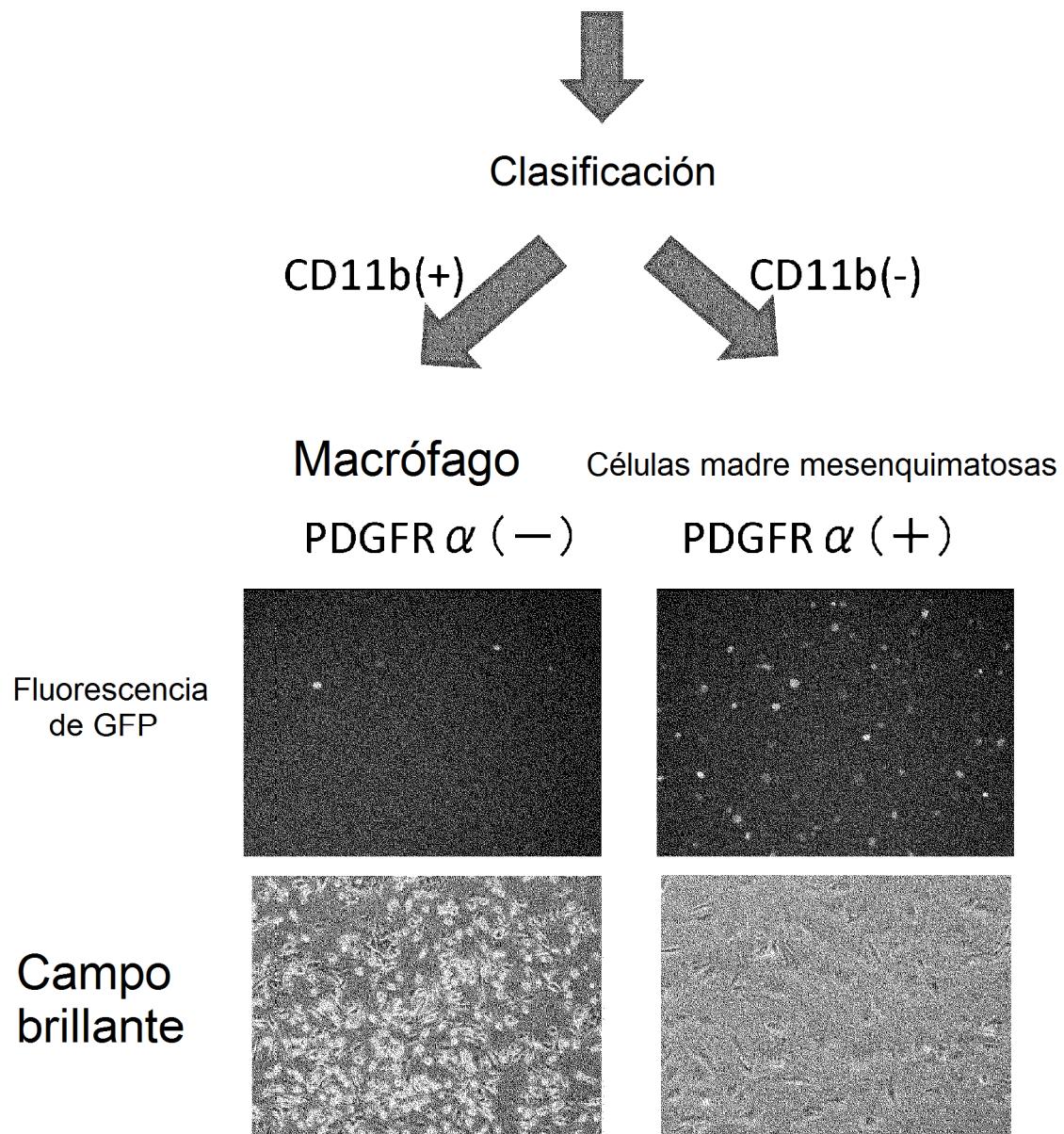
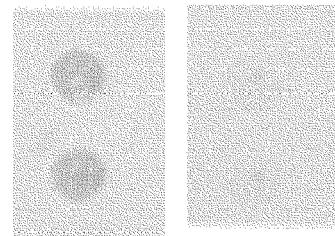


FIG. 4

Células CD11b-negativas, PDGFR- $\alpha$ -positivas

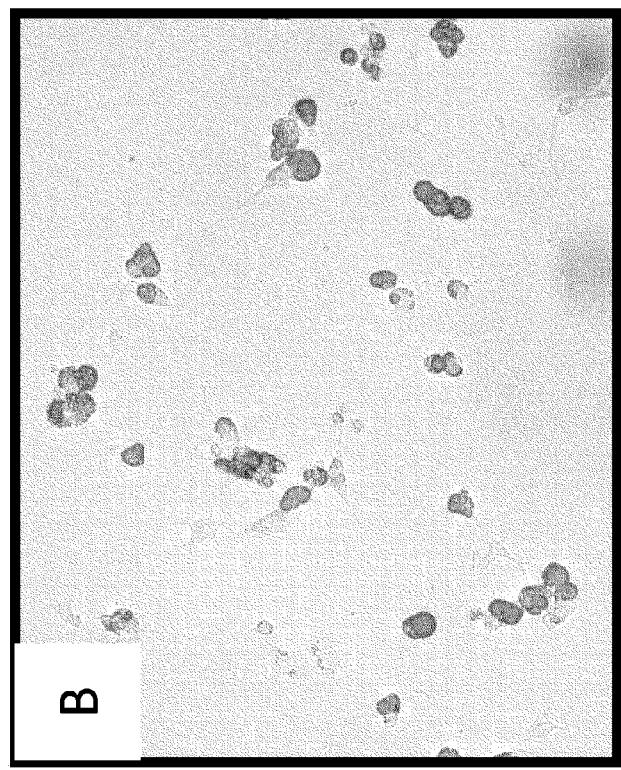
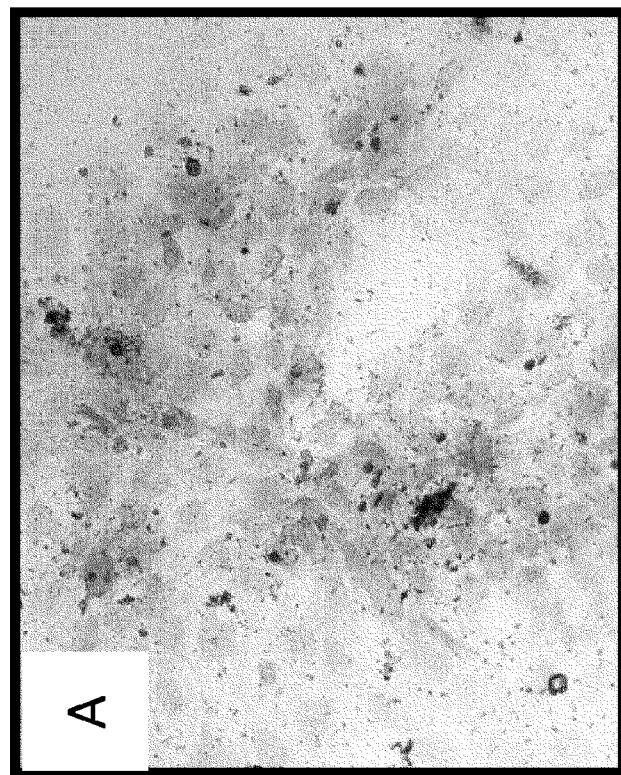


Péptido(1-44)      40      0  
( $\mu$  g/ml)

FIG. 5

Diferenciación ósea

Diferenciación de adipocitos



PDGFR  $\alpha$  (+) Lin(-)c-kit(-)

PDGFR  $\alpha$  (+) Lin(-)c-kit(-)

