

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 500**

51 Int. Cl.:

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2013** **PCT/EP2013/065829**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014** **WO14016417**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2013** **E 13740316 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2877248**

54 Título: **Variantes de HMGB1 y sus usos**

30 Prioridad:

26.07.2012 US 201261676071 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

73 Titular/es:

OSPEDALE SAN RAFFAELE S.R.L. (50.0%)
Via Olgettina 60
20132 Milano, IT y
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO -
BICOCCA (50.0%)

72 Inventor/es:

BIANCHI, MARCO EMILIO;
CASALGRANDI, MAURA;
VENEREAU, EMILIE JOELLE y
BRUNELLI, SILVIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 661 500 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

Variantes de HMGB1 y sus usos

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a variantes de HMGB1 que mantienen la función quimioatrayente de HMGB1 de tipo salvaje a la vez que muestran una anulación de las propiedades estimuladoras de citoquina y/o quimioquina. Tales moléculas son útiles en terapia.

Técnica anterior

- 10 La lesión puede desencadenar una respuesta inflamatoria aguda, incluso en ausencia de infección concomitante. La inflamación "estéril" también está asociada a varios tipos de cáncer. Dos eventos son clave para el desarrollo de la inflamación estéril: el reclutamiento de leucocitos, especialmente neutrófilos y monocitos, y su activación para liberar citoquinas proinflamatorias.

- 15 El Grupo de Alta Movilidad Box 1 (HMGB1) es una proteína nuclear que señala el daño tisular cuando se libera en el medio extracelular, y por lo tanto funciona como un Patrón Molecular Asociado a Daños (DAMP) (1). La HMGB1 extracelular puede actuar como un quimioatrayente para los leucocitos y como un mediador proinflamatorio para inducir la liberación de TNF, IL-1, IL-6 y otras citoquinas por los leucocitos reclutados y las células inmunitarias residentes. Notablemente, las células inmunitarias secretan HMGB1 cuando se activan por infección o daño tisular (2); el mesotelioma y otras células cancerosas secretan HMGB1 constitutivamente (Jube et al., 2012).

- 20 Estudios recientes han demostrado que la actividad estimuladora de citoquinas proinflamatorias de HMGB1 depende del estado redox de 3 cisteínas: C23 y C45 deben formar un enlace disulfuro dentro del primer dominio HMG-box de HMGB1, BoxA, mientras que la C106 no emparejada dentro de BoxB debe estar en estado de tiol (3-5). Tanto la oxidación terminal de estas cisteínas a sulfonatos (CySO_3^-) con especies reactivas de oxígeno (ROS) como su completa reducción a tioles (CySH) anulan la actividad estimuladora de las citoquinas.

El documento EP 2 068 935 describe productos conjugados poliméricos de HMGB1 y variantes de HMGB1, tales polímeros son resistentes a la proteólisis.

- 25 Hoppe et al. (Exp. Cell Res. 2006), 312(18):3526-3538) describen un mutante triple de HMGB1 en el que los tres residuos de Cys de las posiciones 23, 45 y 106 son remplazados por Ser. Tang D. et al. (Antioxid Redox Signal (2010), 14(7):1315-1335) describen que HMGB1 es una proteína sensible a redox y contiene tres Cys (C23, 45 y 106). También describen las propiedades de remplazo de Cys23 y Cys45 por Ser y también un mutante triple C23S + C45S + C106S. Kang R. et al. (Cell Death and Differentiation (2011), 18(4):571-580) describen mutantes sencillos C23S, C45S y C106S y muestran que la oxidación de HMGB1 regula su localización y capacidad para mantener la autofagia. El documento WO 2004/004763 describe el uso de HMGB1 en el tratamiento del daño tisular y para promover la reparación y regeneración de tejidos, a saber músculo cardíaco y esquelético.

- 30 Vezzoli M. et al. (Annals NY Acad. Sci. (2010), 1209(1):83-90) describen un sistema de remodelación redox para HMGB1 que tiene papeles biológicos contrapuestos que induce la inflamación que causa el daño tisular, a la vez que activa y recluta células madre que promueve la reparación tisular.

Existe la necesidad de variantes de HMGB1 que mantengan las propiedades quimioatrayentes pero no induzcan la producción de citoquina/quimioquina. Tales variantes se pueden utilizar para promover la reparación y regeneración del tejido.

Compendio de la invención

- 40 Los autores de la presente invención encontraron sorprendentemente que las variantes de HMGB1 en las que al menos una cisteína está sustituida por otro aminoácido pueden reclutar células móviles. Dado que los estados disulfuro y tiol de las cisteínas son mutuamente excluyentes, las actividades estimuladoras de citoquinas y quimiotácticas de HMGB1 también deberían ser mutuamente excluyentes, que es lo que los autores muestran experimentalmente. La HMGB1 oxidada terminalmente a sulfonato no tiene actividad ni como quimioatrayente ni en la estimulación de citoquinas. La sustitución de las 3 cisteínas por serinas hace que HMGB1 no sea oxidable, evitando así tanto su actividad estimuladora de citoquinas como su eventual inactivación, pero conservando la actividad quimioatrayente. La HMGB1 no oxidable, que no puede desencadenar la inflamación, tiene propiedades favorables en el reclutamiento de macrófagos que regeneran los tejidos, y en el fomento del reclutamiento de células madre residentes de músculo. Inesperadamente, sin embargo, la HMGB1 no oxidable también limita la muerte celular en el tejido después del daño. Todas estas propiedades hacen que la HMGB1 no oxidable sea una herramienta prometedora para limitar el daño tisular después de las lesiones y promover la cicatrización.

El daño tisular causa inflamación al reclutar leucocitos y activarlos para liberar mediadores proinflamatorios. Los autores muestran que la proteína del Grupo de Alta Movilidad Box 1 (HMGB1 humana, SEQ ID NO: 1)

mgkgdpkkpr gkmssyaffv qtcreehkkk hpdasvnfse fskkcserwk
tmsakekgkf edmakadkar yeremktyip pkgetkkkfk dpnapkrpps
afflfcseyr pkikgehppl sigdvakklg emwnntaadd kqpyekkaak
lkeyekdia ayrakgkpa akkgvvkaek skkkkeeeed eedeedeede
edeedeede ddddd

orquesta ambos procesos cambiando entre estados redox mutuamente excluyentes. Las cisteínas reducidas hacen que HMGB1 sea un quimioatrayente, mientras que un enlace disulfuro lo convierte en una citoquina proinflamatoria y adicionalmente la oxidación de cisteína a sulfonatos por parte de las especies reactivas de oxígeno anula ambas actividades. Los autores muestran que el reclutamiento y la activación de los leucocitos se pueden separar. Un mutante de HMGB1 no oxidable en el que las serinas reemplazan todas las cisteínas (3S-HMGB1) no promueve la producción de citoquinas, pero es más eficaz que HMGB1 de tipo salvaje en el reclutamiento de leucocitos *in vivo*. BoxA, un inhibidor de HMGB1, interfiere en el reclutamiento de leucocitos pero no en la activación. Los autores detectaron las diferentes formas redox de HMGB1 *ex vivo* en el músculo lesionado. HMGB1 se reduce completamente al principio y se une a disulfuro después. Así, HMGB1 orquesta ambos eventos clave en la inflamación estéril, el reclutamiento de leucocitos y su inducción para secretar citoquinas inflamatorias, adoptando estados redox mutuamente excluyentes.

En la presente invención, los autores han investigado cómo impactan los diferentes estados redox de HMGB1 en sus actividades quimiotácticas. Sorprendentemente, encontraron que:

- solamente la forma completamente reducida de HMGB1, en donde las 3 cisteínas están en estado de tiol, pueden atraer células móviles; esta forma es totalmente inactiva en la estimulación de la secreción de citoquinas;
- las actividades estimuladoras de citoquinas y quimiotácticas de HMGB1 son mutuamente excluyentes;
- HMGB1 oxidada terminalmente (es decir HMGB1 en la que al menos una cisteína está oxidada a sulfonato) no tiene actividad como quimioatrayente o en la estimulación de citoquinas.

- se requieren cisteínas para la actividad estimuladora de citoquinas, pero no se requiere ninguna para la función quimioatrayente de HMGB1.

Para estudiar la participación de las cisteínas individuales en las actividades estimuladoras de citoquinas y quimiotácticas de HMGB1, los autores las reemplazaron por residuos de serina y generaron mutantes:

#1S-HMGB1 (donde C23 o C45 o C106 son reemplazados por una serina),

#2S-HMGB1 (donde tanto C23 como C45 o tanto C45 como C106 son reemplazados),

#3S-HMGB1 (donde se reemplazan las tres cisteínas).

La actividad de los mutantes anteriores, se ha sometido a ensayo en fibroblastos y macrófagos. Todos indujeron la migración de fibroblastos, pero no la expresión de citoquinas/quimioquinas por los macrófagos.

Además, se ha observado que los mutantes 2S y 3S mostraban la misma actividad quimiotáctica, estén expuestos a DTT o no (como se esperaba, ya que no existe un enlace disulfuro que se pueda reducir) y el tratamiento con H₂O₂ inhibió la migración celular en respuesta a todos los mutantes de HMGB1, con la excepción del mutante 3S que no tiene una cisteína que se pueda oxidar terminalmente. En general, los resultados indican que:

- Se requiere un enlace disulfuro C23-C45 para la actividad proinflamatoria, pero interrumpe la actividad quimiotáctica de HMGB1;

- Cada uno de C23, C45 y C106 es esencial para la actividad proinflamatoria, pero su sustitución conservativa por otro residuo tal como la serina preserva la actividad quimiotáctica.

Por lo tanto, el mutante 3S puede promover el reclutamiento celular pero no puede inducir la liberación de mediadores proinflamatorios, incluso en condiciones oxidativas y el mutante 3S no se puede inactivar por oxidación.

Los autores demostraron que todas las cisteínas deben ser reducidas para la actividad quimioatrayente de HMGB1. Por lo tanto, las actividades estimuladoras de citoquinas y quimiotácticas de HMGB1 son mutuamente excluyentes. Cuando las cisteínas se oxidan a sulfonatos (es decir, se oxidan terminalmente), HMGB1 es inactiva como quimioatrayente y como citoquina proinflamatoria. Las diferentes formas redox de HMGB1 se detectan *ex vivo* e *in vivo* en un modelo de lesión muscular. Los autores reemplazaron las cisteínas HMGB1 por serinas y demostraron que ninguna de las cisteínas es esencial para la función quimioatrayente de HMGB1. El mutante 3S, en el que todas

las cisteínas se reemplazan por serinas, induce el reclutamiento de células, pero no la producción de citoquinas, y es resistente a la inactivación por oxidación. Por lo tanto, los presentes mutantes de HMGB1 se pueden utilizar como agentes terapéuticos para favorecer la regeneración tisular. Son particularmente adecuados ya que pueden reclutar células inflamatorias sin activarlas a un estado pro-inflamatorio.

- 5 Por lo tanto, un objeto de la invención es una variante de HMGB1 caracterizada porque es un quimioatrayente de células y no estimula la producción de citoquinas y/o quimioquinas a partir de una célula, derivados y fragmentos de la misma para su uso en un método de inducción de la regeneración de tejidos, en donde dicha variante de HMGB1 consiste en SEQ ID NO. 1 en el que los residuos de cisteína localizados en las posiciones 23, 45 o 106 son reemplazados cada uno por un residuo de aminoácido que contiene el mismo número de átomos de carbono que la cisteína, en donde los derivados tienen un porcentaje de identidad de al menos 85% con SEQ ID NO: 1 y en donde los fragmentos tienen una longitud de al menos 84 aminoácidos, siendo dichos derivados y fragmentos quimioatrayentes celulares, y no estimulan la producción de citoquinas y/o quimioquinas a partir de una célula y comprenden cada uno de los residuos de cisteína localizados en las posiciones 23, 45 o 106 de SEQ ID NO: 1 reemplazados por un residuo de aminoácido que contiene el mismo número de átomos de carbono que la cisteína.
- 10
- 15 Preferiblemente, los tres residuos de cisteína se reemplazan cada uno por residuos de serina.

Un objeto adicional de la invención es una composición farmacéutica para su uso en un método de inducción de regeneración de tejidos que comprende diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables y un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

- la variante de HMGB1 o los derivados y fragmentos de la misma se definen como antes;

- 20 - un polinucleótido que codifica dicha variante de HMGB1 o derivados y fragmentos de la misma se definen como antes;
- un vector que comprende dicho polinucleótido y
- una célula anfitriona modificada genéticamente que expresa dicho polipéptido.

- 25 Un objeto adicional de la invención es la variante de HMGB1 o derivados o fragmentos de la misma definida como antes o una composición farmacéutica definida como antes para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una patología que requiere regeneración de tejido y/o músculo, en particular la recuperación de heridas, fracturas y trauma físico, isquemia, infarto y recuperación del mismo de diferentes tejidos y/u órganos.

El tejido puede ser tejido blando o duro, incluyendo el cerebro.

- 30 Un objeto adicional de la invención es la variante de HMGB1 o derivados y fragmentos de la misma definidos como antes o la composición farmacéutica definida como antes para su uso en la prevención y/o reparación de la lesión del músculo y/o el hueso y/o el cartílago y/o tejido blando tal como el cerebro, preferiblemente la lesión es inducida por necrosis, preferiblemente la lesión del hueso es consiguiente a una fractura.

Preferiblemente el músculo es músculo esquelético o cardíaco.

- 35 En la presente invención, una patología que requiere regeneración tisular comprende la recuperación de heridas, fracturas y trauma físico, una patología o recuperación que afecta especialmente, pero sin limitación, al cerebro, músculo, hueso, tendón, vasos y piel, y la isquemia de diversos tejidos y órganos, incluyendo, pero no limitados a, corazón y cerebro, o la recuperación de la isquemia de diversos tejidos y órganos como se indicó anteriormente.

- 40 Las variantes de HMGB1 de la presente descripción, obtenidas por tecnologías conocidas en la técnica, son proteínas mutantes, que difieren de la secuencia de aminoácidos de HMGB1 de tipo salvaje mediante la mutación de uno o más aminoácidos individuales. En un aspecto de la presente descripción, solo se produce una sustitución de aminoácidos en la secuencia de la proteína nativa. Sin embargo, se incluye que la proteína nativa pueda ser optimizada adicionalmente mediante el reemplazo de una pluralidad, por ejemplo, dos o más, de reemplazos de aminoácidos. Por lo tanto, las variantes pueden diferir de la secuencia de la proteína de tipo salvaje mediante sustituciones de aminoácidos en 1-10, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 y 6 posiciones diana de aminoácidos diferentes.

- 45 Por otra parte, los mutantes de la invención muestran una función quimioatrayente y no muestran propiedades estimuladoras de citoquinas/quimioquinas.

- 50 En la presente invención, una variante de HMGB1 que no estimula la producción de citoquinas y/o quimioquinas de una célula es una proteína que no induce la expresión de citoquinas/quimioquinas (por ejemplo, analizada mediante PCR en tiempo real) por células tales como macrófagos humanos. La proteína no induce la producción o expresión de al menos IL-6, IL-8 y TNF α .

En particular, la función quimioatrayente en un modelo animal es prolongada, y por lo tanto más eficaz, porque las serinas no se pueden oxidar, y por lo tanto, la HMGB1 mutante no puede ser inactivada por especies de oxígeno reactivas. La función quimioatrayente se midió como se indica en la sección de método. Otros métodos para medir la

quimiotaxis se describen en la técnica y son adecuados.

En el contexto de la presente descripción, cuando se hace referencia al término "HMGB1 o la secuencia de aminoácidos de HMGB1", se hace referencia tanto a HMGB1 humana como no humana. En un aspecto preferido, la HMGB1 deriva del tipo salvaje de la proteína HMGB1 humana y de la proteína HMGB1 de rata de tipo salvaje.