FIG. 6

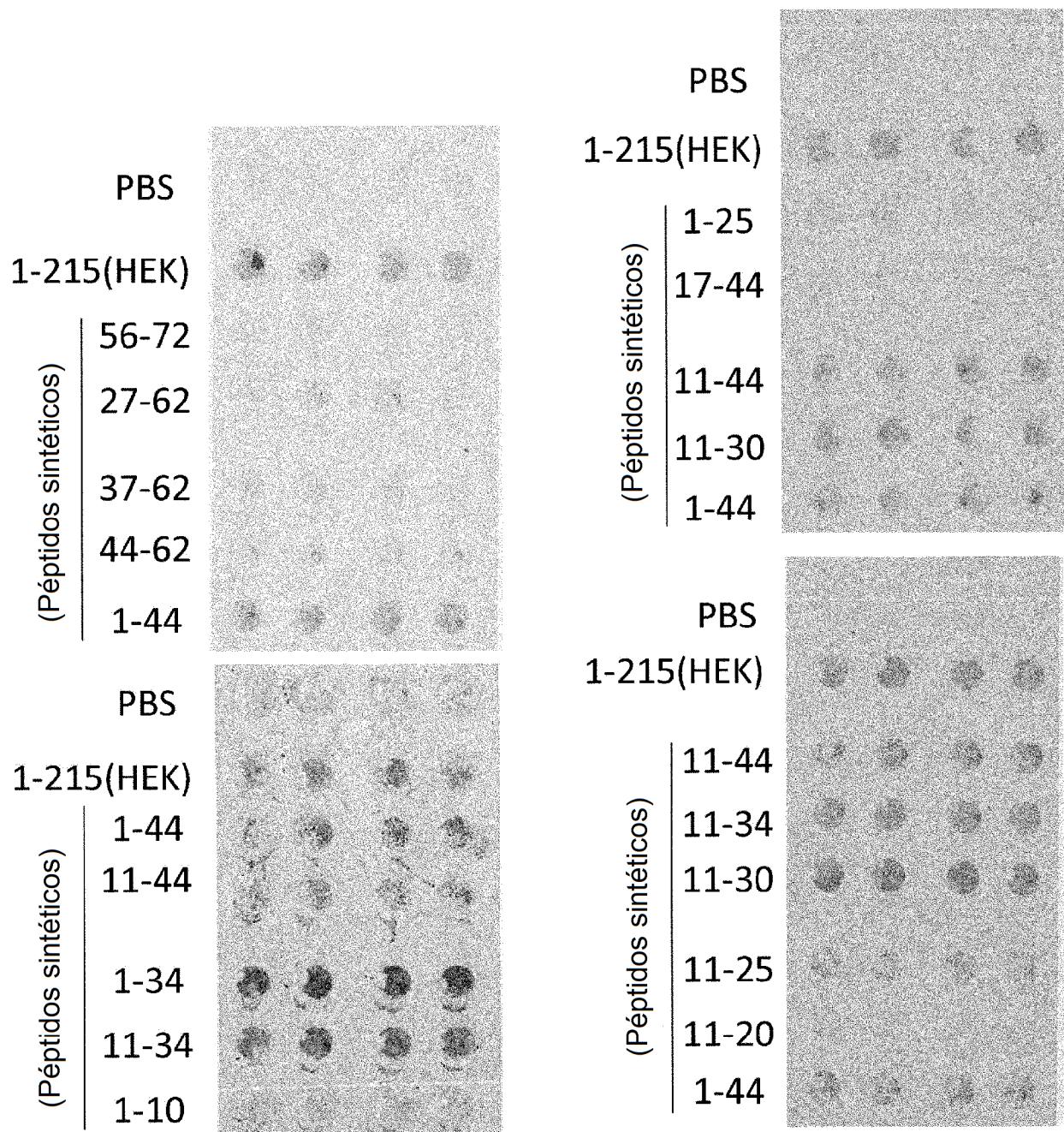


FIG. 7

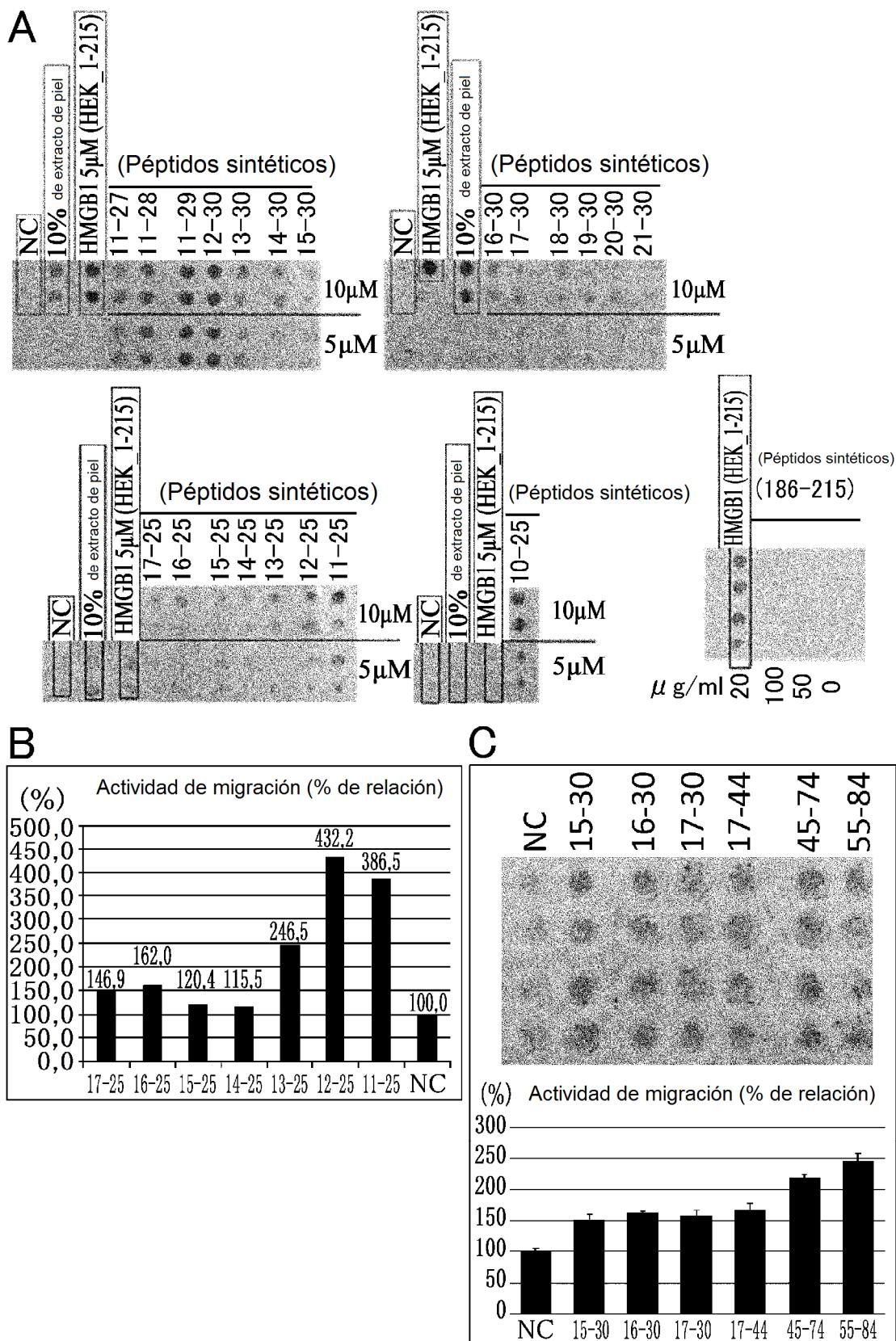


FIG. 8

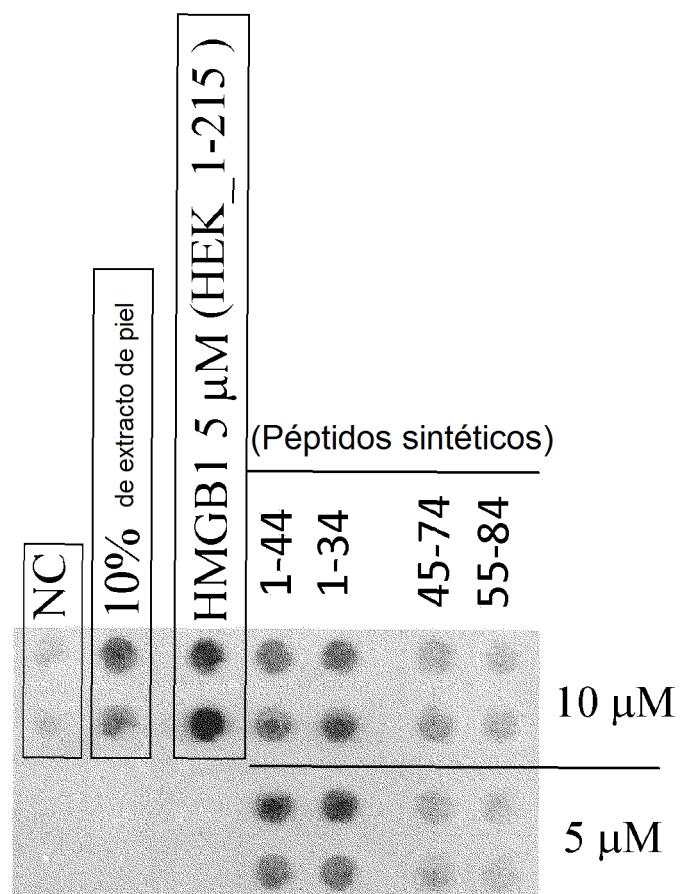
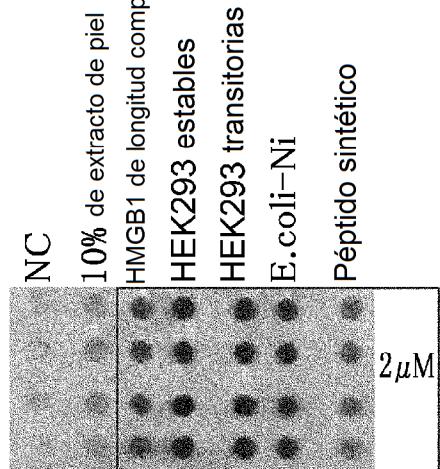


FIG. 9

Actividad promotora de la migración de péptidos derivados de HEK293  
Péptido (1-44)



	Área total de células migradas / área de ranura de la cámara x 100 (%)	Relación de área con respecto a HMGB1 de longitud completa (mol igual)	Relación de área con respecto a HMGB1 de longitud completa (masa igual)
HMGB1 de longitud completa	21,5	1	1
HEK293- Estables	34,1	1,59	7,93
HEK293- Transitorias	33,9	1,58	7,90
E.coli	34,4	1,60	8,02
Péptido sintético	12,3	0,57	2,86

FIG. 10

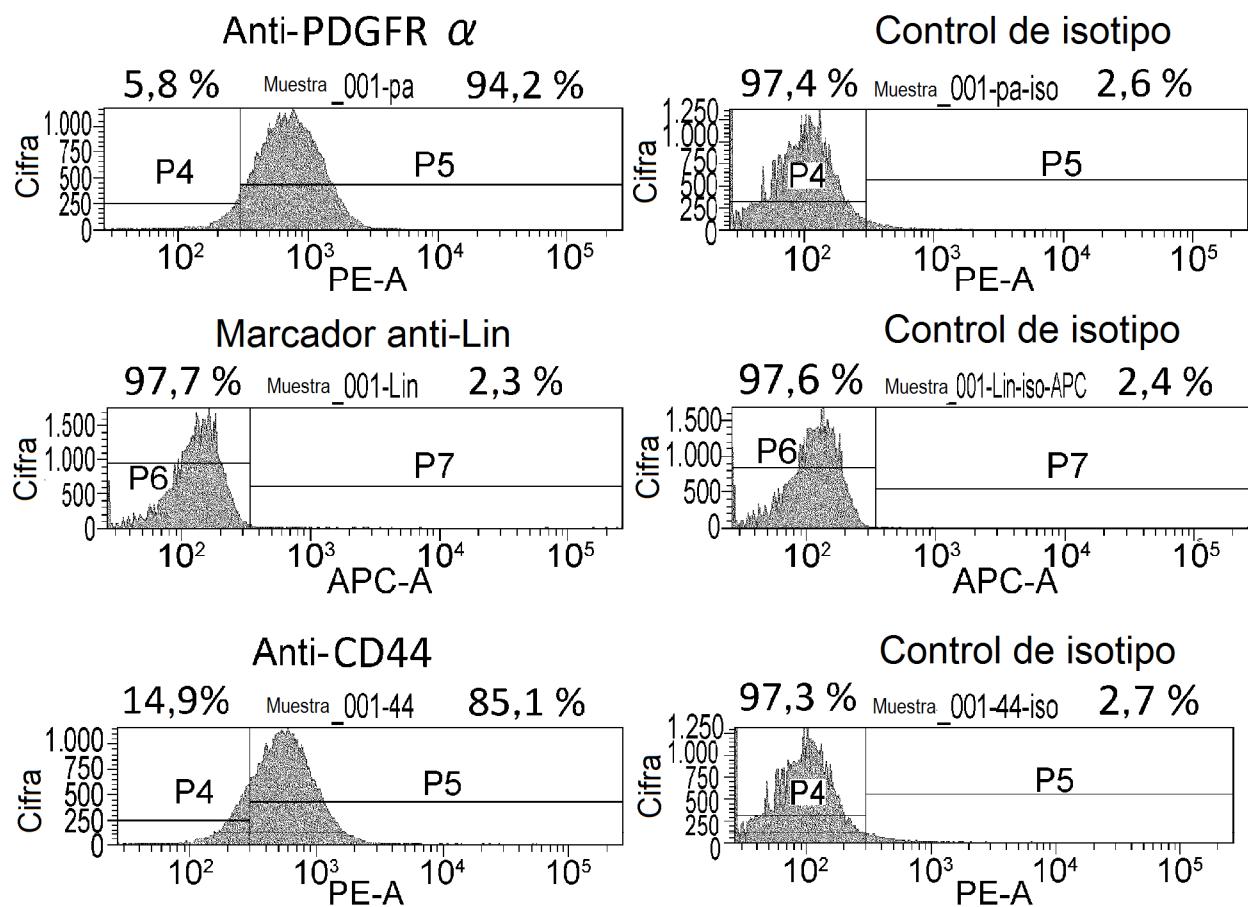
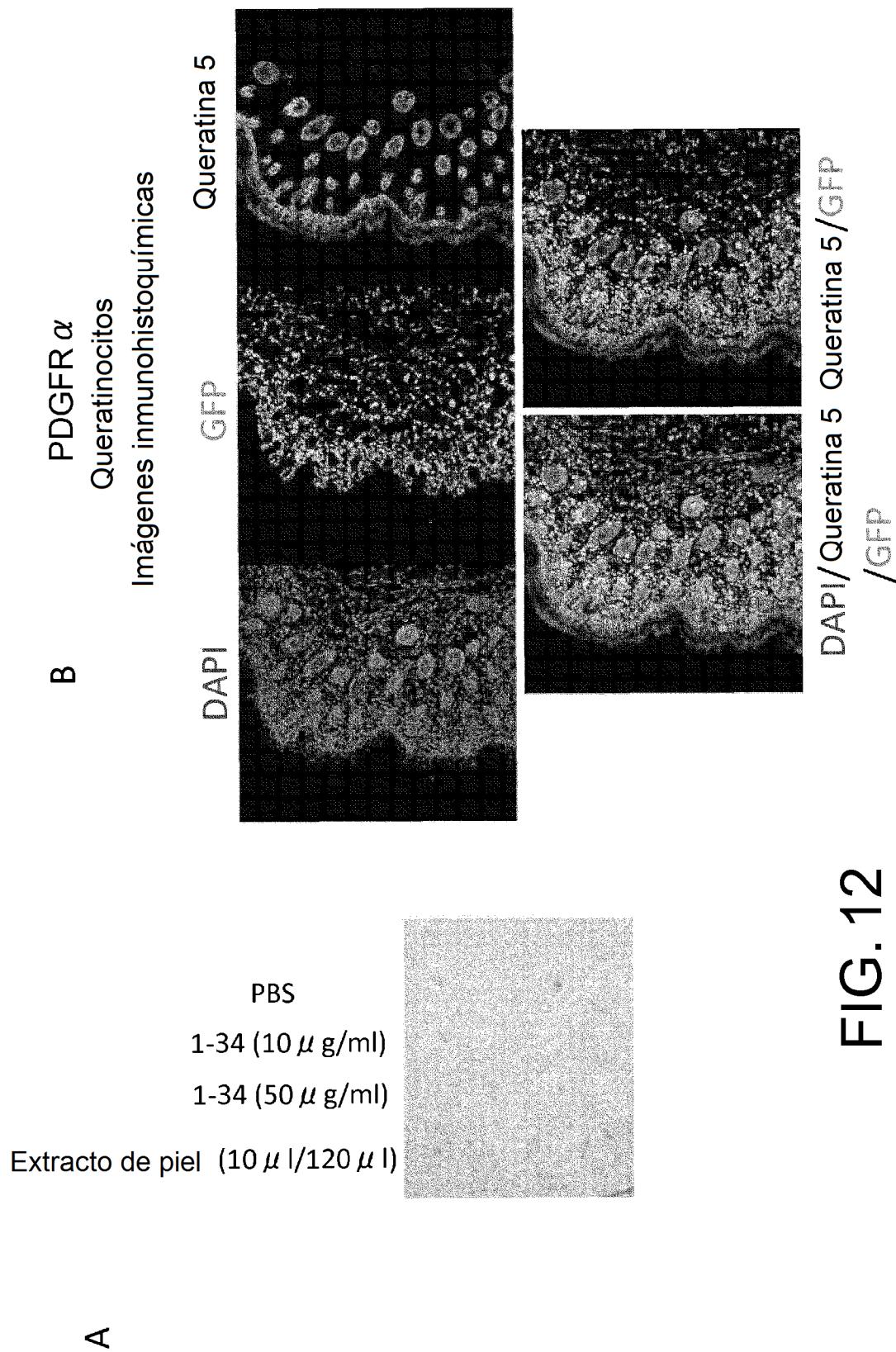


FIG. 11

Actividad de migración de queratinocitos de cultivo primario



## Actividad de migración de fibroblastos de cultivo primario

A

B

PDGFR  $\alpha$   
Fibroblastos

Imágenes inmunohistoquímicas

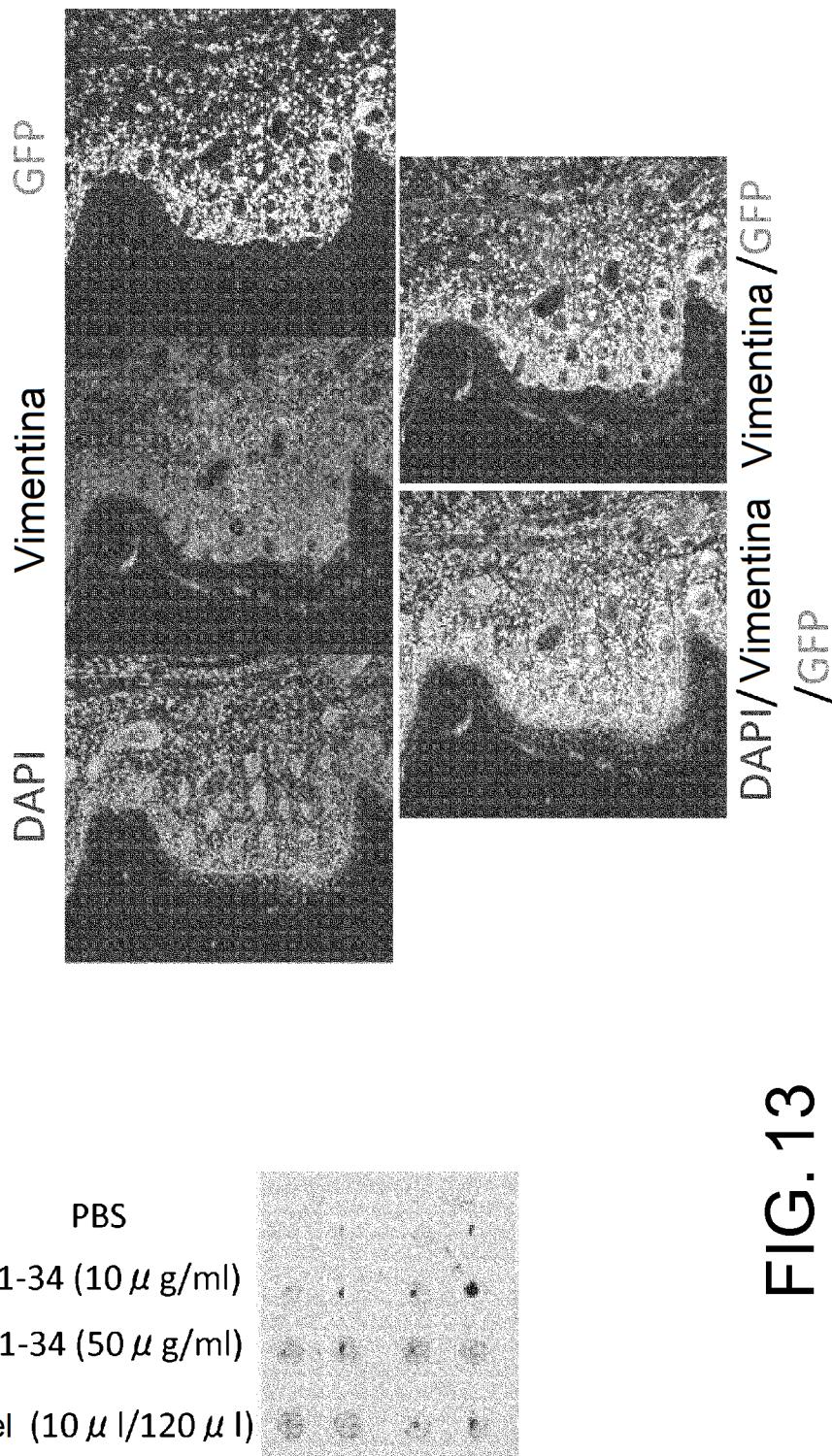
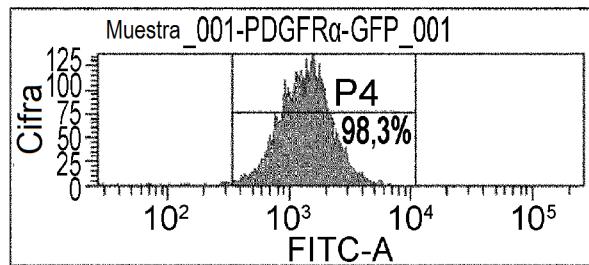