- 5 Los términos "mutación" o "variante" según se utilizan en el contexto de la presente invención se pueden entender como sustitución, delección y/o adición de un único aminoácido en la secuencia diana. Preferiblemente, la mutación de la secuencia diana en la presente invención es una sustitución. La sustitución se puede producir con diferentes aminoácidos codificados genéticamente o con aminoácidos no codificados genéticamente. Los ejemplos de aminoácidos no codificados genéticamente son homocisteína, hidroxiprolina, omitina, hidroxilisina, citrulina, carnitina, etc.

Un aspecto adicional de la presente descripción es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos uno de la variante de HMGB1 o un fragmento biológicamente activo de la misma como ingrediente activo. La composición farmacéutica de la presente descripción se puede utilizar para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas.

- 15 La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista de las condiciones del paciente. La administración se puede lograr en una sola dosis o dosis repetidas a intervalos. La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar el efecto terapéutico, lo que da como resultado la mejora de los síntomas o la prolongación de la supervivencia en un paciente. La cantidad real de composición administrada dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar, del peso del sujeto, de la gravedad de la afección, de la forma de administración y del juicio del médico que prescribe. Una dosificación diaria adecuada estará entre 0,001 y 10 mg/kg, particularmente entre 0,1 y 5 mg/kg. La administración se puede llevar a cabo por medio de métodos conocidos, p. ej., por medio de inyección, en particular por inyección intravenosa, intramuscular, transmucosa, subcutánea o intraperitoneal y/o por aplicación oral, tópica, nasal, inhalación, aerosol y/o rectal, etc. La administración puede ser local o sistémica. Además, las variantes HMGB1
- 20 objeto de esta invención se pueden inmovilizar y/o adsorber reversiblemente sobre la superficie y/o dentro de dispositivos médicos o sistemas de liberación de fármacos/vehículo (microesferas). Los dispositivos médicos y las microesferas se pueden cargar reversiblemente con las variantes de esta invención, a través de su unión, impregnación y/o adsorción sobre la superficie del dispositivo médico o de la microesfera o sobre una capa que recubre su superficie. Cuando el dispositivo médico o la microesfera entran en contacto con fluidos biológicos, se libera la variante inmovilizada de forma reversible. Por lo tanto, el dispositivo médico y la microesfera actúan como herramientas liberadoras de fármacos que hacen eluir la molécula objeto de esta invención de tal manera que su cinética de liberación se pueda controlar, garantizando una liberación controlada o sostenida, según lo requiera el tratamiento. Los métodos para recubrir/impregnar los dispositivos médicos y para cargar las microesferas son bien conocidos por los expertos en estas tecnologías.

- 35 Según se utiliza en la presente memoria, se entenderá que el término "equivalente" significa un péptido que tiene al menos una de las actividades del presente polipéptido. Se entenderá que "homólogo" es polipéptido que muestra ciertas modificaciones en comparación con el polipéptido natural. Estas modificaciones pueden ser una delección, un truncamiento, una extensión, una fusión quimérica y/o una mutación. Entre los polipéptidos equivalentes, se prefieren aquellos que muestran más de 80% de homología.

- 40 "Derivado" se refiere a cualquier polipéptido, eventualmente mutado, truncado y/o extendido, que se ha modificado químicamente o contiene aminoácidos inusuales. Un derivado preferido es un derivado en el que se elimina la cola ácida (últimos 30 aminoácidos de HMGB1).

Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos que tiene propiedades de quimiotaxis pero que no estimula la producción de citoquina y/o quimioquina de una célula. Este polipéptido, si se requiere, se puede modificar in vitro y/o in vivo, por ejemplo mediante glicosilación, miristoilación, amidación, carboxilación o fosforilación, y se puede obtener, por ejemplo, mediante mecanismos sintéticos o recombinantes conocidos en la técnica.

- Según se utiliza en la presente memoria, el término "ortólogos" se refiere a proteínas de especies diferentes a las proteínas de SEQ ID NO: 1 en *Homo sapiens* que evolucionaron a partir de un gen ancestral común por especiación. Como ejemplo de tales ortólogos, se pueden citar las proteínas correspondientes a HMGB1 en *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* y *Danio rerio*.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "derivados" se refiere a polipéptidos que tienen un porcentaje de identidad de al menos 75% con SEQ ID NO: 1, o un ortólogo del mismo, preferiblemente de al menos 85%, como un ejemplo de al menos 90%, y más preferiblemente de al menos 95%.

- 55 Según se utiliza en la presente memoria, "fragmentos" se refiere a polipéptidos que tienen una longitud de al menos 25 aminoácidos, preferiblemente al menos 50 aminoácidos, como un ejemplo al menos 75 u 85 aminoácidos, y más preferiblemente al menos 100 aminoácidos. En la presente invención, todos los fragmentos y derivados poseen propiedades quimioatrayentes pero no inducen la producción de citoquinas y/o quimioquinas, en

particular IL-6, IL-8 y TNF α .

Según se utiliza en la presente memoria, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos significa el porcentaje de aminoácidos idénticos, entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenido con la mejor alineamiento de dichas secuencias, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre estas dos secuencias se distribuyen aleatoriamente a lo largo de las secuencias de aminoácidos. Según se utiliza en la presente memoria, "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo" significa el alineamiento para el cual el porcentaje de identidad determinado (véase a continuación) es el más alto. La comparación de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se realiza generalmente comparando estas secuencias que se han alineado previamente de acuerdo con el mejor alineamiento; esta comparación se realiza sobre segmentos de comparación para identificar y comparar las regiones locales de similitud. El mejor alineamiento de secuencias para realizar la comparación se puede realizar, además de mediante una forma manual, utilizando el algoritmo de homología global desarrollado por SMITH y WATERMAN (Ad. App. Math., Volumen 2, pág: 482, 1981), utilizando el algoritmo de homología local desarrollado por NEDDLEMAN y WUNSCH (J. Mol. Biol, volumen 48, pág: 443, 1970), utilizando el método de similitudes desarrollado por PEARSON y LIPMAN (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, pág: 2444, 1988), utilizando programas informáticos que utilizan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA del paquete de soporte lógico de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI. USA), utilizando los algoritmos de alineamiento múltiple MUSCLE (Edgar, Robert C, Nucleic Acids Research, volumen 32, pág: 1792, 2004). Para obtener el mejor alineamiento local, preferiblemente se puede utilizar el soporte lógico BLAST, con la matriz BLOSUM 62, o la matriz PAM 30. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas óptimamente, pudiendo las secuencias de aminoácidos comprender adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia con el fin de obtener el alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias, y dividiendo este número por el número total de posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen una reacción alérgica o similar adversa, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, según se utiliza en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerada en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Preferiblemente se emplean soluciones acuosas o salinas en solución acuosa y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores, particularmente para soluciones inyectables. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN, preferiblemente a ADN. Dicho ADN puede ser de hebra doble o de hebra sencilla.

Preferiblemente, el polinucleótido comprende la secuencia de 1S-HMGB1, 2S-HMGB1, 3S-HMGB1. Preferiblemente, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia de 1S-HMGB1, 2S-HMGB1, 3S-HMGB1.

El polinucleótido también puede incluir la secuencia codificante del polipéptido definido previamente, una secuencia codificante adicional tal como secuencia líder o una secuencia de propeptina, y/o una secuencia no codificante adicional, tal como intrones o secuencias UTR 5' y/o 3'.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a un vector de expresión, y puede ser, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Tales vectores pueden incluir plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de viruela aviar y pseudorrabia. Un gran número de vectores adecuados es conocido por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (QIAGEN), pbs, pDIO, Phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH1[beta]a, pNH18A, pNH46A (STRATAGENE), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (PHARMACIA). Eucarióticos: pWLNCO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (STRATAGENE), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (PHARMACIA). Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en el anfitrión. La secuencia de polinucleótidos, preferiblemente la secuencia de ADN vector, se une operativamente a una o varias secuencias de control de la expresión (promotoras) apropiadas para dirigir la síntesis de ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden citar promotores procarióticos o eucarióticos tales como temprano inmediato de CMV, timidina quinasa de HSV, temprano y tardío de SV40, LTR de retrovirus y metalotioneína-I de ratón. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción y un vector de transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

Además, los vectores contienen preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células anfitrionas transformadas tales como dihidro folato reductasa o resistencia a neomicina para el cultivo de células eucarióticas, o tales como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

- 5 Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula anfitriona modificada genéticamente" se refiere a células anfitrionas que se han transducido, transformado o transfectado con el polinucleótido o con el vector descrito anteriormente.

Como ejemplos representativos de células anfitrionas apropiadas, se pueden citar células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, células fúngicas tales como levadura, células de insecto tales como Sf9, células animales tales como CHO o COS, células vegetales, etc. Se considera que la selección de un anfitrión apropiado está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de este documento.

Preferiblemente, dicha célula anfitriona es una célula animal, y muy preferiblemente una célula humana.

15 La introducción del polinucleótido o del vector descritos anteriormente en la célula anfitriona se puede efectuar mediante un método bien conocido por un experto en la técnica, tal como la transfección con fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano o la electroporación.

La composición puede comprender uno o más aditivos (p.ej., estabilizadores, conservantes).

Véase, en general, Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª. Ed. (varios editores, 1989-1998, Marcel Dekker).

20 De acuerdo con la presente invención, una "cantidad eficaz" de una composición es aquella que es suficiente para lograr un efecto biológico deseado, en este caso inducir y/o promover la quimiotaxis o inducir la regeneración tisular. Se entiende que la dosificación eficaz dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si existe, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. No se pretende que los intervalos de dosis eficaces proporcionados a continuación limiten la invención y representen intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosificación preferida se puede adaptar al sujeto individual, tal como entiende y puede determinar un experto en la técnica, sin una experimentación excesiva. Dicho polipéptido, polinucleótido, vector y célula anfitriona se describen como antes.

La invención se ilustrará a continuación por medio de ejemplos no limitantes que se refieren a las siguientes figuras.

Figura 1. Caracterización de los estados redox de HMGB1. (A) Caracterización por espectrometría de masas de HMGB1 purificada con DTT (a1) o sin DTT (a2). Caracterización de C23: traza MS-MS del péptido que contiene los aminoácidos 13-24, con un aducto de yodoacetamida que indica C23 reducido (a1) o con un aducto de NEM después de la reducción con DTT de un enlace disulfuro (a2). Caracterización de C45: traza MS-MS del péptido que contiene los aminoácidos 45-48, con un aducto de yodoacetamida que indica C45 reducido (a1) o con un aducto de NEM después de la reducción con DTT de un enlace disulfuro (a2). Caracterización de C106: traza de MS-MS del péptido que contiene los aminoácidos 97-112 con un aducto de yodoacetamida que indica C106 reducido (a1); la traza de MS-MS de disulfuro-HMGB1 era idéntica y no se muestra. (B) Movilidad electroforética de HMGB1 recombinante preparada en presencia (+DTT) o ausencia (-DTT) de DTT. Las muestras se calentaron en presencia (+) o ausencia (-) de β -mercaptoetanol (β -me) 350 mM, se cargaron en un gel de SDS - PA al 12% y se revelaron mediante tinción de Coomassie (panel izquierdo) o mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo monoclonal (mAb) o policlonal (pAb) contra HMGB1 (panel derecho). (C) La translocación nuclear de p65-GFP (indicada con flechas de color blanco) se visualizó mediante microscopía confocal en fibroblastos embrionarios murinos vivos expuestos durante 30 min a disulfuro- o todo tiol-HMGB1 80 nM. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. (D) Los macrófagos humanos se expusieron durante 4 horas a 0,4 μ M de disulfuro- o todo-tiol-HMGB1. Los niveles de ARNm de TNF- α , IL-6 e IL-8 se midieron mediante PCR en tiempo real y se expresaron como la multiplicidad de aumento en comparación con los macrófagos no estimulados (*, $P < 0,05$, prueba t). Las barras de error representan la desviación típica. Los datos son representativos de 3 experimentos realizados con macrófagos de individuos sanos no relacionados.

Figura 2. Las actividades estimuladoras de citoquinas y quimioatrayentes de HMGB1 son mutuamente excluyentes. (A) Heterocomplejo HMGB1/CXCL12 detectado por ELISA híbrido. Se preincubaron todo-tiol- o disulfuro-HMGB1 (7,5 ng) con la cantidad indicada de CXCL12 a 37°C durante 15 minutos. La formación del heterocomplejo se detectó mediante ELISA híbrido (un anticuerpo de captura anti-CXCL12 y un anticuerpo de detección anti-HMGB1). Los resultados se expresan como la absorbancia a 450 nm (*, $P < 0,05$, ANOVA). (B) Migración de monocitos humanos en respuesta a concentraciones crecientes de CXCL12 en presencia o ausencia de todo-tiol- o disulfuro-HMGB1 300 nM (*, $P < 0,01$ frente a CXCL12 solo, ANOVA de 2 vías). (C) Migración de fibroblastos 3T3 de ratón hacia disulfuro-HMGB1 o todo-tiol-HMGB1, o disulfuro-HMGB1 expuestos a 5 mM de DTT durante 30 minutos (todo-tiol-HMGB1 de nueva aportación) (*, $P < 0,05$ frente a disulfuro HMGB1; ANOVA). (D) Migración de fibroblastos 3T3 hacia todo-tiol-HMGB1 en presencia de concentraciones crecientes de disulfuro-HMGB1, y expresión de TNF- α (en forma de multiplicidad de aumento en comparación con macrófagos no estimulados) en macrófagos humanos estimulados durante 4 horas con disulfuro-HMGB1 en presencia de

concentraciones crecientes de todo-tiol-HMGB1. Los efectos de la forma competitiva de HMGB1 no son estadísticamente significativos (ANOVA). **(E-F)** Migración de fibroblastos 3T3 de ratón hacia todo-tiol-HMGB1 wt previamente expuesto a concentraciones crecientes de H₂O₂ durante 1 hora **(E)** (*, $P < 0,05$ frente a todo-tiol-HMGB1 no tratado con H₂O₂, ANOVA), y hacia todo-tiol-HMGB1 wt o el mutante E106 (SEQ ID NO: 1 en el que C106 es remplazado por glutamina) purificado en presencia de DTT **(F)** (*, $P < 0,05$ frente a control no tratado). **(G)** Los macrófagos humanos se estimularon durante 4 horas con disulfuro-HMGB1 wt o el mutante E106 (0,4 μ M) preparado en ausencia de DTT. La expresión de TNF- α , MIP-2 e IL-8 se midió mediante PCR en tiempo real y se expresó como la multiplicidad de incremento en comparación con los macrófagos no estimulados (*, $P < 0,05$ frente a disulfuro-HMGB1; prueba t). En todos los paneles, los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes y las barras representan la media $\pm$ DT de las muestras por triplicado (cuando no son visibles, caen dentro de los símbolos)

Figura 3. BoxA y el anticuerpo monoclonal DPH1.1 previenen la migración de células inducida por HMGB1 pero no la expresión de citoquinas. **(A,C)** Migración de fibroblastos 3T3 de ratón hacia todo-tiol-HMGB1 wt en presencia o no de BoxA **(A)** o fragmentos F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal anti-HMGB1 DPH1.1 **(C)**. **(B,D)** Los macrófagos humanos se estimularon durante 4 horas con disulfuro-HMGB1 (0,4 μ M) en presencia de BoxA **(B)** o fragmentos F(ab')₂ de DPH1.1 **(D)**. La expresión de TNF- α se midió mediante PCR en tiempo real y se expresó como la multiplicidad de aumento en comparación con los macrófagos no estimulados. En todos los paneles, los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes y las barras representan la media $\pm$ DT de las muestras por triplicado (*, $P < 0,05$ frente a control; ANOVA).

Figura 4. Las cisteínas de HMGB1 son esenciales para promover la producción de citoquinas/quimioquinas, pero no para la quimiotaxis. **(A)** Movilidad electroforética de HMGB1 wt recombinante y mutantes preparados en ausencia de DTT, determinada como se describe en la leyenda de la Fig. 1B. **(B)** Se estimularon macrófagos humanos durante 4 horas con mutantes o HMGB1 wt preparada en ausencia de DTT (0,4 μ M). La expresión de TNF- α se midió mediante PCR en tiempo real (*, $P < 0,05$ frente a control, ANOVA). **(C-D)** Migración de fibroblastos 3T3 hacia mutantes HMGB1 1 nM, expuestos o no durante 1 hora a DTT 5 mM **(C)** o a H₂O₂ 100 mM **(D)**. Las barras representan la media $\pm$ DT de muestras por triplicado (*, $P < 0,05$ frente a control, ANOVA).