FIG. 13

Fibroblastos de ratón PDGFR  $\alpha$ -GFP



Fibroblastos de ratón no mutante

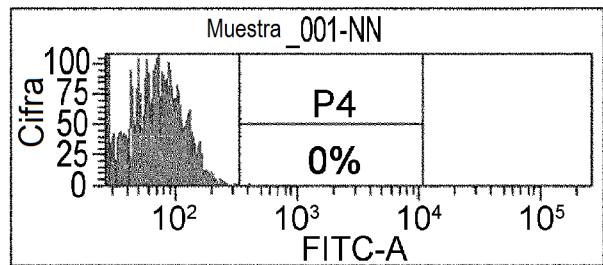


FIG. 14

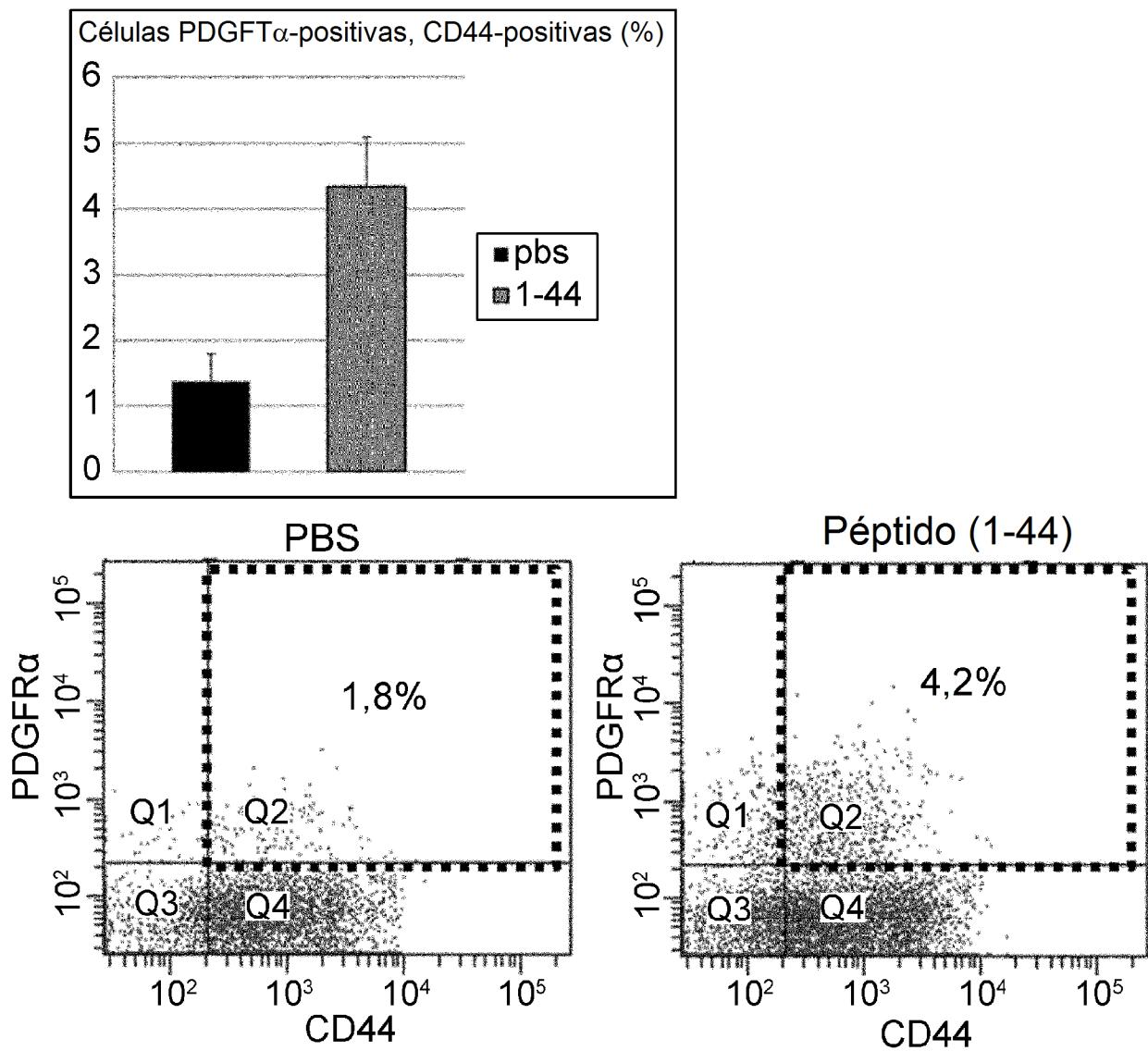


FIG. 15

Individuo tratado con péptido sintético (1-44)

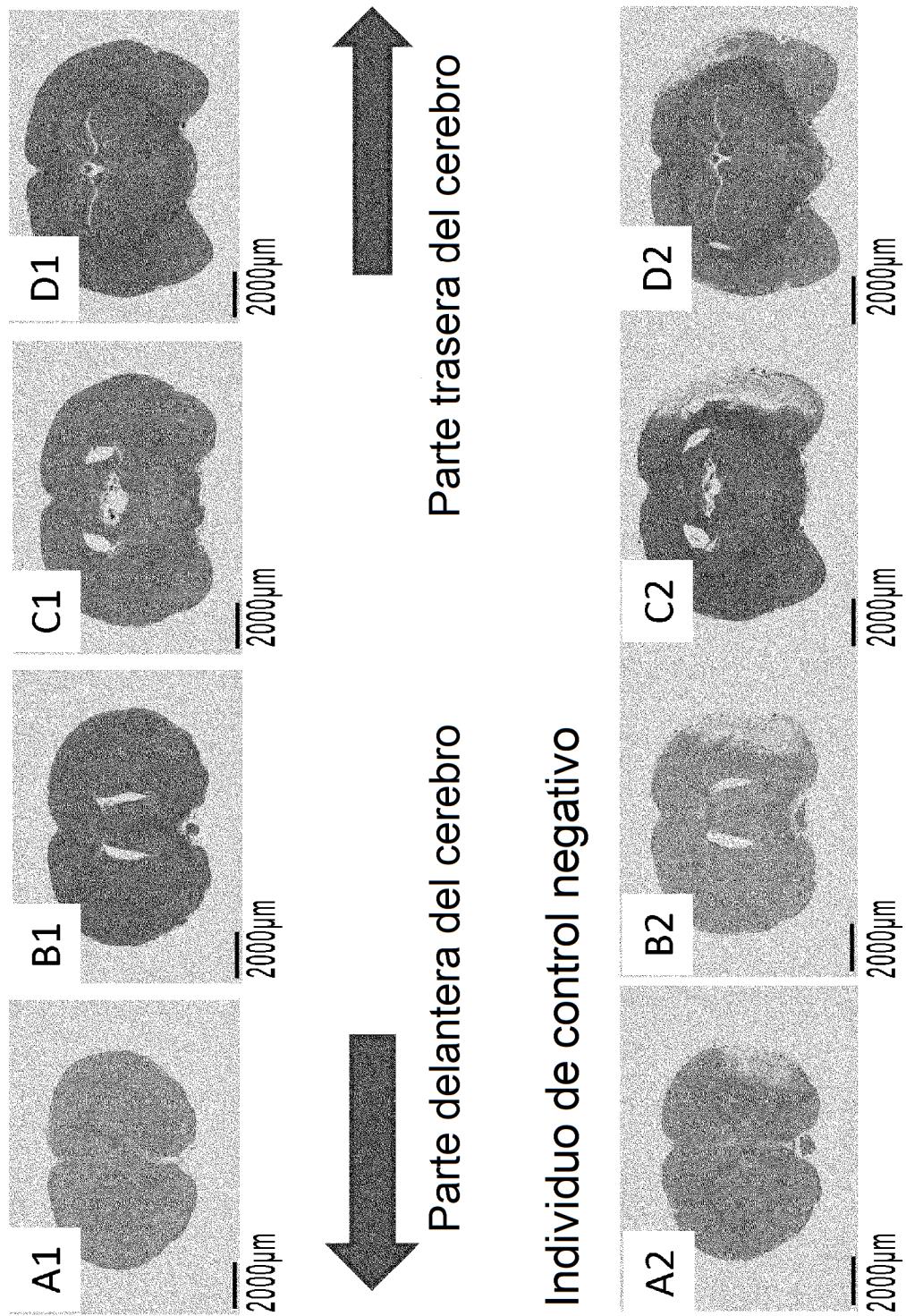


FIG. 16

(Cerebro derecho) Tamaño del infarto cerebral / tamaño del cerebro normal (%)

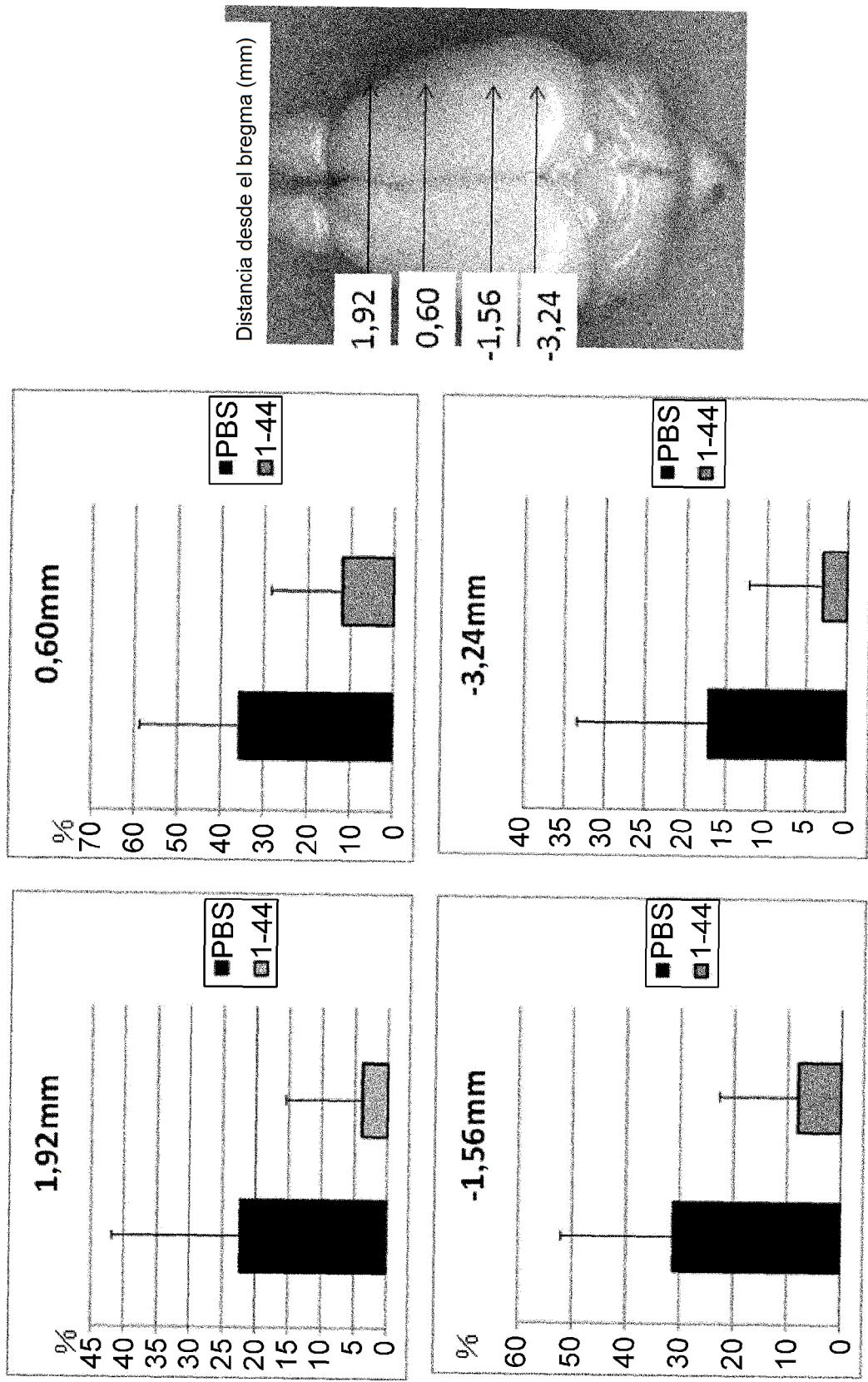


FIG. 17

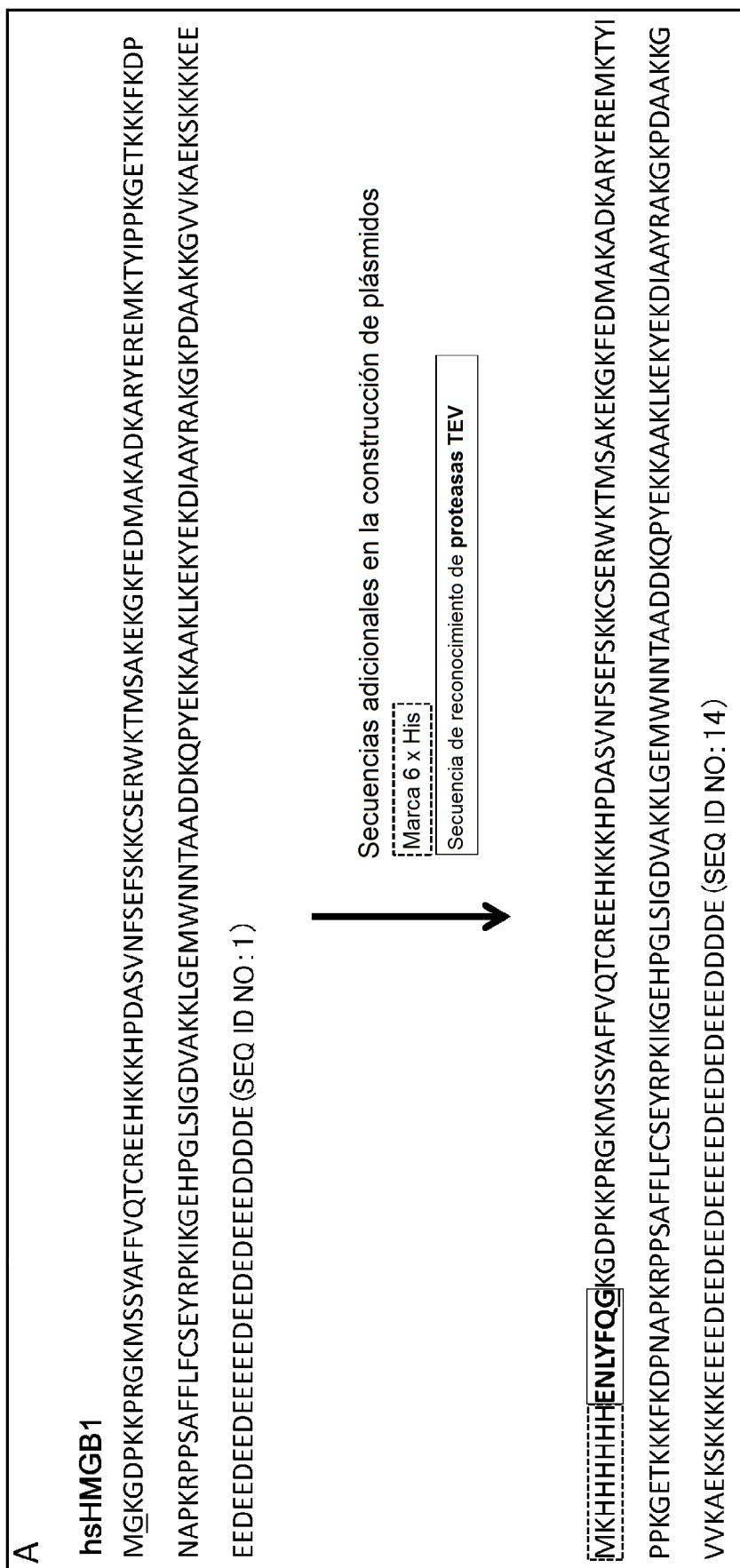
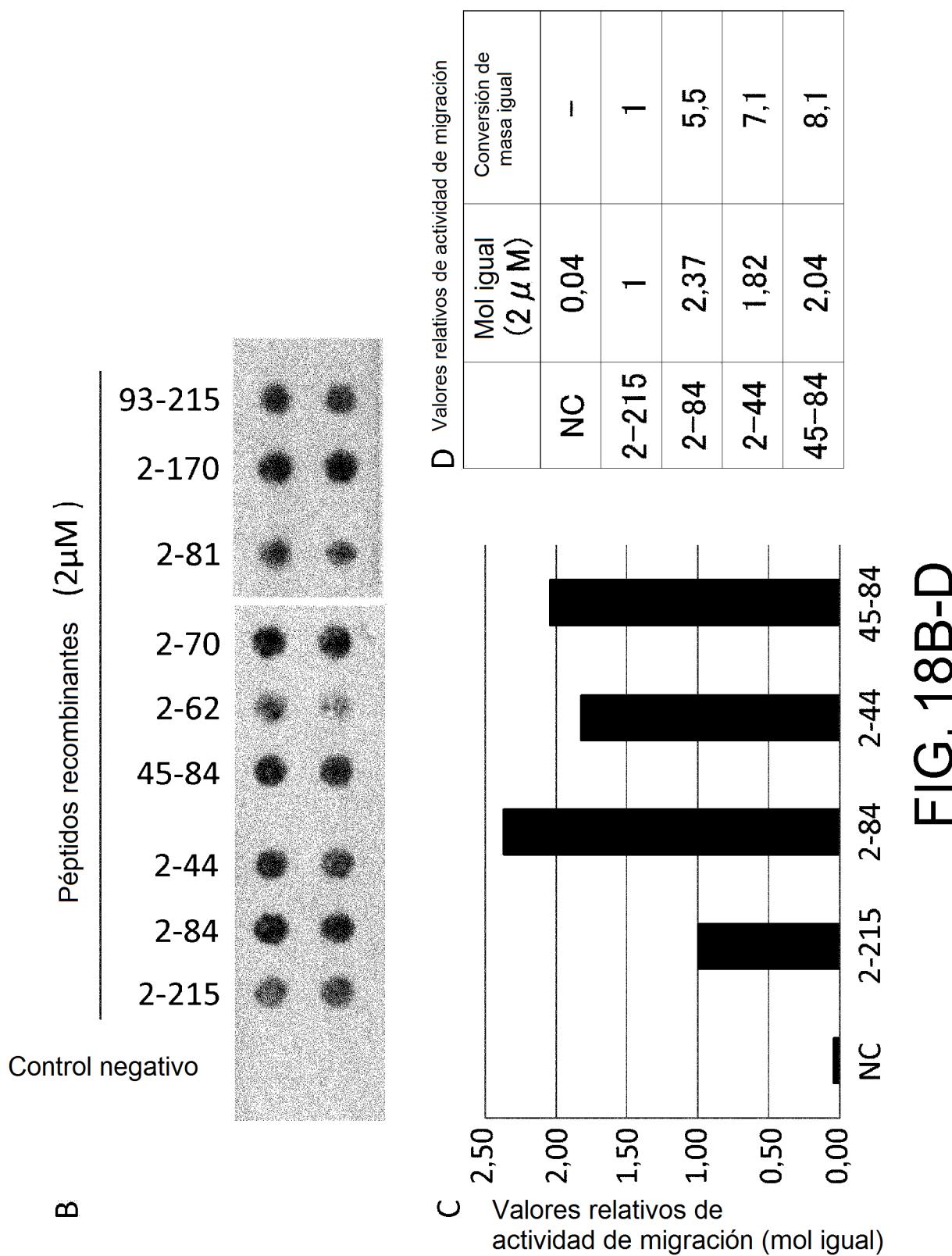