Figura 5. La oxidación modula las actividades de HMGB1 *in vivo*. **(A)** Movilidad electroforética de HMGB1 de los músculos tibiales anteriores recogidos en los tiempos indicados (2, 6, 24 y 72 h) después de la inyección de cardiotoxina (CTX). Las muestras se calentaron en presencia (+) o ausencia (-) de β -mercaptoetanol (β -me) 350 mM, se cargaron en un gel de SDS - PA al 12% y se revelaron mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo policlonal contra HMGB1. El producto lisado total del músculo tibial anterior se añadió como control (L). **(B-D)** 3S-HMGB1 induce el reclutamiento de leucocitos *in vivo*. Se creó una bolsa de aire en ratones mediante inyección dorsal subcutánea de aire. El día 6, se inyectaron en las bolsas de aire 200 μ l de PBS que contenía 10 pmoles de CXCL12, 300 pmoles de HMGB1 (wt o 3S) o ambos. **(C)** Alternativamente, se inyectaron 200 μ l de PBS que contenía o no 1 o 10 nmoles de HMGB1 (wt o 3S) en las bolsas de aire **(C)** o 1 nmol de HMGB1 (wt o 3S) en ausencia o presencia de N-acetilcisteína (NAC) (100 nmoles/g) **(D)**. Después de 6 horas, las células se recogieron de las bolsas de aire, se tiñeron con anticuerpos anti-Ly6C y anti-CD11b y se analizaron mediante citometría de flujo (GB, glóbulos blancos) (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$, ANOVA más la prueba post-hoc de Dunnett).

Figura 6. HMGB1 induce el reclutamiento de macrófagos M2 y células satélite *in vivo* en un modelo de lesión muscular aguda. Se realizó una lesión muscular en el tibial anterior (TA) de C57BL/6 de 8 semanas de edad al inyectar 50 μ l de cardiotoxina (CTX) 15 μ M en presencia o no de 150 μ g de HMGB1 (wt o 3S) (tres animales por grupo). Los ratones se sacrificaron 2 o 5 días después de la inyección de CTX, y los músculos TA se disecaron y se congelaron en isopentano enfriado con N₂ líquido. **(A)** Tinción de inmunofluorescencia de macrófagos M2c (CD163, color rojo) en secciones de músculos TA 2 días después de la inyección intramuscular de cardiotoxina y HMGB1 (wt o 3S). **(a1)** Tinción de inmunofluorescencia de células satélite (Pax 7, color verde) en secciones de músculos TA 5 días después de la inyección intramuscular de cardiotoxina y HMGB1 (wt o 3S). **(a2)** **(B)** Cuantificación de macrófagos M2 (panel superior) y células satélite (panel inferior) realizada en 20 secciones aleatorias por muestra. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Figura 7. HMGB1 induce la migración de mioblastos *in vitro*. Migración de células C2C12 miogénicas hacia HMGB1 wt o 3S (1 μ M) en cámaras Boyden modificadas (***, $P < 0,001$ frente a control; ANOVA). Suero Bovino Fetal (FBS) como control positivo.

Figura 8. Preservación de la estructura muscular por HMGB1 después de una lesión muscular aguda. La lesión muscular se realizó en el tibial anterior (TA) de C57BL/6 de 8 semanas de edad al inyectar 50 μ l de CTX 10 μ M en presencia o no de 150 μ g de HMGB1 (wt o 3S) (tres animales por grupo). Las secciones representativas de los músculos TA de los ratones tratados y no tratados se tiñeron con hematoxilina y eosina 2 días después de la lesión por CTX.

Figura 9. Los mutantes HMGB1 inducen la migración celular, pero no la producción de citoquina/quimioquina. **(A)** Migración de fibroblastos 3T3 hacia HMGB1 1 nM wt o mutantes (C23S, C45S) expuestos o no durante 1 hora a DTT 5 mM. Las barras representan la media $\pm$ DT de muestras por triplicado (*, $P < 0,05$ frente a control, ANOVA). **(B-C)** Se estimularon macrófagos humanos durante 4 horas con HMGB1 wt o

mutantes C23S y C45S (**B**) o C23-45S y C45-106S (**C**) preparados en ausencia de DTT (0,4 μ M). La expresión de TNF- α se midió mediante PCR en tiempo real (*, $P < 0,05$ frente a control, ANOVA).

Descripción detallada de la invención

Materiales y métodos

5 Reactivos.

El factor estimulador de colonias de macrófagos humanos (M-CSF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) se adquirieron de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA); DMEM, medio X-Vivo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), glutamina y penicilina/estreptomicina de Lonza (Walkersville, MD, USA); suero bovino fetal (FBS) de GIBCO (Karlsruhe, Alemania); peróxido de hidrógeno (30%) de BDH Chemicals Ltd. (Poole, Reino Unido). El anticuerpo anti-HMGB1 humano de conejo policlonal se adquirió en Abcam (ab18256, Cambridge, Reino Unido) y el anticuerpo monoclonal anti-HMGB1 de ratón DPH1.1 fue de HMGBiotech srl. (HM901, Milán, Italia). Se generaron fragmentos F(ab')₂ a partir del anticuerpo DPH1.1 utilizando el kit de micropreparación de Fab y F(ab')₂ de IgG1 de ratón de Pierce (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La Cardiotoxina (C9759) y todos los demás productos químicos y materiales se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). CXCL12 se sintetizó utilizando la química de fase sólida tBoc (Clark-Lewis et al., 1997).

Ratones y Tratamientos.

Se adquirieron ratones C57BL/6 de ocho semanas de edad de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). La lesión estéril se indujo mediante la inyección de 50 μ l de cardiotoxina 15 μ M (CTX) en el músculo tibial anterior. Después de los tiempos indicados, se aislaron los músculos de los ratones y se incubaron durante 2 h a 37°C en PBS que contenía inhibidores de proteasa y Collagenase D (Roche, Mannheim, Alemania); las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se conservaron a -80°C antes de la transferencia western. Se establecieron bolsas de aire en ratones C57BL/6 macho de 8 semanas de edad mediante inyección subcutánea dorsal de 5 y 3 ml de aire el día 0 y el día 3, respectivamente. El día 6, se inyectaron en las bolsas de aire 200 μ l de PBS que contenía 10 pmoles de CXCL12, 300 pmoles de HMGB1 (wt o 3S) o 10 pmoles de CXCL12 + 300 pmoles de HMGB1 (wt o 3S) o 200 μ l de PBS que contenía 0, 1 o 10 nmoles de HMGB1 (wt o 3S). Después de 6 horas, se recogieron células de las bolsas de aire, se tiñeron con anticuerpos anti-Ly6C (BD, 557359) y anti-CD11b (Biolegend, 101216) y se analizaron mediante citometría de flujo.

Alternativamente, se realizó una lesión muscular en el tibial anterior (TA) de C57BL/6 de 8 semanas de edad al inyectar 50 μ l de cardiotoxina 15 μ M (CTX) en presencia o no de 150 μ g de HMGB1 (wt o 3S) (tres animales por grupo). Los ratones se sacrificaron 2 o 5 días después de la inyección de CTX, y los músculos TA se disecaron y se congelaron en isopentano enfriado con N₂ líquido. Este modelo refleja la lesión por necrosis.

La experimentación animal se llevó a cabo en el Istituto Scientifico San Raffaele según lo aprobado por el "Comitato Istituzionale per la Buona Sperimetazione Animale de la Fondazione San Raffaele del Monte Tabor" el 19 de septiembre de 2011.

Células.

La línea celular de fibroblastos 3T3 de ratón, la línea celular de leucemia monocítica aguda humana THP-1 y la línea celular de mioblastos de ratón C2C12 se adquirieron de la Colección de Cultivos Tipo Americana (Rockville, MD, USA) y se cultivaron en DMEM con un suplemento de FBS al 10%, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de capas leucocíticas de sangre de donantes (Hospital de Magenta, Italia) mediante centrifugación en gradiente de Ficoll (Lymphoprep, AXIS-SHIELD). Los monocitos CD14⁺ se aislaron mediante inmunoselección positiva (CD14 MicroBeads, Miltenyi Biotec, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se diferenciaron en macrófagos utilizando medio X-Vivo con un suplemento de suero humano inactivado por calor al 1%, GM-CSF y M-CSF.

Aislamiento de HMGB1.

La HMGB1 se aisló por inmunoprecipitación (IP) de muestras de THP-1 como se describió previamente (7). Las proteínas se separaron después mediante SDS-PAGE no reductora, y las bandas de proteína correspondientes al peso molecular de HMGB1 se escindieron y se sometieron a digestión triptica. Los péptidos resultantes se caracterizaron por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) como se describió anteriormente (7). La fragmentación de péptidos individuales para producir iones *b* e *y* se utilizó para determinar la secuencia de aminoácidos y confirmar la presencia de modificaciones específicas.

Producción de proteínas HMGB1 wt y mutante recombinantes.

La HMGB1 de tipo salvaje utilizada en los experimentos es la proteína de rata (MGKGDPPKKPR GKMSYYAFFV

QTCREEHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK TMSAKEKGKF EDMAKADKAR YEREMKTYIP PKGETKKKFK
 DPNAKRPSPS AFFLFCSEYR PKIKGEHPGL SIGDVAKKLG EMWNNTAADD KQPYEKKAAL LKEYEKDIA
 AYRAKGKPKDA AKKGVVKAEL SKKKKEEEDD EDEDEDEEEE EEEDEDEEEE DDDDE SEQ ID NO. 2), sin
 5 etiquetas ni aminoácidos adicionales, expresada en *E. coli* y purificada hasta homogeneidad como se describió
 previamente (6). El plásmido que codificaba la HMGB1 de tipo salvaje se transformó nuevamente en la cepa BL21
 de *E. coli* carente de proteasa (Novagen) y se incubó en medio 2-YT. La expresión de la proteína fue inducida a
 23°C mediante la adición de IPTG 1 mM durante la noche. Las células cosechadas se resuspendieron en Tris-HCl
 50 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, PMSF 0,5 mM (que contenía o no DTT 1 mM, según el caso) y se sometieron a
 10 sonicación a 4°C. Se añadió NaCl a una concentración final de 0,5 M y los desechos celulares se descartaron. Se
 añadió sulfato de amonio cristalino (0,39 g por ml) al sobrenadante, y el producto precipitado de proteína se
 descartó. El sobrenadante se purificó en una columna HiLoad 26/10 Phenyl Sepharose High Performance (GE
 Healthcare) conectada a un sistema FPLC (Akta Purifier, GE Healthcare). Las proteínas se hicieron eluir a
 temperatura ambiente mediante un gradiente descendente continuo de sulfato de amonio (39% a 0%) en HEPES 20
 mM, pH 7,9, PMSF 0,2 mM, EDTA 0,2 mM, pH 8 (más DTT 0,5 mM cuando fue apropiado). Las fracciones que
 15 contenían HMGB1 (identificadas mediante tinción de Coomassie después de SDS-PAGE) se combinaron, se
 sometieron a diálisis durante la noche frente a HEPES 50 mM pH 7,9, PMSF 0,2 mM, NaCl 20 mM (más DTT 0,5
 mM cuando fue apropiado) y se cargaron en una columna Hi-trap Q (GE Healthcare). Las proteínas se hicieron eluir
 con un tampón de fuerza iónica creciente (NaCl de 20 mM a 1 M) en HEPES 50 mM pH 7,9, PMSF 0,2 mM, NaCl 1
 M (más DTT 0,5 mM cuando fue apropiado). La pureza e integridad de la HMGB1 purificada se verificaron mediante
 20 tinción con azul de Coomassie después de SDS-PAGE. Los autores también sometieron a ensayo la HMGB1 antes
 y después de la digestión con ADNasa I (100 U/ml, Invitrogen), y los autores observaron que no hubo diferencia en
 la actividad. La proteína se almacenó a -80°C. Los tampones siempre se desgasificaron antes de su uso. Los
 mutantes E106 (C106 fue reemplazado por un ácido glutámico), C23S, C45S, 1S-HMGB1 (C106S), 2S-HMGB1
 (C23-C45S), C45-106S y 3S-HMGB1 se generaron utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange XL
 25 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stratagene), y se verificaron mediante secuenciación. Las proteínas
 mutantes se expresaron, purificaron y se controló su calidad como HMGB1 de tipo salvaje (wt).

Se produce BoxA de HMGB1 en *E. coli* a partir de un plásmido de expresión que codifica la secuencia de mamífero
 no modificada, que es totalmente idéntica en seres humanos y ratones (Muller et al., Thermodynamics of HMGB1
 interaction with duplex DNA. Biochemistry 2001, 40:10254-61). Éste tiene la secuencia:

MGKGDPPKPR GKMSYAFFV QTCREEHKKK HPDASVNFSE FSKKCSERWK
 30 TMSAKEKGKF EDMAKADKAR YEREMKTYIP PKGETKKKFK (SEQ ID No. 3).

BoxA se expresó, purificó y se controló su calidad como HMGB1 de tipo salvaje (wt).

LPS en preparaciones de HMGB1.

Se eliminó el LPS contaminante de las preparaciones de proteína mediante extracción con Triton X-114 (6). Los
 35 autores midieron los LPS en muestras de HMGB1 de todas las preparaciones utilizando el Análisis de Amebocitos
 Limulus de Cambrex QCL-1000 (Lonza), antes y después de la digestión terminal con tripsina (por lo tanto,
 excluyendo cualquier interferencia de HMGB1 con el análisis). El contenido de LPS estuvo siempre por debajo de
 0,4 ng/mg de proteína; esta cantidad de LPS es totalmente ineficaz en los análisis de los autores cuando se
 administra solo (datos no publicados). También se realizaron experimentos en presencia de Polimixina B (10 µg/ml)
 para neutralizar la actividad biológica de LPS, aunque no se encontró en las preparaciones de HMGB1.

40 Preparación de HMGB1 reducida u oxidada terminalmente.

Se expusieron HMGB1 wt o mutantes a H₂O₂ (100 mM) o DTT (5 mM) durante 1 hora y se sometieron a diálisis
 antes de la adición a las células u otros análisis.

Caracterización espectrométrica de masas del estado de oxidación de cisteína de HMGB1 recombinante o
 circulante.

45 Los residuos de cisteína reducidos dentro de HMGB1, recombinantes u obtenidos a partir de células THP-1, se
 caracterizaron por alquilación específica de tiol con yodoacetamida 50 mM durante 30 minutos. La alquilación con
 yodoacetamida produce un cambio de masa de 57 uma (unidad de masa atómica). Después de la incubación, las
 preparaciones de HMGB1 recombinante se precipitaron con metanol enfriado con hielo (MeOH). El sedimento se
 50 recuperó después de centrifugar a 14.000 g a 4°C durante 10 min. La presencia de residuos de SOH en las cisteínas
 se investigó con una incubación de 20 minutos con dimedona (5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona) 0,1 mM. Se
 observaron las modificaciones oxidativas de SO₂H y SO₃H buscando aumentos masivos de 32 y 48 uma
 respectivamente en cada residuo de cisteína particular. Después de la primera etapa de alquilación, los residuos de
 cisteína restantes comprometidos en un enlace disulfuro se redujeron con DTT 1 mM a 4°C durante 15 minutos. Las
 55 cisteínas recientemente reducidas se alquilaron a continuación con *N*-etilmaleimida (NEM) 50 mM durante 5 minutos
 en hielo, lo que produce un cambio de masa de 125 uma. La HMGB1 se aisló por inmunoprecipitación (IP) de
 muestras de THP-1 como se describió previamente (7). Las proteínas se separaron a continuación mediante SDS-

PAGE no reductora, y las bandas de proteína correspondientes al peso molecular de HMGB1 se escindieron y se sometieron a digestión con tripsina. Los péptidos resultantes se caracterizaron por medio de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) como se describió anteriormente (7). Se utilizó la fragmentación de péptidos individuales para producir iones *b* e *y* para determinar la secuencia de aminoácidos y confirmar la presencia de modificaciones específicas.