FIG. 18A



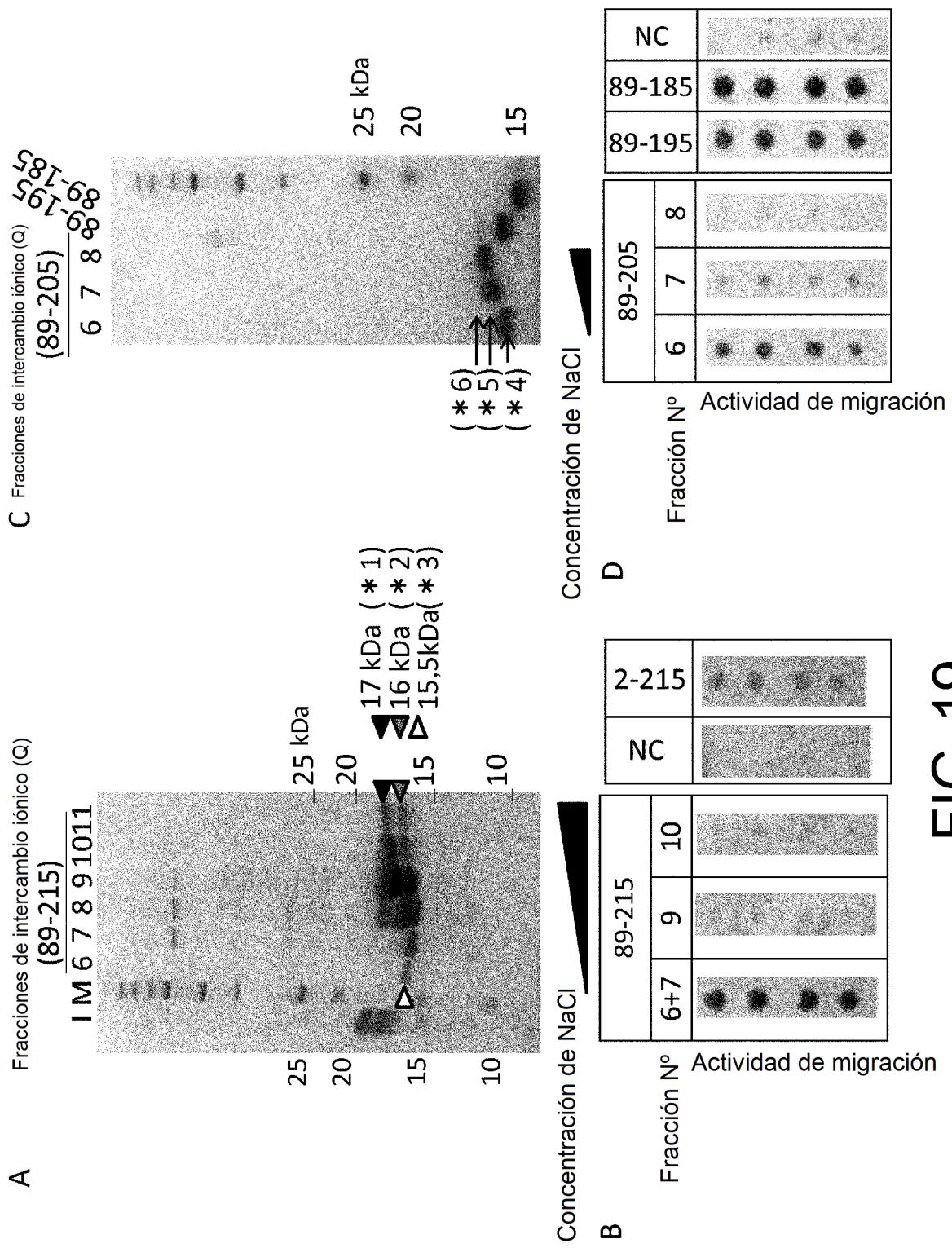


FIG. 19

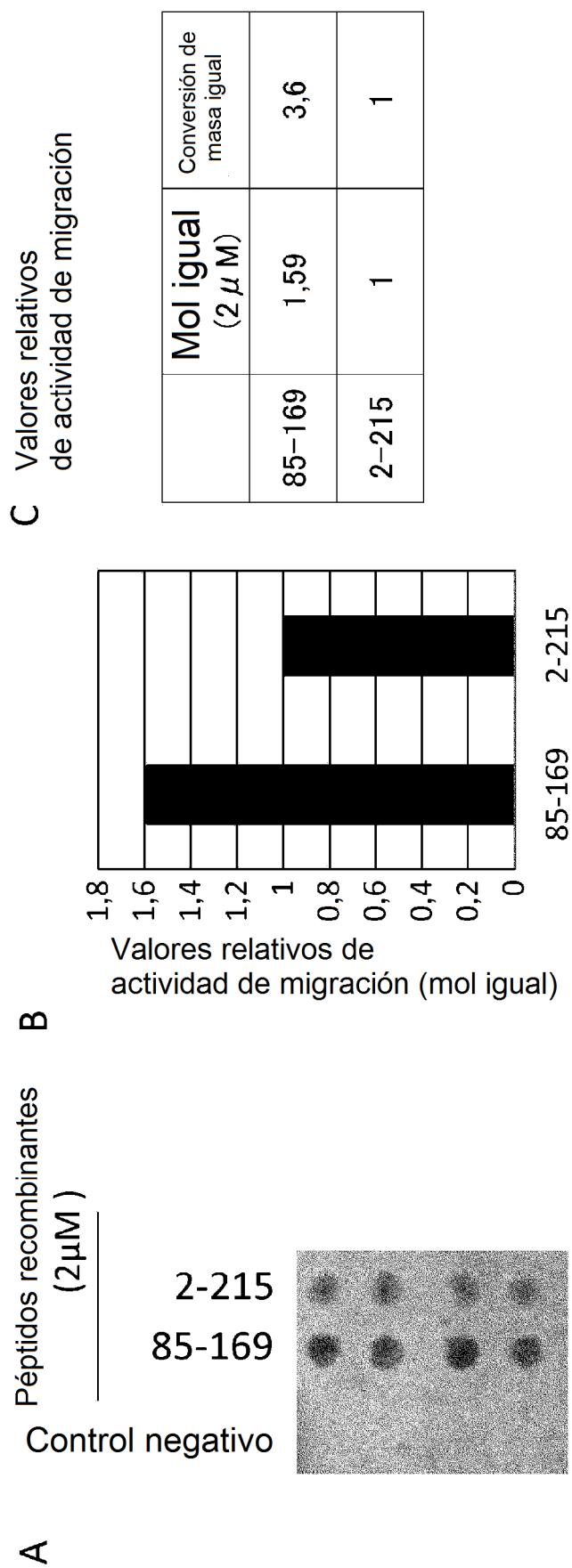
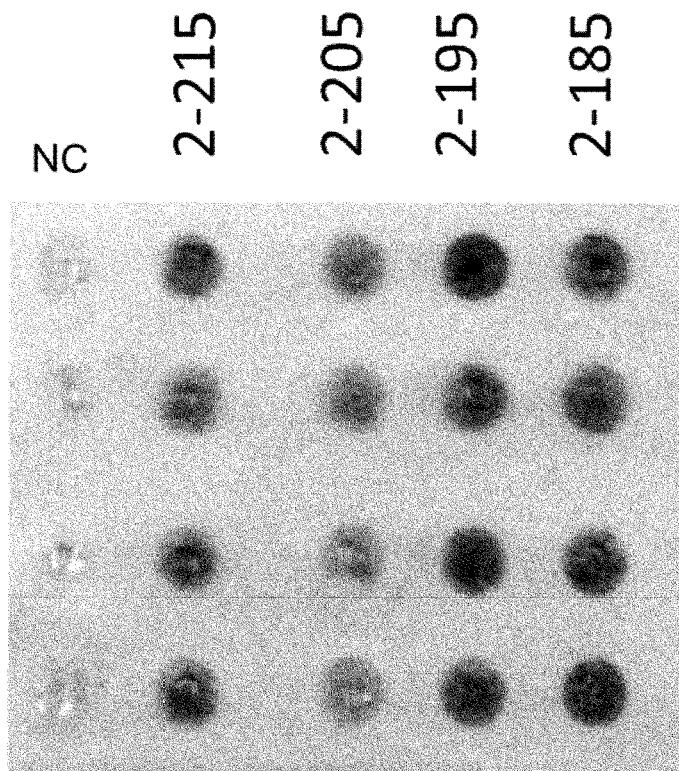


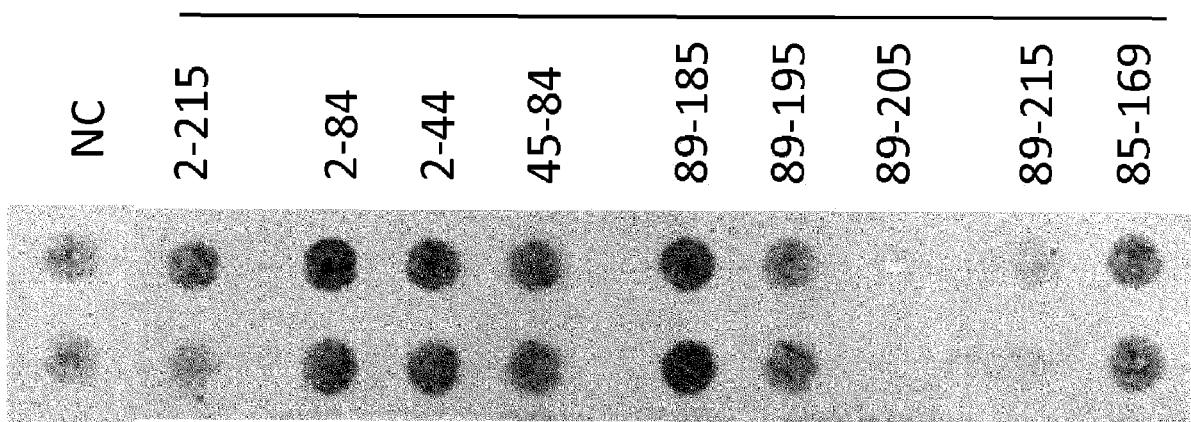
FIG. 20

A



B

Péptidos recombinantes (concentración final 2  $\mu$ M)