Transferencia Western.

El contenido de proteína total en muestras de músculo de ratones de control o tratados con CTX se determinó utilizando el Reactivo Colorante para Análisis de Proteínas (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hemstead, Reino Unido). Se cargaron cantidades equivalentes de proteínas sobre geles. Para la transferencia Western, las muestras de proteínas se separaron sobre geles de SDS-PA al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que se bloquearon con leche desnatada al 5% en solución salina tamponada con Tris (pH 7,0) que contenía Tween 20 al 0,1% (TBS-T). Se sondaron membranas bloqueadas con anti-HMGB1 de conejo (1:1000, Abcam, ab18256) en TBS-T más leche al 5% durante la noche a 4°C, se lavaron varias veces con TBS-T y se incubaron durante 1 h con anti-anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa (1:10.000). Las transferencias Western se visualizaron utilizando un kit de quimioluminiscencia mejorado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

Microscopía de células vivas.

Los fibroblastos inmortalizados se obtuvieron de ratones con un gen activado ("knock-in") en los que el gen p65 endógeno fue reemplazado por GFP-p65 (8). Las células se cultivaron sobre portaobjetos de vidrio con cámaras especiales para microscopía confocal (Lab-Tek) en DMEM con un suplemento de FCS al 10%. Las células se privaron de suero durante 16 h y a continuación se estimularon con HMGB1 80 nM producida con o sin DTT como se indica. Posteriormente, se obtuvieron imágenes de las células vivas utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5 AOBS equipado con un láser ArgonPlus Ar-ion (220 mW de potencia nominal, potencia medida en el objetivo: 11,4 mW para los 488 nm), un objetivo para aceite de inmersión HCX PL Apo CS 63 ×/1,4 NA, y una cámara termostática humidificada (37°C y 5% de CO₂) como se describió previamente (9); se tomaron imágenes a intervalos de tiempo y se muestran imágenes de punto temporal de 30 min.

Análisis de quimiotaxis.

Para la quimiotaxis de fibroblastos, se utilizaron cámaras Boyden modificadas con filtros (poros de 8 µm, Neuro Probe) recubiertos con fibronectina (50 µg/ml, Roche). Se agregaron cincuenta mil células en 200 µl a la cámara superior; se añadieron HMGB1 o mutantes a la cámara inferior, y a continuación se dejó que las células migraran durante 3 horas a 37°C. Las células no migratorias se eliminaron con un hisopo de algodón, y las células migradas se fijaron con etanol y se tiñeron con Giemsa. Todos los análisis se realizaron por triplicado y las células migradas se contaron en 10 campos al azar/filtro.

Para los monocitos, la quimiotaxis se analizó en microcámaras Boyden de 48 pocillos (Neuro Probe, Cabin John, MD) como se describió previamente (Uguccioni et al., 1995). Brevemente, los monocitos recién aislados (5×10^4) se diluyeron en RPMI 1640 con un suplemento de HEPES 20 mM, pH 7,4, solución de proteínas plasmáticas pasteurizada al 1% (5% PPL SRK) y los quimioatrayentes se diluyeron en el mismo tampón con un suplemento de Polimixina (10 µg/ml). Las células se añadieron después a los pocillos superiores. Después de 90 minutos de incubación, la membrana se retiró, se lavó en el lado superior con PBS, se fijó y se tiñó. Todos los análisis se realizaron por triplicado, y para cada pocillo las células migradas se contaron con un aumento de 1000 veces en campos seleccionados al azar.

ELISA híbrido

El heterocomplejo entre CXCL12 y HMGB1 (todo-tiol o disulfuro-HMGB1) se detectó mediante un ELISA híbrido. Las placas (Costar 3596, Corning Incorporated, NY, USA) se recubrieron durante la noche con un anticuerpo de captura anti-CXCL12 (CXCL12/SDF-1 humano DuoSet ELISA, R&D Systems, MN, USA), a continuación se bloquearon con solución diluyente (BSA al 1% en PBS) durante 3 horas. CXCL12 y HMGB1 (razón estequiométrica 2:1) se preincubaron a 37°C durante 15 minutos con agitación, para promover la formación del heterocomplejo. Las muestras se distribuyeron en los pocillos en solución diluyente y se incubaron durante 2 horas. Después de 2 horas de incubación con un anticuerpo anti-HMGB1 conjugado con enzima (HMGB1 ELISA, IBL International, Alemania), la reacción se visualizó mediante la adición de la solución Sustrato y se detuvo con solución de Parada (HMGB1 ELISA, IBL International, Alemania). La densidad óptica se midió a 450 nm. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente y se repitieron 4 lavados antes de cada etapa del procedimiento utilizando Tween 20 al 0,1% en PBS.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa.

Los ARN totales se aislaron utilizando el kit Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare) y el ADN complementario (ADNc) se obtuvo por retrotranscripción con cebadores Oligo (dT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó a

continuación por duplicado utilizando LightCycler480 (Roche Molecular Diagnostics), mezcla maestra SYBR Green I y los siguientes iniciadores:

β -actina: 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCC-3' (SEQ ID NO: 4) y 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGAC GATGG-3' (SEQ ID NO: 5);

5 TNF- α : 5'-AGCCCATGTTGTAGCAAACC-3' (SEQ ID NO: 6) y 5'-AGGACCTGGGAGTAGATGAGG-3' (SEQ ID NO: 7);

IL-6: 5'-TACCCCCAGGAGAAGATTCC-3' (SEQ ID NO: 8) y 5'-TTTTCACCAGGCAAGTCTCC-3' (SEQ ID NO: 9);

IL-8: 5'-TGCCAAGGAGTGCTAAAG-3' (SEQ ID NO: 10) y 5'-CTCCACAACCCTCTGCAC-3' (SEQ ID NO: 11);

MIP-2: 5'-TGCCAGTGCTTGCAGAC-3' (SEQ ID NO: 12) y 5'-TCTTAACCATGGGCGATGC-3' (SEQ ID NO: 13).

10 Se utilizó el método ΔC_t para la cuantificación, y el gen de la β -actina se utilizó para la normalización.

Análisis inmunohistoquímico e inmunofluorescente.

Los análisis inmunohistoquímicos e inmunofluorescentes (IF) se realizaron sobre secciones de músculos tibiales anteriores congelados (TA) de ratones de control y tratados utilizando los siguientes anticuerpos: CD163 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), Pax7 (DSHB, 1:20).

15 Las secciones de los músculos TA se secaron al aire durante 30 minutos y se fijaron en acetona a -20°C o en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las secciones IF se bloquearon durante 1 h con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% y Triton al 0,1% diluido en PBS 1X. A continuación, las secciones se incubaron con anticuerpos durante la noche a 4°C. Las secciones se lavaron con PBS y a continuación se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados (Alexafluor, 1:500) durante 1 h a temperatura ambiente. Los núcleos se revelaron por contraste con hematoxilina o Hoechst.

Para el análisis histológico, se obtuvieron secciones musculares en serie y se tiñeron en Hematoxilina y Eosina (H & E) siguiendo procedimientos convencionales. Las células necróticas se identificaron por hipereosinofilia, adelgazamiento y ondulación y presencia de muchos núcleos, mientras que las fibras regeneradoras se distinguieron en función de la localización central de sus núcleos.

25 Para cada experimento, se tomaron veinte imágenes al azar para cada músculo a 20 o 40 aumentos utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments Europe) con una cámara digital DXm1200 (Nikon, Nikon Instruments Europe) y se analizaron utilizando un sistema de imagen digitalizado (ImageJ 1.38 Instituto Nacional de Salud) y el programa Adobe Photoshop CS4.

Análisis estadístico.

30 El análisis estadístico se realizó utilizando el soporte lógico GraphPad Prism. Las diferencias entre los grupos de tratamiento se determinaron mediante pruebas t de Student o U de Mann-Whitney; los valores de p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Para experimentos con dosis múltiples y experimentos con bolsas de aire se llevó a cabo ANOVA, seguido de la prueba post-hoc de Dunnett.

Resultados

35 La HMGB1 recombinante se puede oxidar y reducir de manera reversible

Todos los estudios previos del grupo de los autores se basaron en la proteína HMGB1 completa producida bacterianamente, purificada en presencia de ditioneitol (DTT) agregado a los tampones desgasificados (6). Dado que HMGB1 puede existir en diferentes formas redox, los autores compararon diferentes lotes de HMGB1 purificados en presencia o ausencia de DTT. Los autores excluyeron específicamente cualquier contaminación de LPS (véase Materiales y métodos). Para caracterizar el estado redox de HMGB1, los autores alquilaban cisteínas reducidas con yodoacetamida, a continuación redujeron los enlaces disulfuro con DTT e hicieron reaccionar con N-etilmaleimida (NEM); los autores a continuación realizaron la digestión con tripsina y el análisis de espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS). La HMGB1 purificada con DTT dio lugar a péptidos de 1569,1 (ion doblemente cargado 784,5²⁺), 622,6 (ion doblemente cargado 311,3²⁺) y 2070,0 Da (ion cargado por triplicado 690,0³⁺). El MS/MS reveló un aducto de yodoacetamida en todas las cisteínas, indicativo de una cadena lateral de tiol (La Figura. 1A, a1); los autores de la presente invención la denominarán en adelante todo tiol- HMGB1. Un análisis similar de la HMGB1 producida en ausencia de DTT reveló aductos NEM en C23 y C45, lo que indica que formaron un enlace disulfuro (Figura. 1A, a2); C106 también se redujo en esta forma de HMGB1 (en adelante, disulfuro-HMGB1). Ninguna de las modificaciones SOH, SO₂H o SO₃H de las cisteínas se identificó dentro de estas formas de HMGB1.

La presencia de enlaces disulfuro a menudo se asocia con una mayor movilidad electroforética en condiciones no reductoras, debido a un plegamiento más compacto de la cadena polipeptídica. La todo tiol-HMGB1 migró en forma

de una sola banda con un pm aparente de 28 kDa, tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Por el contrario, la disulfuro-HMGB1 migró en condiciones no reductoras en forma de una banda única de 26 kDa y se desplazó en condiciones reductoras a la misma posición de 28 kDa que la todo-tiol-HMGB1 (Fig. 1B). Los anticuerpos monoclonales o policlonales contra HMGB1 reconocieron ambas formas de HMGB1 (Fig. 1B). La disulfuro-HMGB1 se cambió fácilmente al patrón electroforético de la todo-tiol-HMGB1 después de una exposición de 5 minutos a DTT 5 mM; por el contrario, los autores ocasionalmente detectaron la formación de disulfuro-HMGB1 después de la dilución en tampones equilibrados con aire que carecían de agentes reductores. Esto indica que las formas todo-tiol- y disulfuro-HMGB1 se interconvierten fácilmente en presencia de donantes (DTT) o aceptores (oxígeno) de electrones.

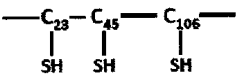
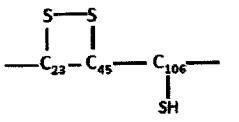
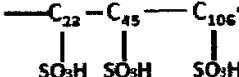
Las actividades estimuladoras de citoquina y quimioatrayentes de HMGB1 son mutuamente excluyentes

Recientemente, (4,5) mostraron que la disulfuro-HMGB1 tiene actividad estimuladora de citoquinas que se pierde después de la reducción con DTT. Los autores confirmaron que la disulfuro-HMGB1 induce la activación de la vía NF- κ B (Fig. 1C) y la expresión de citoquina/quimioquina por los macrófagos (Fig. 1D), mientras que la todo-tiol-HMGB1 no lo hace. Sin embargo, se desconoce la influencia de las modificaciones redox sobre la actividad quimiotáctica de HMGB1. Los autores demostraron recientemente que el reclutamiento de células inflamatorias inducido por HMGB1 depende de la formación de un heterocomplejo de HMGB1-CXCL12 que actúa exclusivamente a través de CXCR4 y no a través de otros receptores de HMGB1 (10). Utilizando un ELISA híbrido (anticuerpo de captura anti-CXCL12 y anticuerpo de detección anti-HMGB1) los autores encontraron que la todo-tiol-HMGB1 forma el heterocomplejo con CXCL12; no se pudo detectar la formación de heterocomplejos entre disulfuro HMGB1 y CXCL12 (Fig. 2A). La todo-tiol-HMGB1 presenta sinergia con CXCL12 en la inducción de la migración de monocitos humanos, como se esperaba (10), mientras que la disulfuro-HMGB1 no (Fig. 2B).

Los fibroblastos responden a concentraciones más bajas de HMGB1 en comparación con los leucocitos (11) y apoyan su propia migración al secretar CXCL12 tanto basalmente como en respuesta a la activación de HMGB1 del Receptor para Productos Finales de Glicación Avanzada (RAGE) (10). Los fibroblastos de ratón 3T3 migraron de manera dependiente de la dosis hacia todo-tiol-HMGB1, pero no hacia disulfuro-HMGB1 (Fig. 2C) En particular, la adición de DTT a disulfuro-HMGB1 (recientemente todo tiol HMGB1) restauró casi por completo la actividad quimiotáctica de la proteína.

Tomados en conjunto, los resultados de los autores indican que la formación del enlace disulfuro C23-C45 inhibe la función quimioatrayente de HMGB1 (Tabla I).

Tabla I. Resumen del estado redox de HMGB1 frente a la actividad. Las formas redox mutuamente excluyentes de HMGB1 promueven el reclutamiento de células o la liberación de citoquinas pro-inflamatorias: las cisteínas reducidas hacen de HMGB1 un quimioatrayente, un enlace disulfuro hacen de ella una citoquina pro-inflamatoria y la oxidación adicional de sus cisteínas a sulfonatos mediante especies reactivas del oxígeno anula ambas actividades.

Molécula / Nivel redox de cisteína	Visión de conjunto molecular esquemática	Actividad inductora de citoquina	Actividad quimioatrayente
Todo-tiol-HMGB1 CysH		No	Si
Disulfuro-HMGB1 Cys-Syc		Si	No
HMGB1 oxidada terminalmente por ROS CysO3-		No	No

Por lo tanto, las actividades estimuladoras de citoquinas y quimioatrayentes de HMGB1 son mutuamente excluyentes. Además, la disulfuro-HMGB1 y la todo-tiol-HMGB1 no compiten entre sí (Fig. 2D). De hecho, las funciones quimioatrayentes y estimuladoras de citoquinas de HMGB1 requieren diferentes receptores: CXCR4 y TLR4, respectivamente (3-5,10). Los pequeños reajustes conformacionales asociados con la formación de un único enlace disulfuro disminuyen pero no anulan la unión de HMGB1 al ADN (12), cómo pueden segregar y restringir de manera tan efectiva las interacciones de la todo-tiol- y la disulfuro-HMGB1 a CXCL12 y TLR4, respectivamente, aún necesita ser investigado.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) anulan la actividad proinflamatoria de HMGB1 oxidando de forma terminal sus cisteínas a sulfonatos (4,5,13). Los autores muestran que HMGB1 expuesta a H₂O₂ no tiene actividad

quimiotáctica (Fig. 2E). Por lo tanto, la oxidación terminal hace que HMGB1 sea inactiva, como factor proinflamatorio y como quimiotáctico (Tabla I). Con el fin de imitar la oxidación irreversible a sulfonato, C106 fue reemplazada por un ácido glutámico. La movilidad electroforética del mutante E106 en condiciones reductoras y no reductoras fue idéntica a la de HMGB1 wt (datos no mostrados). Considerando que la todo-tiol-HMGB1 wt tiene actividad quimiotáctica óptima sobre fibroblastos a 1 nM, el mutante E106, ya sea expuesto a DTT o no, fue ineficaz hasta 3 nM (Fig. 2F); tampoco logró inducir la expresión de citoquinas/quimioquinas por los macrófagos (Fig. 2G). Además, el mutante E106 no puede competir con la todo-tiol- y la disulfura-HMGB1 wt en análisis de migración e inflamación respectivamente (datos no mostrados), lo que sugiere que el mutante E106 no se puede unir a los receptores de HMGB1.