Célula: MCS humana  $1,5 \times 10^6$  células / ml

FIG. 21-1

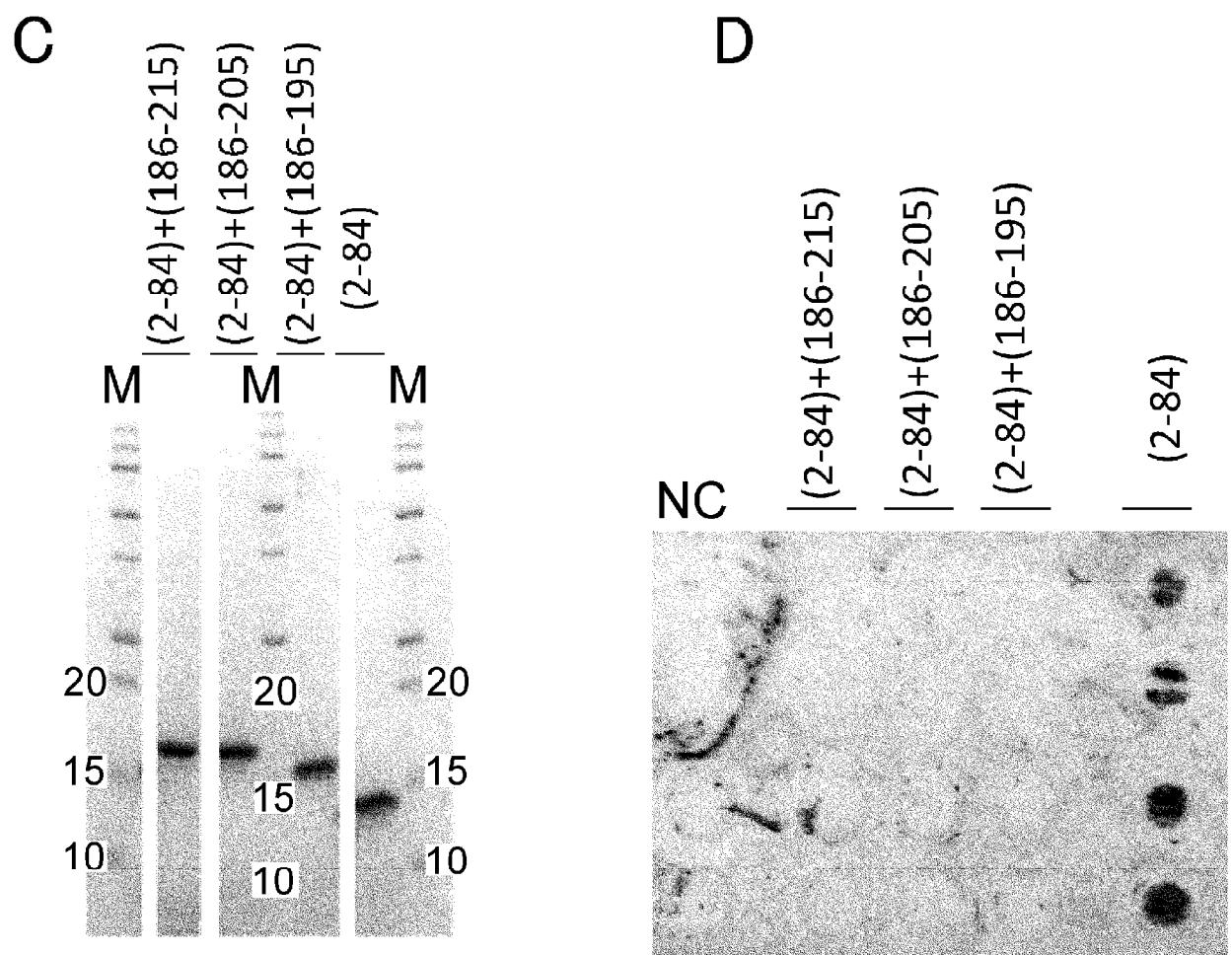


FIG. 21-2

Una semana después

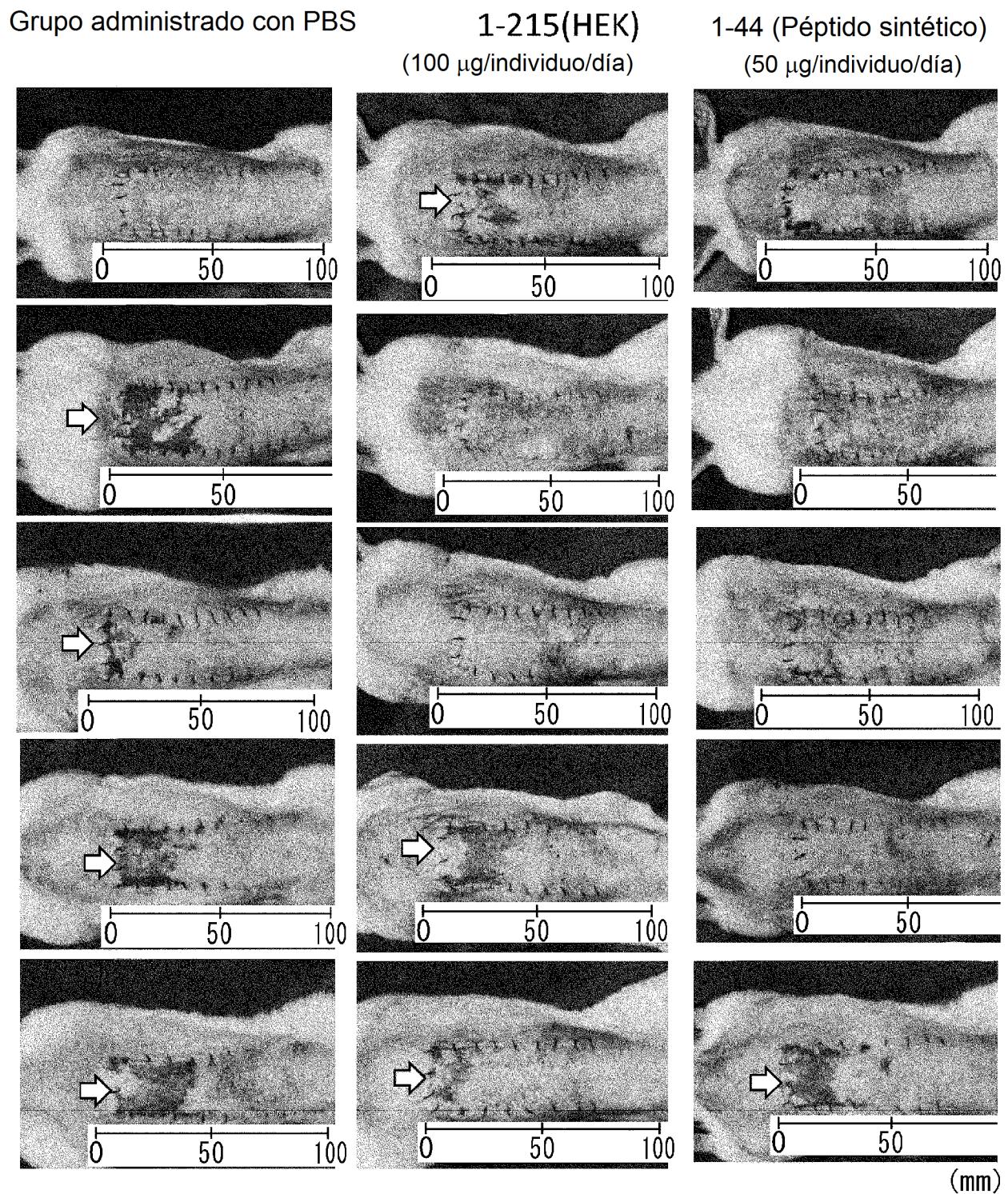


FIG. 22

## Cinco semanas después

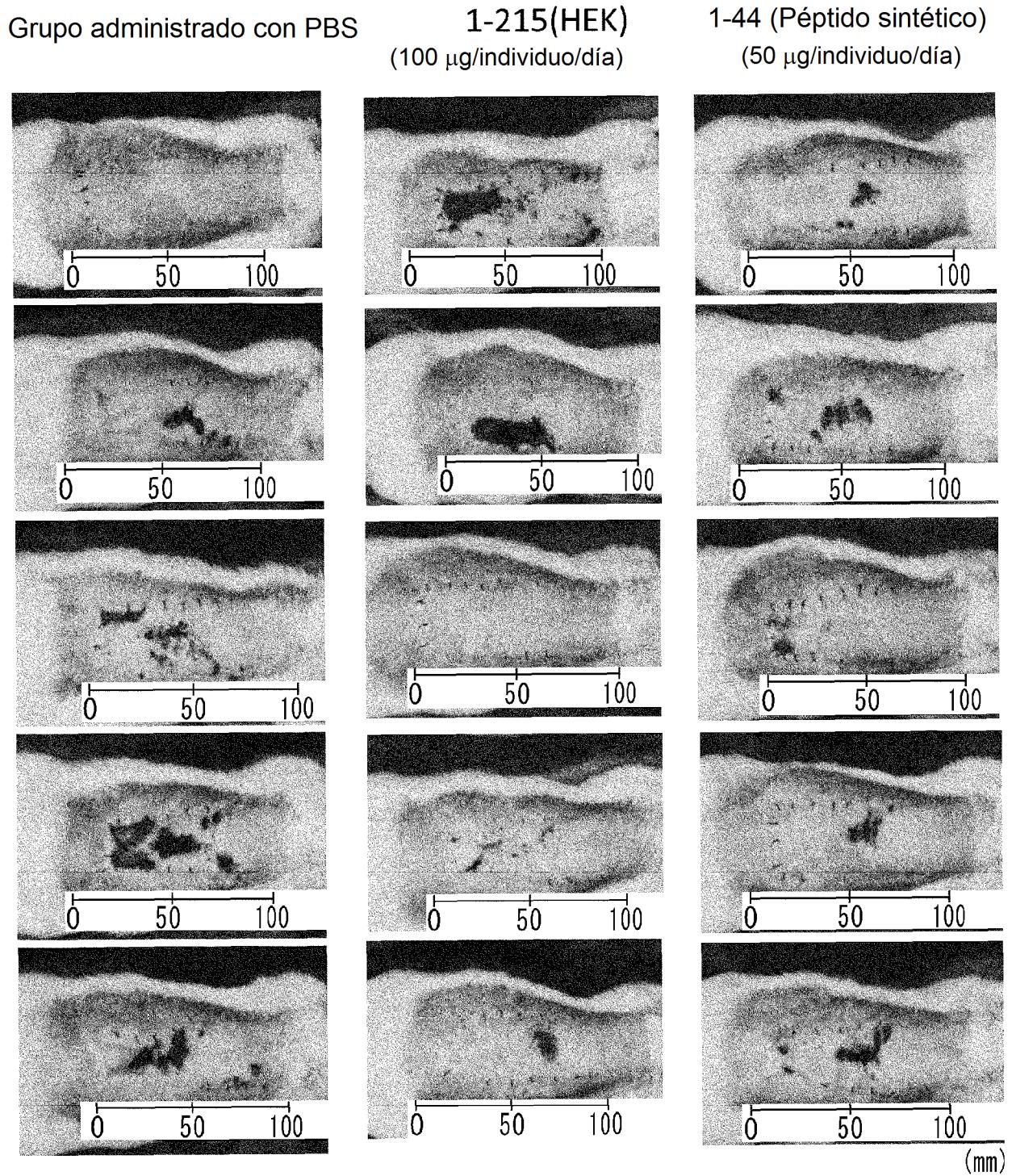


FIG. 23

## Siete semanas después

Grupo administrado con PBS

1-215(HEK)  
(100 µg/individuo/día)

1-44 (Péptido sintético)  
(50 µg/individuo/día)