En general, los resultados de los autores demuestran que las actividades de HMGB1 dependen de redox. Después de la descripción original de la liberación de citoquinas inducida por HMGB1 por los macrófagos (Andersson et al., 2000), varios estudios no pudieron reproducir estos resultados, lo que lleva a concluir que la HMGB1 solo puede actuar en sinergia con otros mediadores inflamatorios (14-17). Los autores más bien concluyen que los resultados inconsistentes se obtuvieron mediante el uso de formas de HMGB1 inconsistentemente definidas. Para comprender la patogénesis, será importante considerar qué la HMGB1 está presente en cada condición específica y local *in vivo*.

Los inhibidores de HMGB1 BoxA y Anticuerpo monoclonal DPH1.1 evitan la migración de células pero no la producción de citoquinas

Se han desarrollado varios inhibidores de HMGB1, entre los cuales los más utilizados son los anticuerpos monoclonales y BoxA; los autores investigaron si bloqueaban las actividades quimioatrayentes y/o inductoras de citoquinas de HMGB1. BoxA inhibió de manera dependiente de la dosis la migración de fibroblastos en respuesta a HMGB1 pero no evitó la expresión de TNF- α inducida por HMGB1 en macrófagos (Fig. 3A-B). Los autores también sometieron a ensayo la actividad del anticuerpo monoclonal DPH1.1, dirigido contra un epítipo entre BoxB y la cola ácida de HMGB1 (18). Los autores prepararon fragmentos F(ab')₂ para evitar la activación inespecífica de macrófagos: éstos inhiben la migración celular inducida por HMGB1 pero no la expresión de TNF- α (Fig. 3C-D). Estudios previos han demostrado que un anticuerpo monoclonal anti-HMGB1 diferente (2G7) inhibe la formación de citoquinas inducida por HMGB1 en macrófagos (Yang et al., 2010).

Por lo tanto, es posible neutralizar la actividad quimioatrayente de HMGB1 sin interferir en la actividad inductora de citoquinas. De hecho, los efectos terapéuticos conocidos de BoxA en modelos de hepatitis (19), peritonitis (20), isquemia/reperfusión del corazón y el cerebro (21,22), y otros, pueden ser totalmente atribuibles al reclutamiento reducido de células inflamatorias en el tejido lesionado

Los tres residuos de cisteína de HMGB1 son necesarios para la actividad estimuladora de citoquinas, pero no para la actividad quimioatrayente

Con el fin de estudiar la participación de las cisteínas individuales en las actividades de HMGB1, los autores generaron mutantes 1S-HMGB1 (donde C106 se reemplazó por una serina), 2S-HMGB1 (donde C23 y C45 son reemplazadas) y 3S-HMGB1 (donde las 3 cisteínas son reemplazadas). Todos los mutantes se purificaron sin DTT, y se redujeron cuando se indicó por exposición a DTT 5 mM. La movilidad electroforética mostró la presencia del enlace disulfuro C23-C45 en 1S-HMGB1, pero no en 2S-HMGB1 ni 3S-HMGB1 (Fig. 4A). Ninguno de los mutantes indujo la expresión de TNF- α en los macrófagos, pero todos indujeron la migración de fibroblastos (Fig. 4B-C). Se observaron resultados similares con los mutantes C23S, C45S o C45-106S (Fig. 9). Como se esperaba, 2S- y 3S-HMGB1 tenían la misma actividad quimiotáctica, ya sea que estuvieran expuestas a DTT o no, ya que no existe un enlace disulfuro que se pueda reducir. Por lo tanto, se requiere cada cisteína para la actividad estimuladora de citoquina, pero ninguna para la actividad quimioatrayente de HMGB1.

Los autores investigaron a continuación si la actividad quimiotáctica de los mutantes era anulada por ROS. Como era de esperar, el tratamiento con H₂O₂ anuló la actividad quimiotáctica de 1S- y 2S-HMGB1, pero no la de 3S-HMGB1, que no tiene cisteína que se pueda oxidar terminalmente (Fig. 4D).

La oxidación de cisteína modula las diferentes funciones de HMGB1 *in vivo*

Muchos estudios han demostrado que durante la inflamación, la producción de ROS apoya un ambiente oxidativo extracelular, causando la formación de enlaces disulfuro entre los tioles (23,24). Los niveles elevados de ROS producidos durante la apoptosis causan la oxidación terminal de HMGB1, redirigiendo su capacidad para activar la respuesta inmunitaria adquirida hacia la tolerancia (13). Un estudio previo sugirió que la HMGB1 liberada por células necróticas también se oxida (25). Finalmente, se ha demostrado que HMGB1 es un sensor redox en el contexto de la autofagia (26). Por lo tanto, los autores investigaron si el estado redox de HMGB1 depende de su origen.

HMGB1 se libera pasivamente al medio extracelular durante la necrosis y es secretada activamente por monocitos y macrófagos después de la estimulación con LPS y ATP (Gardella et al., 2002). Los autores caracterizaron por medio de LC-MS/MS el estado redox de HMGB1 antes y después de su liberación por las células THP-1 (Tabla II).

TABLA II. Estado redox de HMGB1 intracelular y extracelular en células THP-1. Caracterización por espectrometría de masas del estado redox de las cisteínas de HMGB1 en el núcleo, el citosol y el sobrenadante de células THP-1. La HMGB1 de células tratadas o no con LPS y del sobrenadante se analizó mediante LC-MS/MS.

HMGB1 intracelular				HMGB1 extracelular	
Control	LPS	Control	LPS	LPS	Medio necrótico
Núcleo		Citosol		Sobrenadante	
Todo-tiol-HMGB1				Todo-tiol HMGB1 + disulfuro-HMGB1	

La HMGB1 contenida dentro de la célula (núcleo o citosol) se reduce por completo, también cuando las células THP-1 están expuestas a LPS. Notablemente, los sobrenadantes de las células THP-1 necrotizadas mecánicamente con ciclos de congelación-descongelación o de células que secretan HMGB1 después de la exposición a LPS contenían tanto todo-tiol- como disulfuro-HMGB1. Por lo tanto, los autores identificaron las células monocíticas como una fuente de disulfuro-HMGB1; los monocitos activados pueden participar en la respuesta inflamatoria produciendo HMGB1 estimuladora de citoquinas.

A continuación los autores investigaron el estado redox de HMGB1 *in vivo* durante la lesión muscular y la posterior inflamación estéril, utilizando la movilidad electroforética como un análisis. Los músculos tibiales anteriores de los ratones se dañaron o no mediante inyección de cardiotoxina (CTX), que causa necrosis de las células musculares (27). Los músculos se recogieron 2, 6, 24 o 72 horas después de la inyección de CTX y se incubaron en PBS con Colagenasa D (Fig. 5A). La HMGB1 apenas fue detectable en el medio que bañaba los músculos sanos, pero fue abundante en el baño medio que bañaba los músculos dañados por CTX. En los primeros momentos (2 h) se detectó todo-tiol-HMGB1, pero a partir de las 6 horas apareció disulfuro-HMGB1. Es posible que las células inflamatorias infiltrantes secreten HMGB1 que contiene disulfuro, como observaron los autores *in vitro* con células monocíticas (Tabla II). De hecho, los leucocitos se reclutan en el músculo dañado ya 3 horas después de la inyección de CTX (10). Una explicación no mutuamente excluyente es que las células infiltrantes, una fuente bien conocida de ROS, pueden inducir la oxidación de HMGB1 liberada por el tejido dañado. Además, la disulfuro-HMGB1 no está presente en el músculo sano, como demuestra el control del producto lisado. Por lo tanto, la disulfuro-HMGB1 se puede considerar como un marcador de daño tisular.

Dado que 3S-HMGB1 es resistente a la oxidación, los autores plantearon la hipótesis de que su actividad *in vivo* no debería modificarse mediante la producción de ROS. Los autores mostraron previamente (10) que el heterocomplejo HMGB1/CXCL12 induce un influjo masivo de leucocitos hacia las bolsas de aire creadas por la inyección de aire en la dermis dorsal de los ratones; tales bolsas de aire proporcionan una cavidad en la que se pueden administrar fármacos y a partir de la cual se pueden recuperar las células reclutadas. Los autores inyectaron en las bolsas de aire wt o 3S-HMGB1 (300 pmoles) junto con CXCL12 (10 pmoles). HMGB1 (wt o 3S) o CXCL12 solo no indujeron el reclutamiento de leucocitos, pero tanto wt como 3S-HMGB1 asociados con CXCL12 indujeron un influjo masivo de leucocitos (Fig. 5B). En particular, el número de leucocitos reclutados aumentó en respuesta a 3S-HMGB1/CXCL12 en comparación con wt HMGB1/CXCL12. Puesto que siempre hay una baja cantidad de CXCL12 en los fluidos extracelulares, y HMGB1 puede inducir la secreción de CXCL12 adicional (10), los autores también realizaron los experimentos con bolsa de aire utilizando altas concentraciones de HMGB1 sola. La inyección en la bolsa de aire de 1 nmol de 3S-HMGB1 indujo el reclutamiento de leucocitos, pero la cantidad equivalente de todo-tiol wt HMGB1 no tuvo ningún efecto (Fig. 5C). Sin embargo, dosis todavía mayores de todo-tiol wt o 3S-HMGB1 (10 nmoles) reclutaron leucocitos, sin diferencia significativa. Esto es compatible con la inactivación estequiométrica de HMGB1 por ROS producida *in situ*. Para confirmar esta hipótesis, los autores realizaron el mismo experimento en presencia o no de N-acetilcisteína (NAC), un antioxidante (Fig. 5D). Los autores observaron que 1 nmol de proteína wt inducía el reclutamiento de leucocitos tan eficazmente como 3S-HMGB1 en presencia de NAC, lo que demuestra que wt HMGB1 se inactiva *in vivo* por oxidación inducida por ROS.

Tomados en conjunto, los experimentos *in vitro* e *in vivo* muestran que 3S-HMGB1 puede inducir el reclutamiento de leucocitos sin inducir la producción de citoquina/quimioquina y también es resistente a la oxidación terminal por ROS. Se ha demostrado que HMGB1 promueve la regeneración en varios modelos de daño tisular, y todos estos experimentos se realizaron con la forma reducida de HMGB1 wt recombinante (28). Sin embargo, los estados redox de HMGB1 administrada *in vivo* se pueden interconvertir entre sí.

3S-HMGB1 limita el daño muscular y favorece la regeneración muscular después de la lesión

También es probable que HMGB1 participe en la regeneración de tejidos después de la resolución de la inflamación. Se demostró que el bloqueo de HMGB1 retarda la curación de las heridas de la piel. En algunas afecciones donde el cierre de la herida se ve comprometido, por ejemplo en ratones diabéticos, la administración de HMGB1 adicional puede promover el cierre de la herida (29). Por otra parte, la administración de HMGB1 después del infarto de miocardio promueve la curación del área infartada y la recuperación funcional del corazón (30). Finalmente, HMGB1 es proangiogénica y promueve la revascularización del músculo después de la isquemia (31). Dado que el microentorno tisular se reduce durante la regeneración tisular (32), se puede esperar que la forma de HMGB1 que favorezca la regeneración sea la que contiene cisteínas reducidas. El microentorno tisular, en particular en el

músculo (34), se reduce para favorecer la regeneración del tejido. Por lo tanto, los autores proponen que la forma todo-tiol de HMGB1 es la necesaria para la regeneración tisular.

La 3S-HMGB1 podría imitar la todo-tiol HMGB1 y favorecer la regeneración de tejidos. Para probar esto, los autores han sometido a ensayo la 3S-HMGB1 en un modelo de ratón de regeneración muscular después de una lesión aguda.

Curiosamente, la inyección de todo-tiol HMGB1 o 3S-HMGB1 en músculos tibiales anteriores (TA) junto con cardiotoxina aumenta significativamente el número de macrófagos M2 (identificados por la presencia del marcador de superficie CD163), que son proangiogénicos y regeneradores del tejido. El número de células satélite (evidenciado por la expresión del factor de transcripción Pax-7), que son las células progenitoras residentes que pueden regenerar las fibras musculares, también aumenta significativamente (Fig. 7). En particular, la inyección de 3S-HMGB1 es más eficaz que la HMGB1 natural no modificada.

La motilidad de las células miogénicas es necesaria para la regeneración del músculo dañado. Una explicación para el aumento del número de células satélite observado en ratones a los que se ha inyectado HMGB1 podría ser su reclutamiento de los músculos cercanos. De hecho, la 3S-HMGB1 y, en menor medida, la todo-tiol HMGB1 natural no modificada son fuertes quimioatrayentes para las células C2C12, que son una línea celular similar a los mioblastos (Fig. 8)

Por lo tanto, la 3S-HMGB1 muestra propiedades favorables para la regeneración del músculo dañado. De manera similar, 1S-HMGB1 y 2S-HMGB1 tienen propiedades terapéuticas para la regeneración del músculo dañado, aunque en menor medida en comparación con 3S-HMGB1.

Sorprendentemente, sin embargo, se observó una propiedad favorable adicional de 3S-HMGB1 tras el examen de los músculos TA 2 días después de la lesión inducida por CTX. Los músculos en los que se había inyectado tanto todo-tiol HMGB1 natural no modificada como 3S-HMGB1 parecían menos dañados que los músculos de control, como lo demuestra la tinción con H & E (Figura 9). Las células infiltrantes inflamatorias eran menos y, en particular en los ratones a los que se había inyectado 3S-HMGB1, las fibras musculares parecían más numerosas y más grandes que en el músculo al que se había inyectado CTX de control. Varias de estas fibras contenían núcleos localizados periféricamente, lo que indica que las fibras eran maduras, en lugar de regenerarse. Por lo tanto, 3S-HMGB1 limita el daño muscular y la muerte de la fibra inmediatamente después de la lesión, además de favorecer su regeneración en tiempos más largos.

Utilización de 3S-HMGB1 para limitar el daño miocárdico y favorecer la curación después del infarto

Ya se ha demostrado que la HMGB1 mejora la recuperación funcional del corazón después del infarto (30). En este caso, la apariencia histológica del área sometida a reperusión por hipoxia y en la que se inyecta todo-tiol HMGB1 parece haber mejorado mucho, con la presencia notable de cardiomiocitos en números mucho mayores en comparación con controles en los que no se ha inyectado HMGB1. A la luz de los resultados referidos en la sección anterior con el músculo esquelético, se podría evitar la muerte de las células del músculo cardíaco inmediatamente después del daño. Se puede utilizar 3S-HMGB1 con efectos superiores en comparación con HMGB1 wt para limitar el daño y favorecer la curación después de un infarto de miocardio. También se pueden utilizar 1S-HMGB1 y 2S-HMGB1.

Utilización de 3S-HMGB1 para limitar el daño de tejido duro y favorecer la cicatrización después de una lesión

La HMGB1 ha estado involucrada en el desarrollo de hueso y cartílago (33). Dada que la ontología de las células musculares, óseas y cartilaginosas es común, todas estas células son de origen mesodérmico derivando de somitas y dado que los procesos de desarrollo se utilizan de manera rutinaria en la vida adulta para la reparación y regeneración del tejido dañado, 3S-HMGB1 puede ser útil para limitar el daño y favorecer la cicatrización después de una lesión de huesos y cartílagos, incluidos los derivados de fracturas.

En conclusión, los autores muestran que las actividades del Patrón Molecular Asociado al Daño (DAMP) de HMGB1 - reclutamiento de leucocitos y su activación para secretar citoquinas proinflamatorias - dependen de estados redox diferentes y mutuamente excluyentes del mismo polipéptido, que se pueden modificar dentro del tejido lesionado después de su liberación. Los autores muestran que las formas no oxidables de HMGB1 pueden reclutar células, tanto del parénquima como de la circulación, pero no provocan inflamación. La inyección de una forma no oxidable de HMGB1 en el músculo esquelético después del daño no polariza las células inflamatorias hacia el estado inflamatorio, sino más bien hacia el estado reparador M2, y sorprendentemente limita la muerte de las células musculares; uno o ambos efectos conducen a una regeneración muscular superior. Dada la participación de HMGB1 en la reparación y/o desarrollo del corazón, el hueso y el cartílago, la administración de formas no oxidables de HMGB1, en particular 3S-HMGB1 debe conducir también a una mejor reparación y cicatrización del tejido de corazón, hueso y cartílago después de la lesión.

Referencias

1. Bianchi, M.E. (2007) *Journal of leucocyte biology* **81**, 1-5

2. Andersson, U., y Tracey, K.J. (2012) *Annu Rev Immunol* **30**, 313-335
3. Yang, H., et al., (2010) *PNAS* **107**, 11942-11947
4. Yang, H., et al., (2011) *Molecular medicine*
5. Yang, H., et al., (2012) *Mol Med* **18**, 250-259
- 5 6. Knapp, S., et al., (2004) *Biochemistry* **43**, 11992-11997
7. Antoine, D.J., et al., (2009) *Toxicol Sci* **112**, 521-531
8. De Lorenzi, R., et al., (2009) *Genesis* **47**, 323-329
9. Sung, MH, et al., (2009) *PLoS One* **4**, e7163
10. Schiraldi, M., et al., (2012) *J Exp Med* **209**, 551-563
- 10 11. Palumbo, R., et al., (2007) *The Journal of cell biology* **179**, 33-40
12. Park, S., y Lippard, S.J. (2011) *Biochemistry* **50**, 2567-2574
13. Kazama, H., et al., (2008) *Immunity* **29**, 21-32
14. Andersson, U., et al., (2000) *J Exp Med* **192**, 565-570
15. Li, J., et al., (2004) *J Immunol Methods* **289**, 211-223
- 15 16. Bianchi, M.E. (2009) *J Leukoc Biol* **86**, 573-576
17. Youn, J.H., et al., (2008) *J Immunol* **180**, 5067-5074
18. Sitia, G., et al., (2011) *PLoS pathogens* **7**, e1002061
19. Sitia, G., et al., (2007) *J Leukoc Biol* **81**, 100-107
20. Orlova, V.V., et al., (2007) *The EMBO Journal* **26**, 1129-1139
- 20 21. Andrassy, M., et al., (2008) *Circulation* **117**, 3216-3226
22. Muhammad, S., et al., (2008) *J Neurosci* **28**, 12023-12031
23. Rubartelli, A., y Sitia, R. (2009) *Antioxidants and redox signaling* **11**, 2621-2629
24. Carta, S., et al., (2009) *Journal of leukocyte biology* **86**, 549-555
25. Urbonaviciute, V., et al., (2009) *Autoimmunity* **42**, 305-307
- 25 26. Kang, R., et al., (2011) *Autophagy* **7**, 904-906
27. Ownby, C.L., Fletcher, J.E., y Colberg, T.R. (1993) *Toxicon* **31**, 697-709
28. Biscetti, F., et al., (2011) *Current vascular pharmacology* **9**, 677-681
29. Straino, S., et al., (2008) *J Invest Dermatol* **128**, 1545-1553
30. Limana, F., et al., (2005) *Circ Res* **97**, e73-83
- 30 31. De Mori, R., et al., (2007) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2377-2383
32. Vezzoli, M., et al., (2010) *Ann N Y Acad Sci* **1209**, 83-90
33. Taniguchi, N., et al., (2007) *Mol Cell Biol* **27**, 5650-5663
34. Vezzoli M. y otros, (2011) *Antioxid Redox Signal* **15(8)**, 2161-74

Listado de secuencias

<110> Ospedale San Raffaele SRL Università degli Studi di Milano-Bicocca BIANCHI, Marco Emilio BRUNELLI, Silvia VENEREAU, Emilie Joelle CASALGRANDI, Maura

<120> Variantes de HMGB1 y sus usos

5 <130> 120804

<150> US 61676071

<151> 26-07-2012

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 661 500 T3

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

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

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu 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
210 215

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 661 500 T3

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

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

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

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

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
210 215

<210> 3
<211> 89
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe
85

<210> 4
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador sintético

<400> 4

15 tgacggggtc acccacactg tgccc 25

<210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> cebador sintético
 <400> 5
 ctagaagcat tgcggtggac gatgg 25
 <210> 6
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 10 <400> 6
 agcccatgtt gtagcaaacc 20
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 7
 aggacctggg agtagatgag g 21
 20 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> cebador sintético
 <400> 8
 tacccccagg agaagattcc 20
 <210> 9
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 9
 35 ttttcaccag gcaagtctcc 20
 <210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 10
 tgccaaggag tgctaaag 18
 45 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 11
 5 ctccacaacc ctctgcac 18
 <210> 12
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 12
 tgccagtgct tgcagac 17
 15 <210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 20 <400> 13
 tcttaaccat gggcgatgc 19

REIVINDICACIONES

1. Una variante de HMGB1, caracterizada porque es un quimioatrayente celular y no estimula la producción de citoquinas y/o quimioquinas a partir de una célula, derivados y fragmentos de la misma para su uso en un método para inducir regeneración tisular, en donde dicha variante de HMGB1 consiste en SEQ ID NO: 1 en la que los
5 residuos de cisteína localizados en las posiciones 23, 45 o 106 son remplazados cada uno por un residuo de aminoácido que contiene el mismo número de átomos de carbono que la cisteína, en donde los derivados tienen un porcentaje de identidad de al menos 85% con SEQ ID NO: 1 y en donde los fragmentos tienen una longitud de al menos 84 aminoácidos, siendo dichos derivados y fragmentos quimioatrayentes celulares y no estimulando la
10 producción de citoquinas y/o quimioquinas a partir de una célula y comprendiendo cada uno los residuos de cisteína localizados en las posiciones 23, 45 o 106 de SEQ ID NO: 1 remplazados por un residuo de aminoácido que contiene el mismo número de átomos de carbono que la cisteína.
2. La variante de HMGB1 o derivados y fragmentos de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los tres residuos de cisteína son reemplazados cada uno por un residuo de serina.
3. Una composición farmacéutica para su uso en un método para inducir la regeneración tisular, que comprende
15 diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables y un compuesto seleccionado del grupo que comprende:
 - la variante de HMGB1 o derivados y fragmentos de la misma como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
 - un polinucleótido que codifica dicha variante de HMGB1 o derivados y fragmentos de la misma como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
 - 20 - un vector que comprende dicho polinucleótido y
 - una célula anfitriona modificada genéticamente que expresa dicho polipéptido.
4. La variante de HMGB1 o derivados y fragmentos de la misma como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la composición farmacéutica como se define en la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una patología que requiere regeneración tisular y/o muscular.
- 25 5. La variante de HMGB1 o derivados y fragmentos de la misma como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la composición farmacéutica como se define en la reivindicación 3, para su uso en la prevención y/o la reparación de la lesión del músculo y/o hueso y/o cartílago y/o tejido blando, preferiblemente la lesión es inducida por necrosis, preferiblemente la lesión del hueso es consecuencia de una fractura.
- 30 6. La variante de HMGB1 o derivados y fragmentos de la misma o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el músculo es músculo esquelético o cardíaco.

A a1)

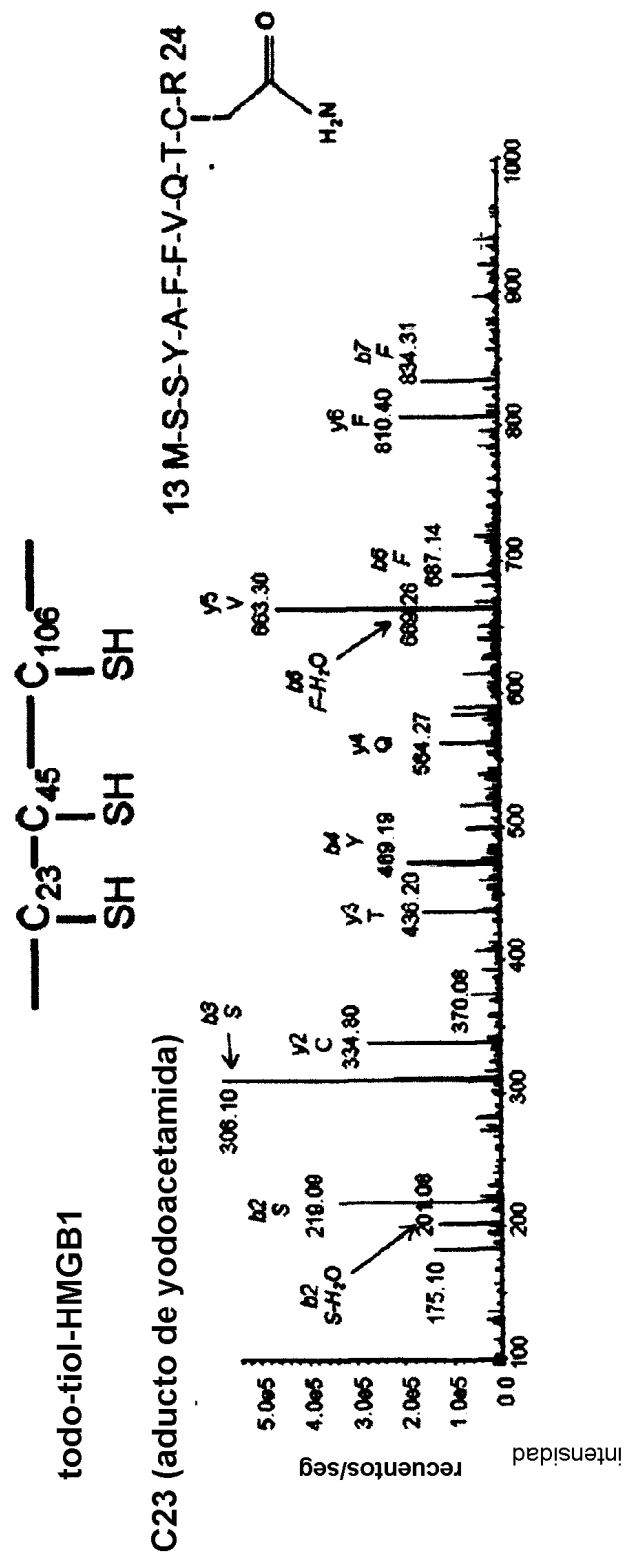


Fig. 1

A a1)

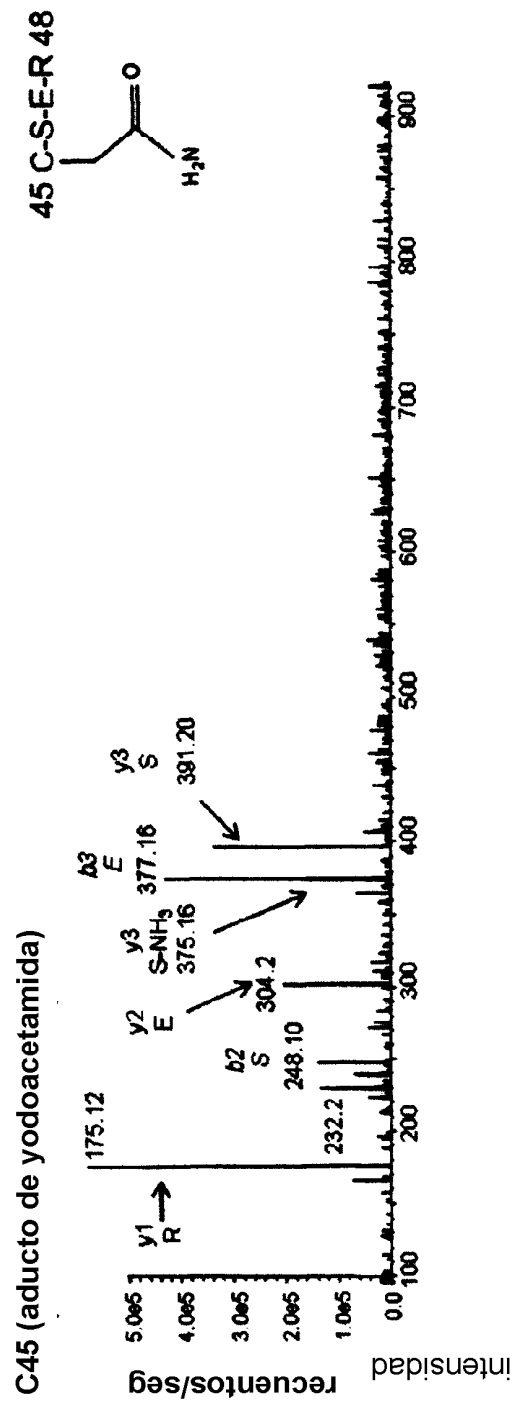
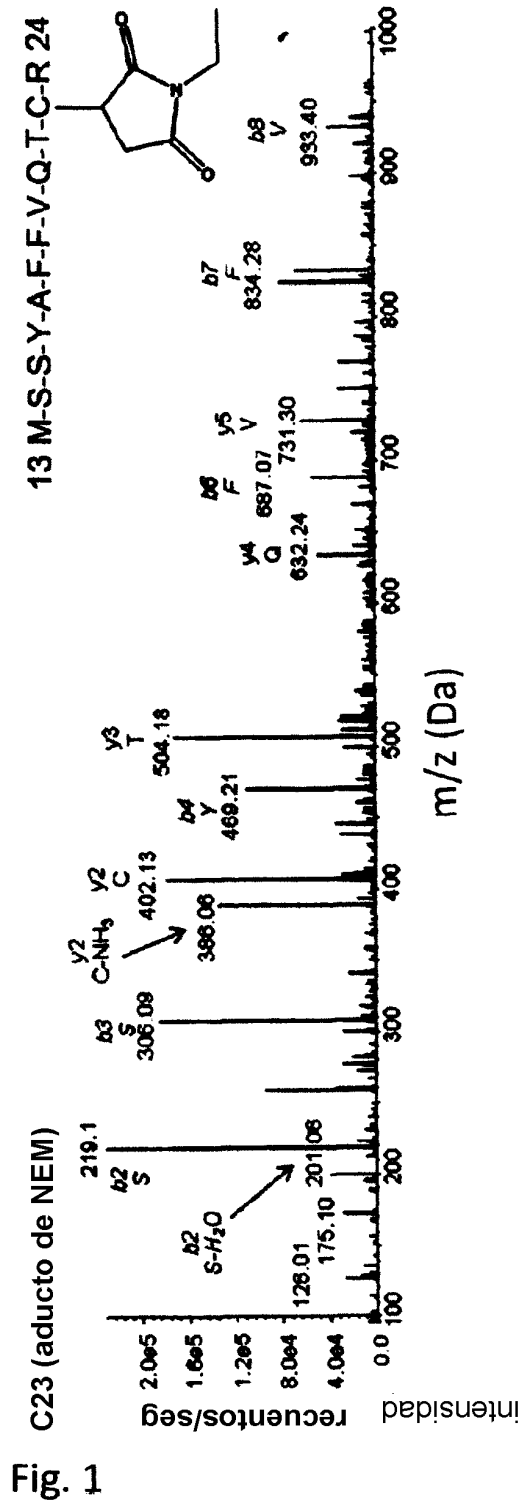
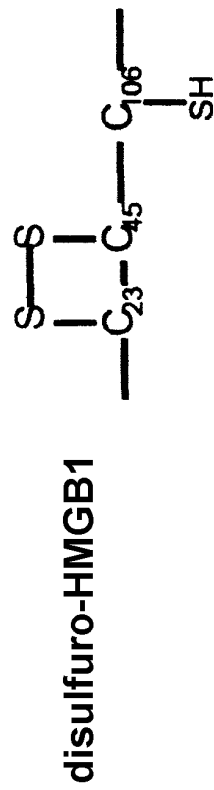


Fig. 1

A

a2)



A

a2)