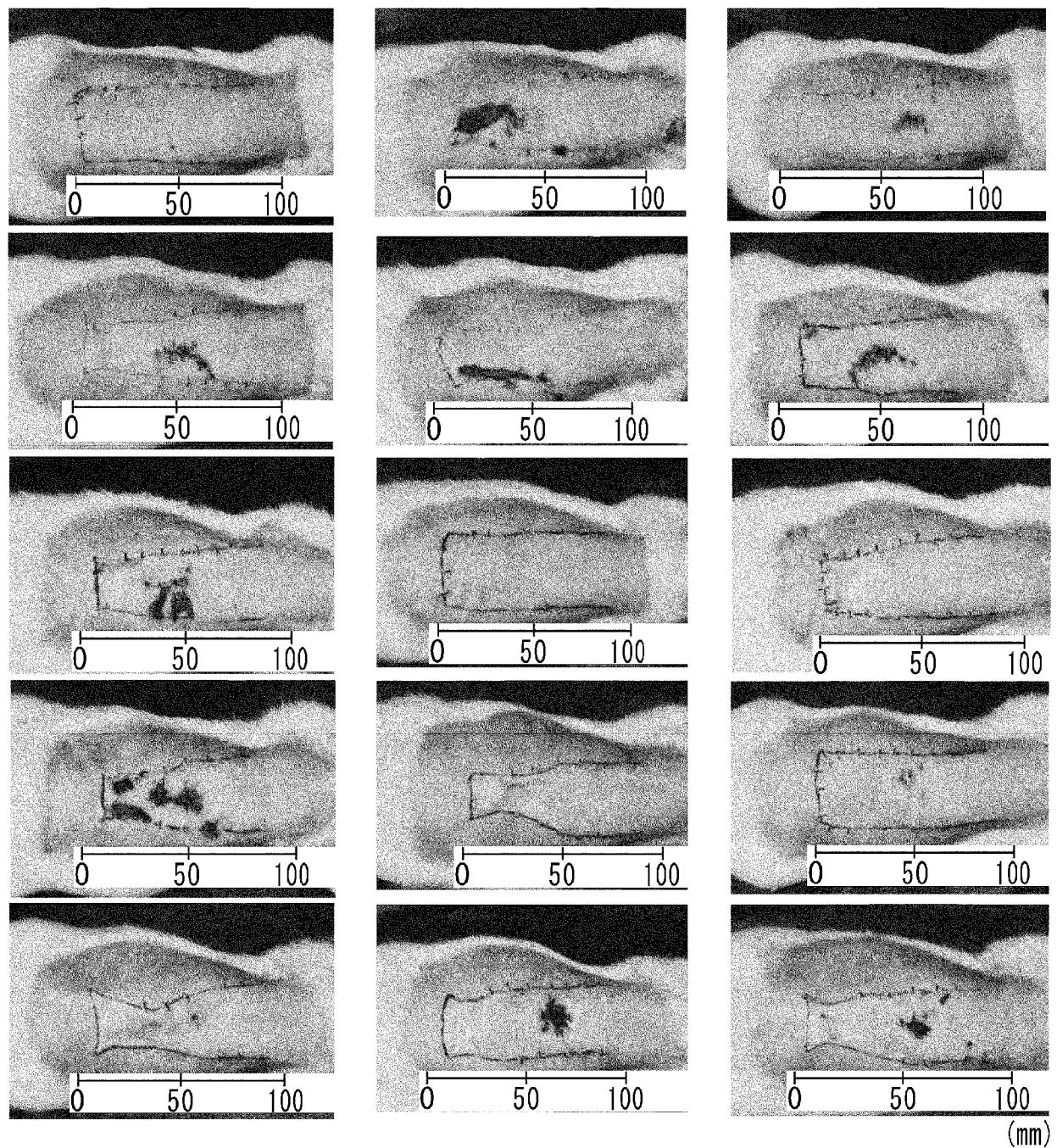


FIG. 24

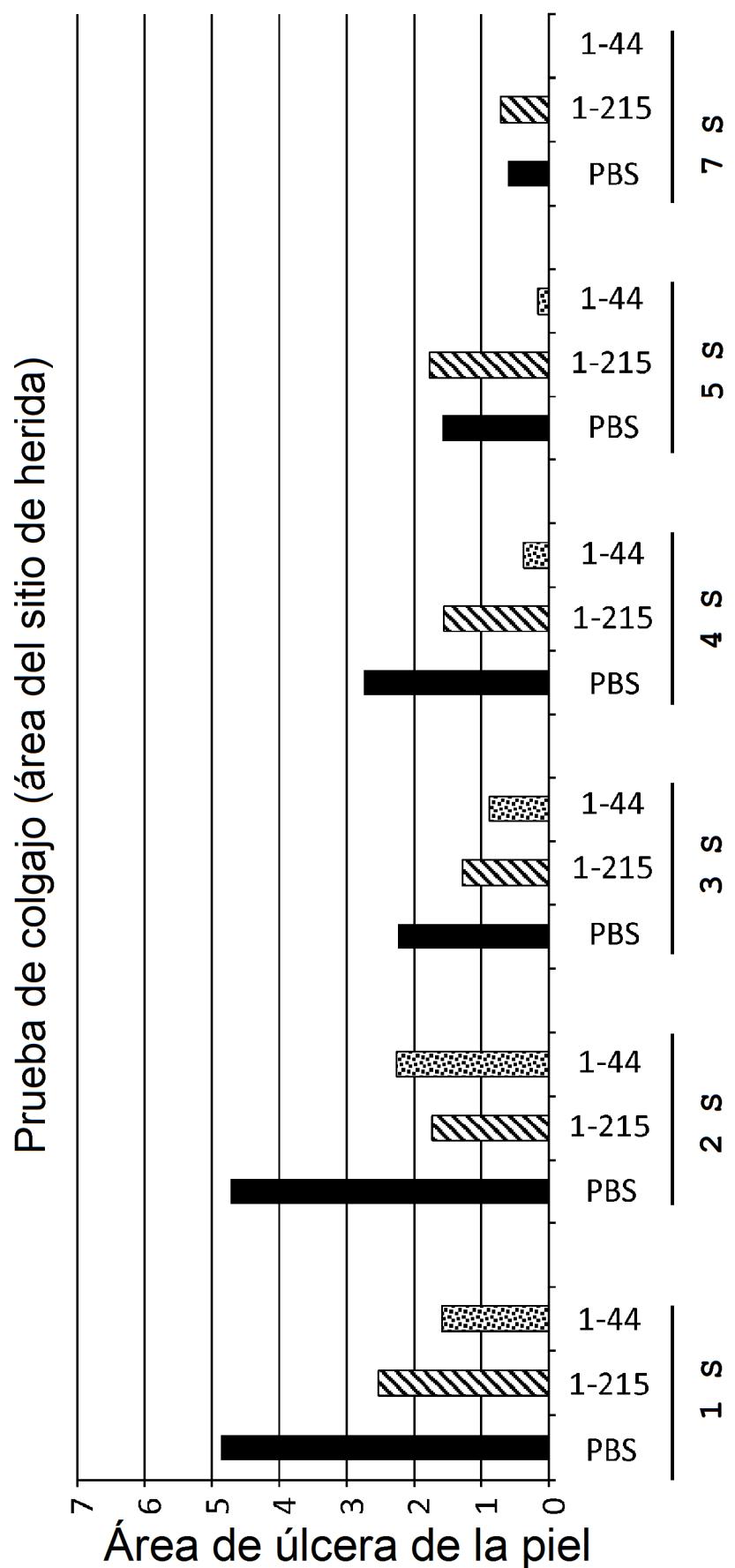


FIG. 25

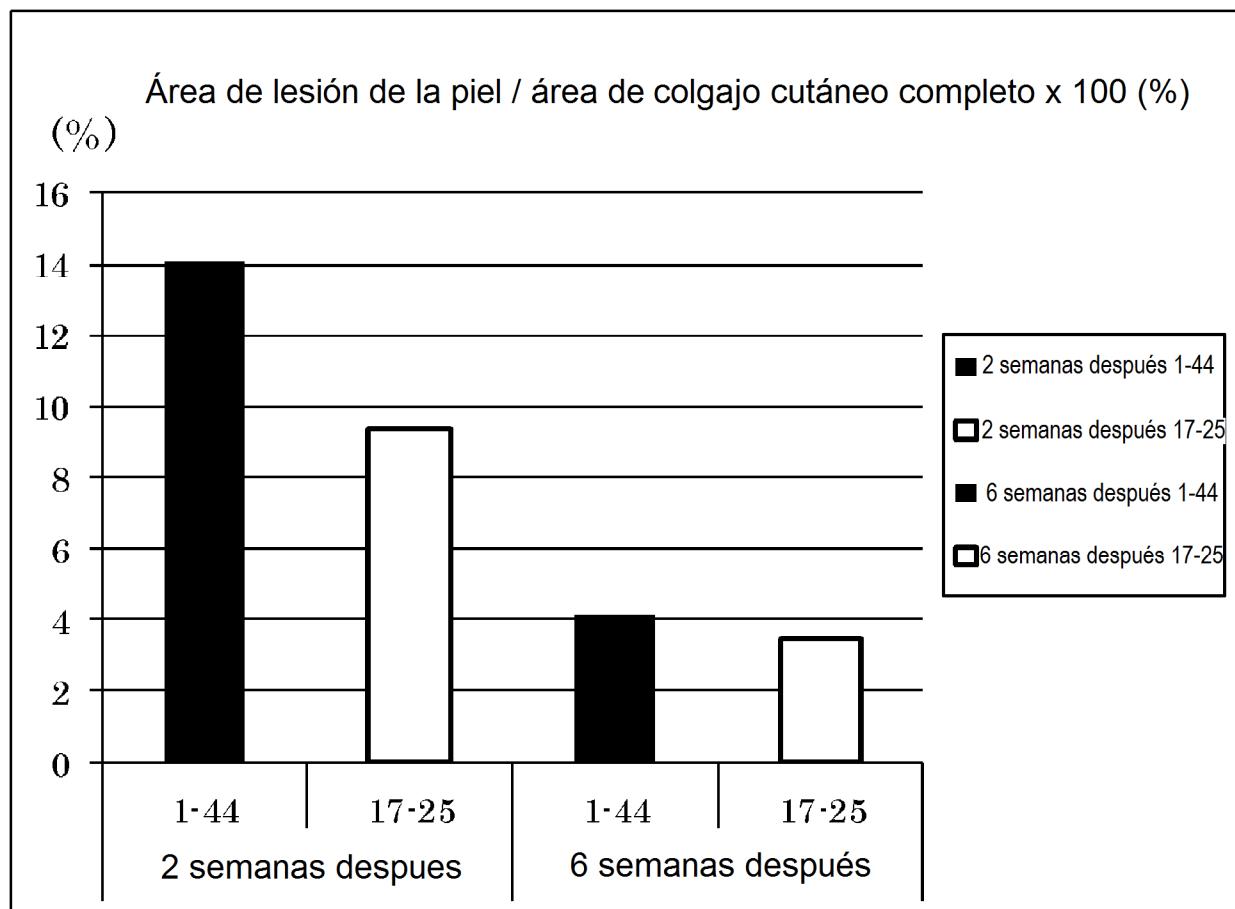


FIG. 26