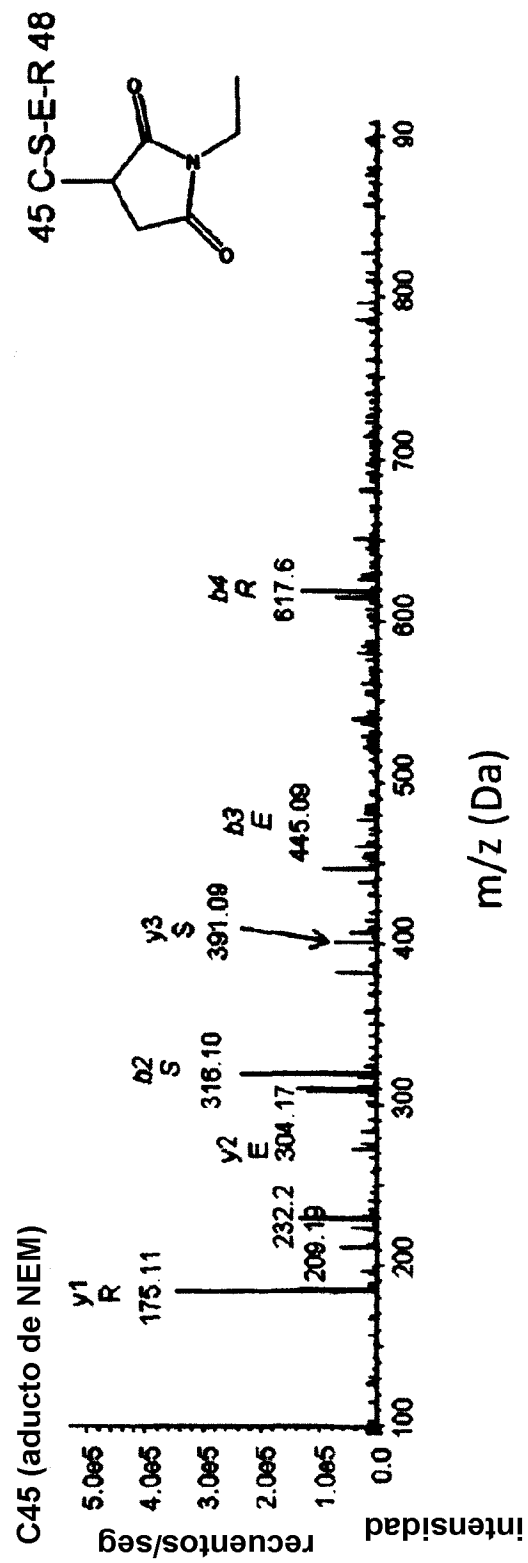


Fig. 1

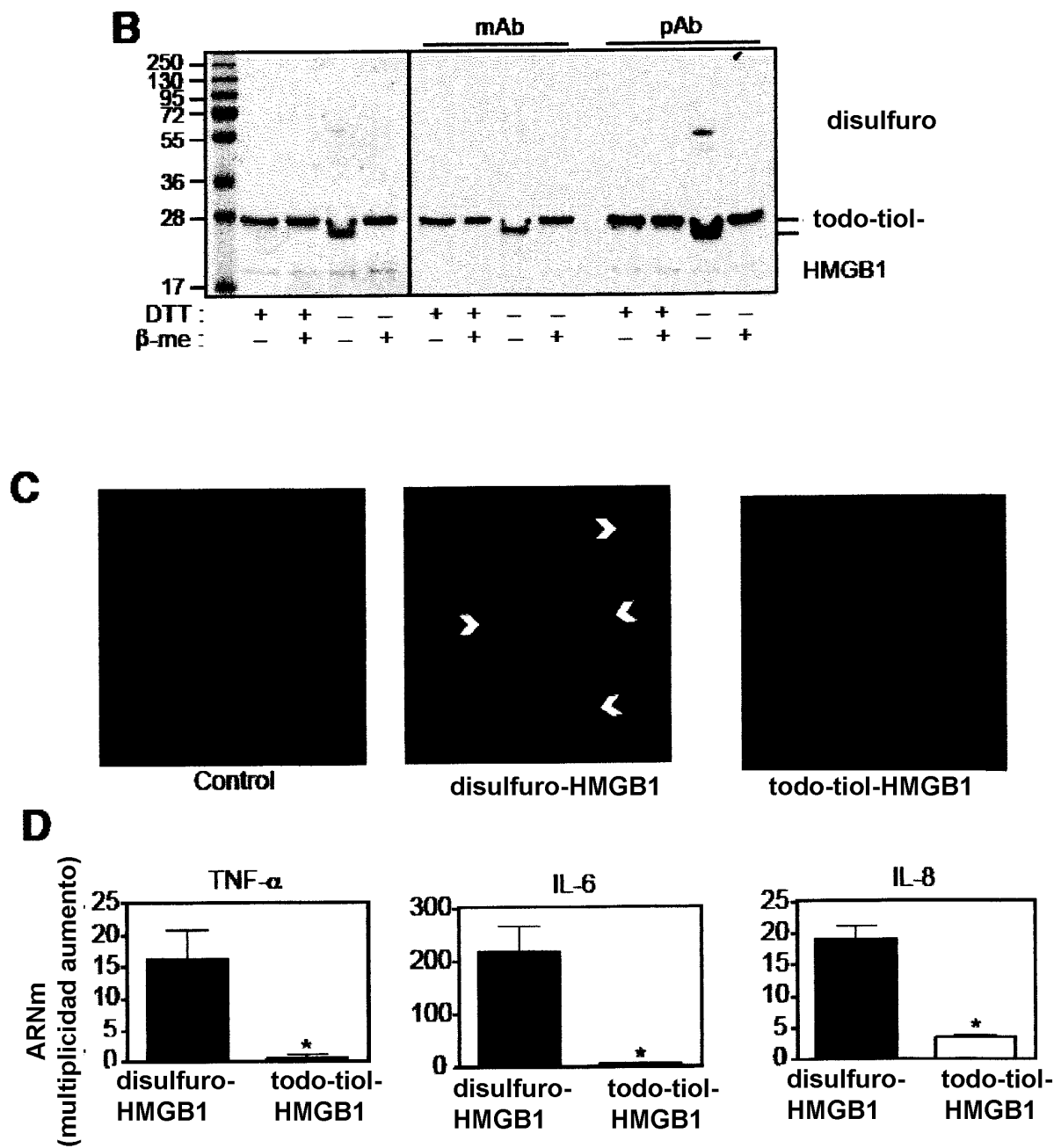


Fig. 1 (3/3)

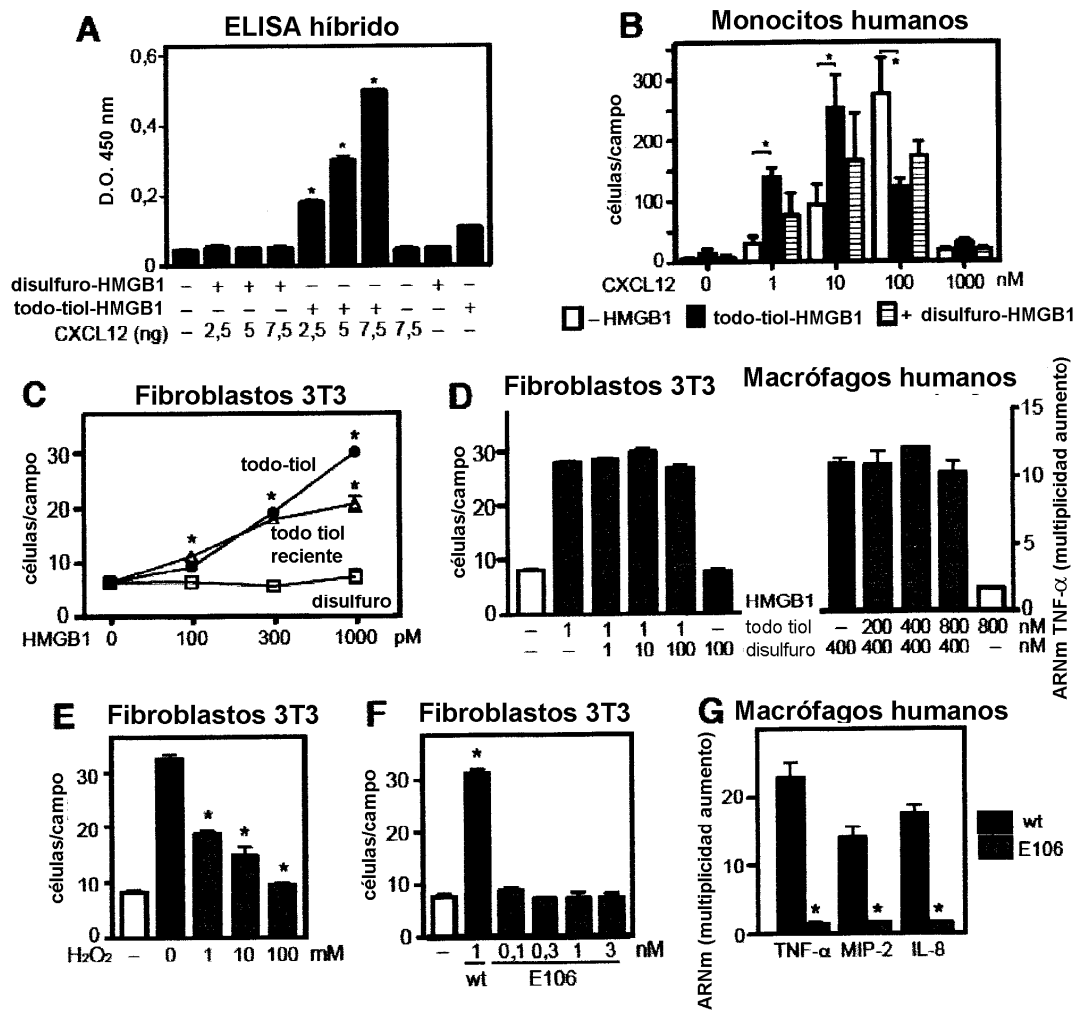


Fig. 2

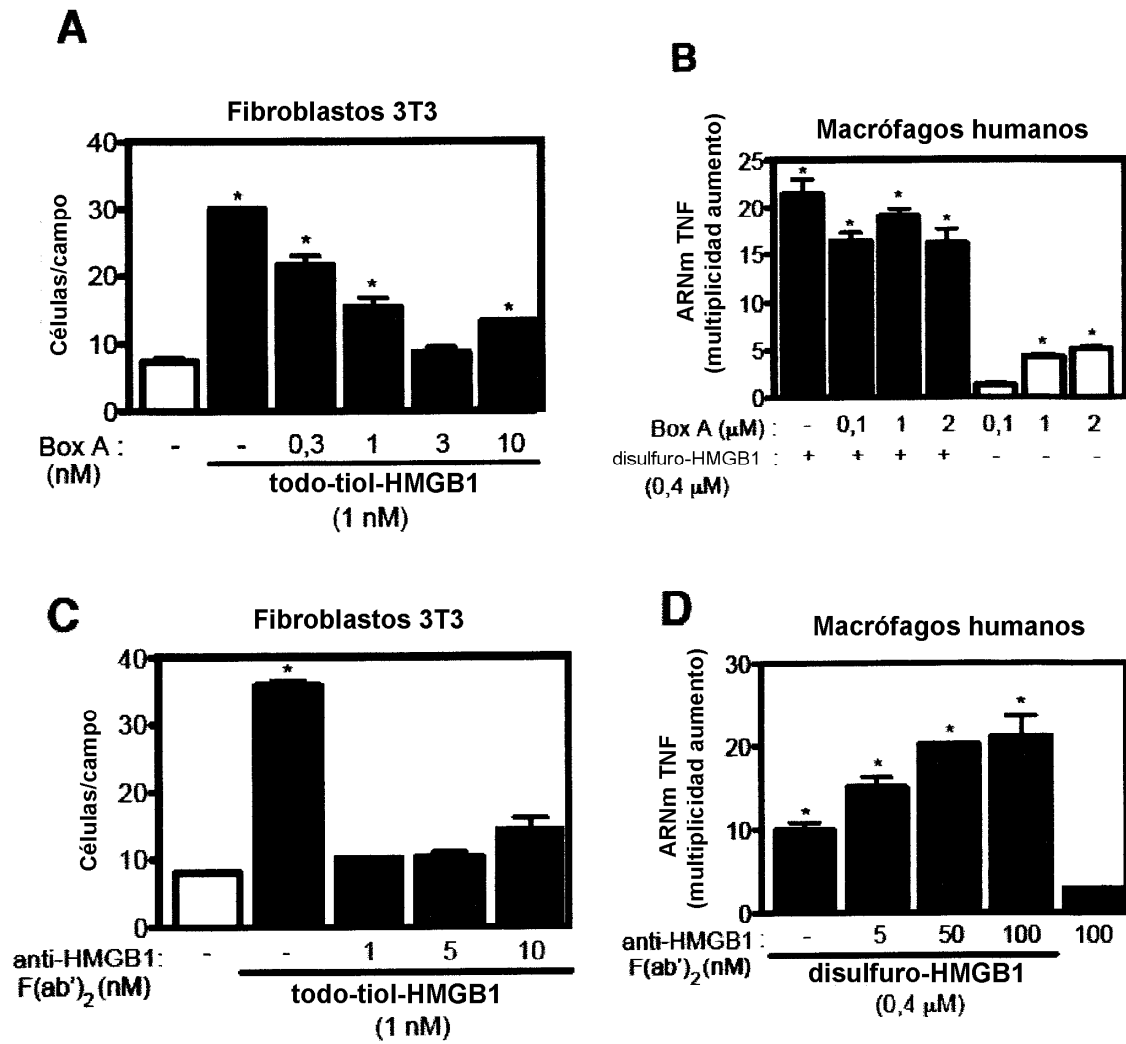


Fig. 3

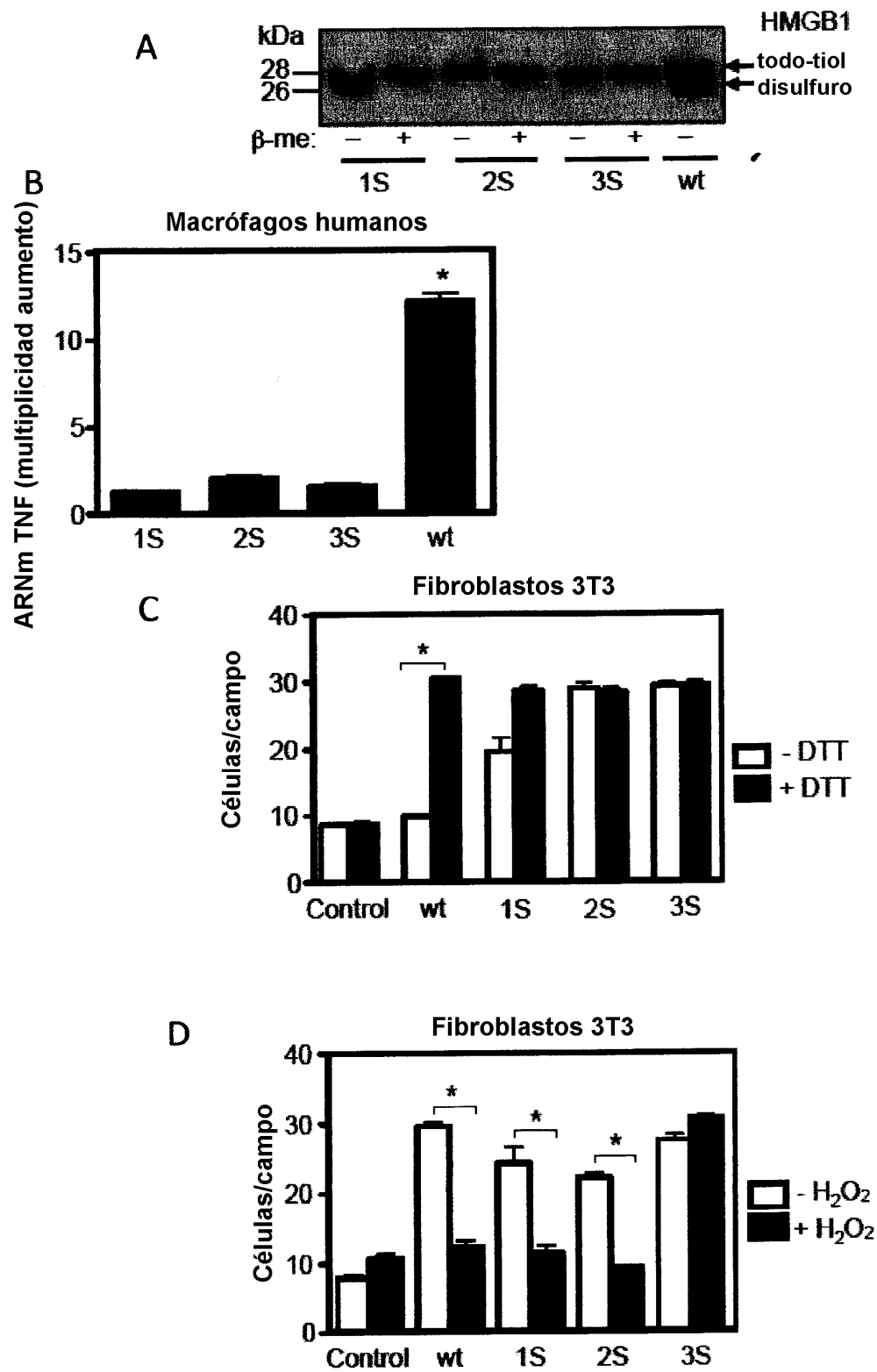


Fig. 4

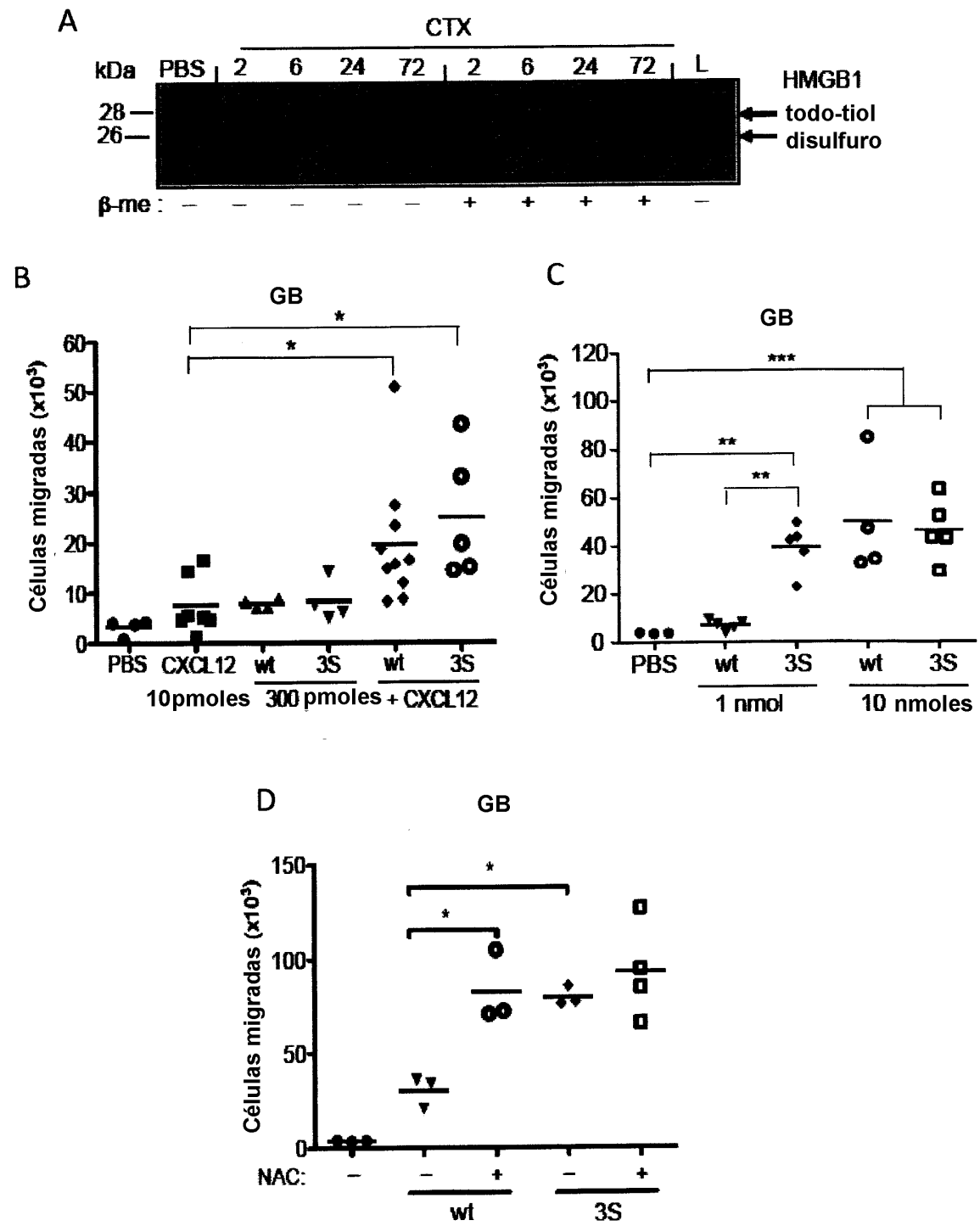


Fig. 5

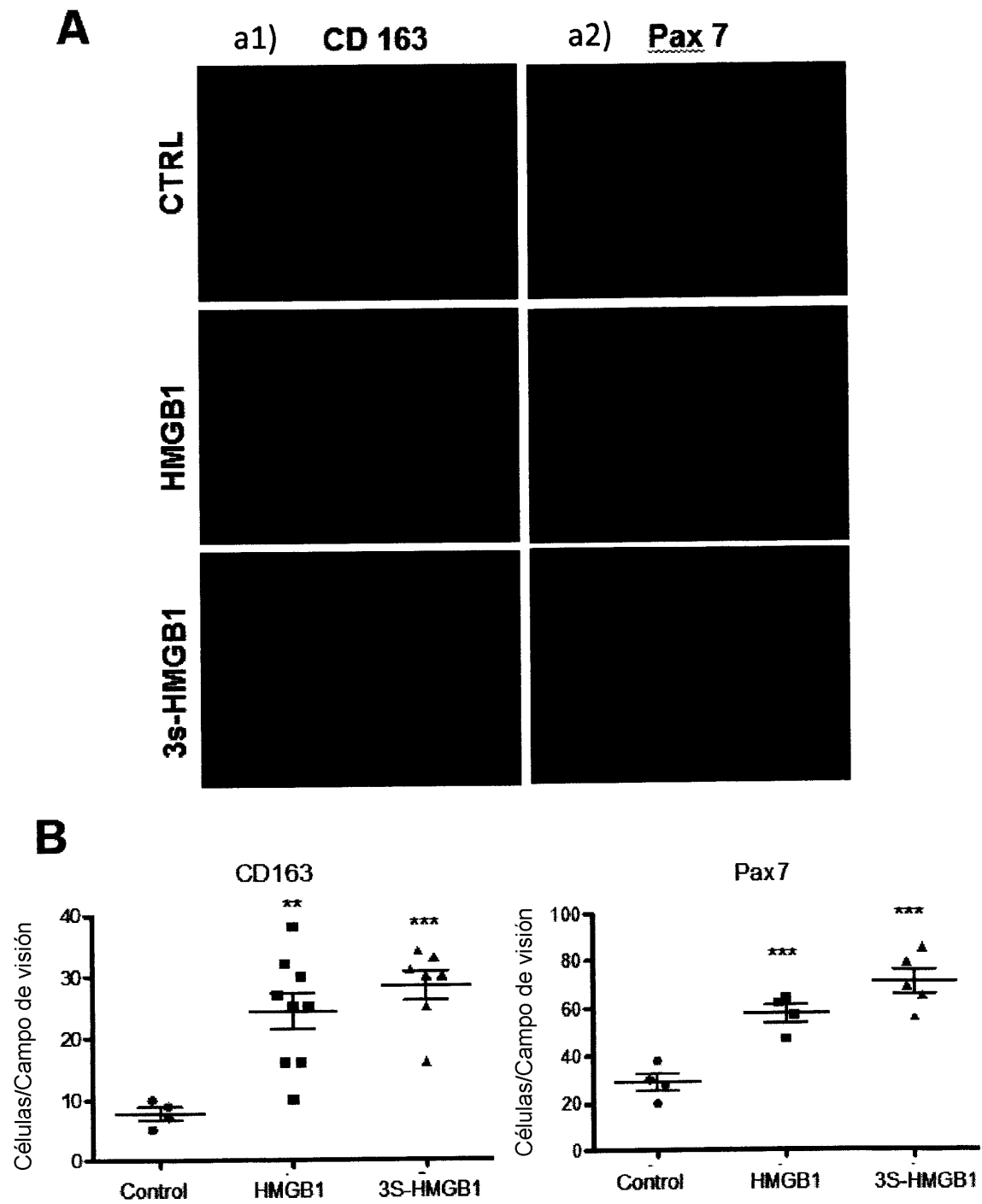


Fig. 6

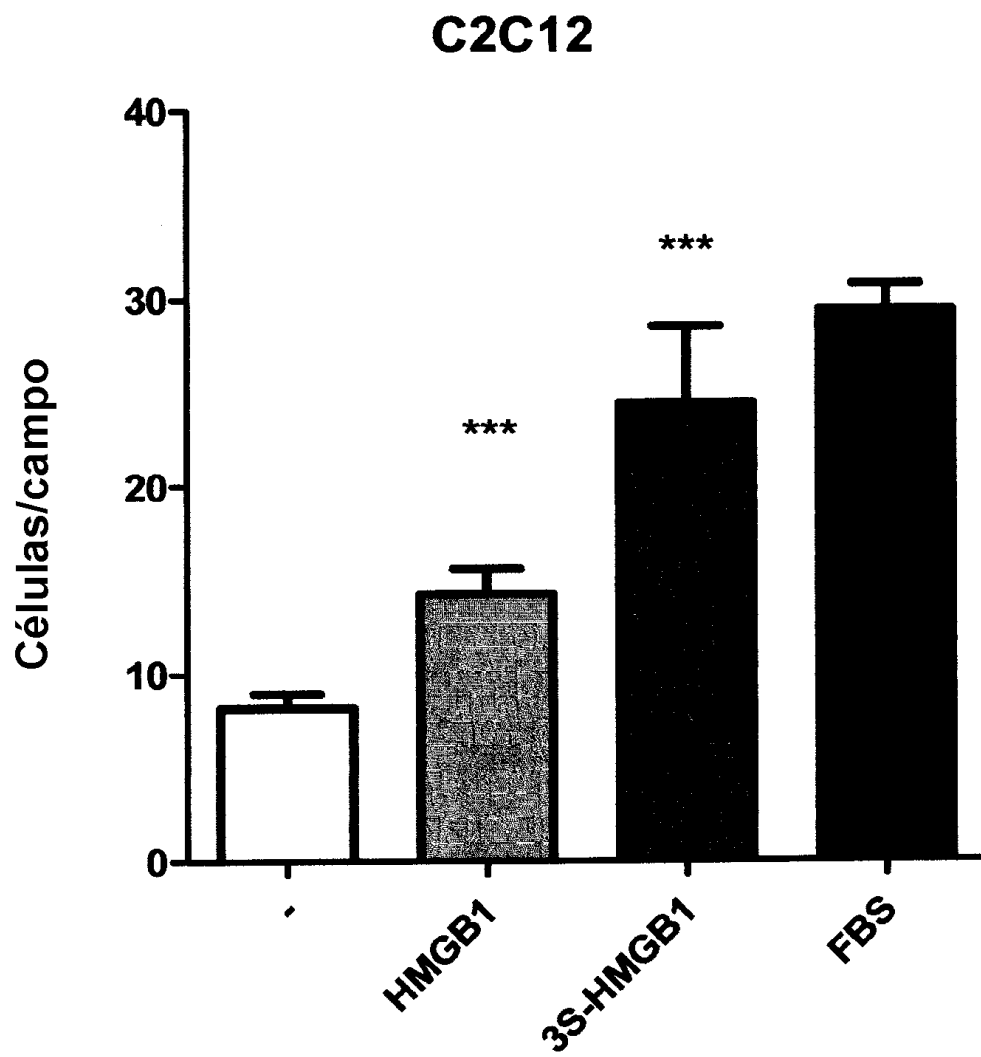


Fig. 7

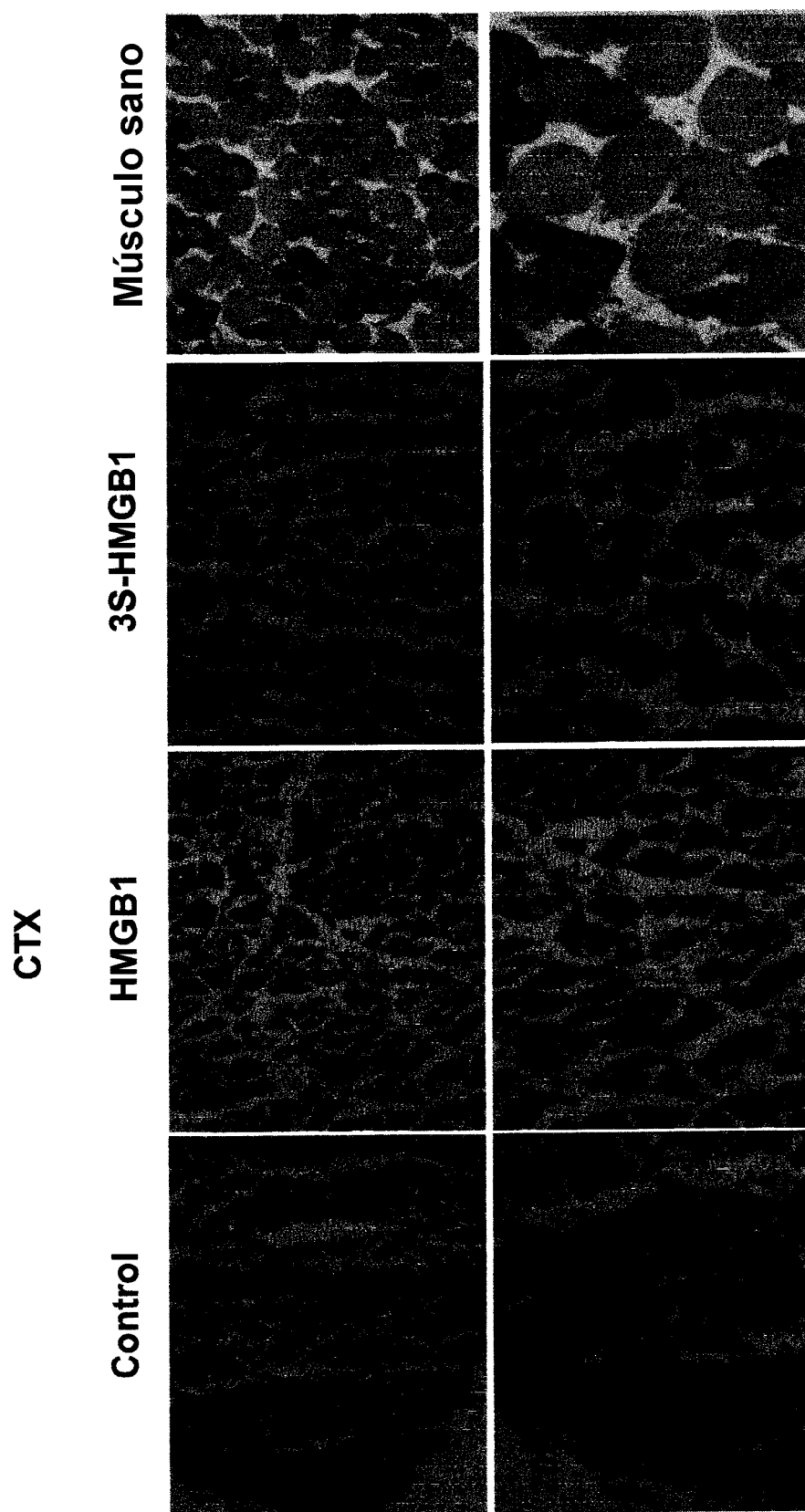


Fig. 8

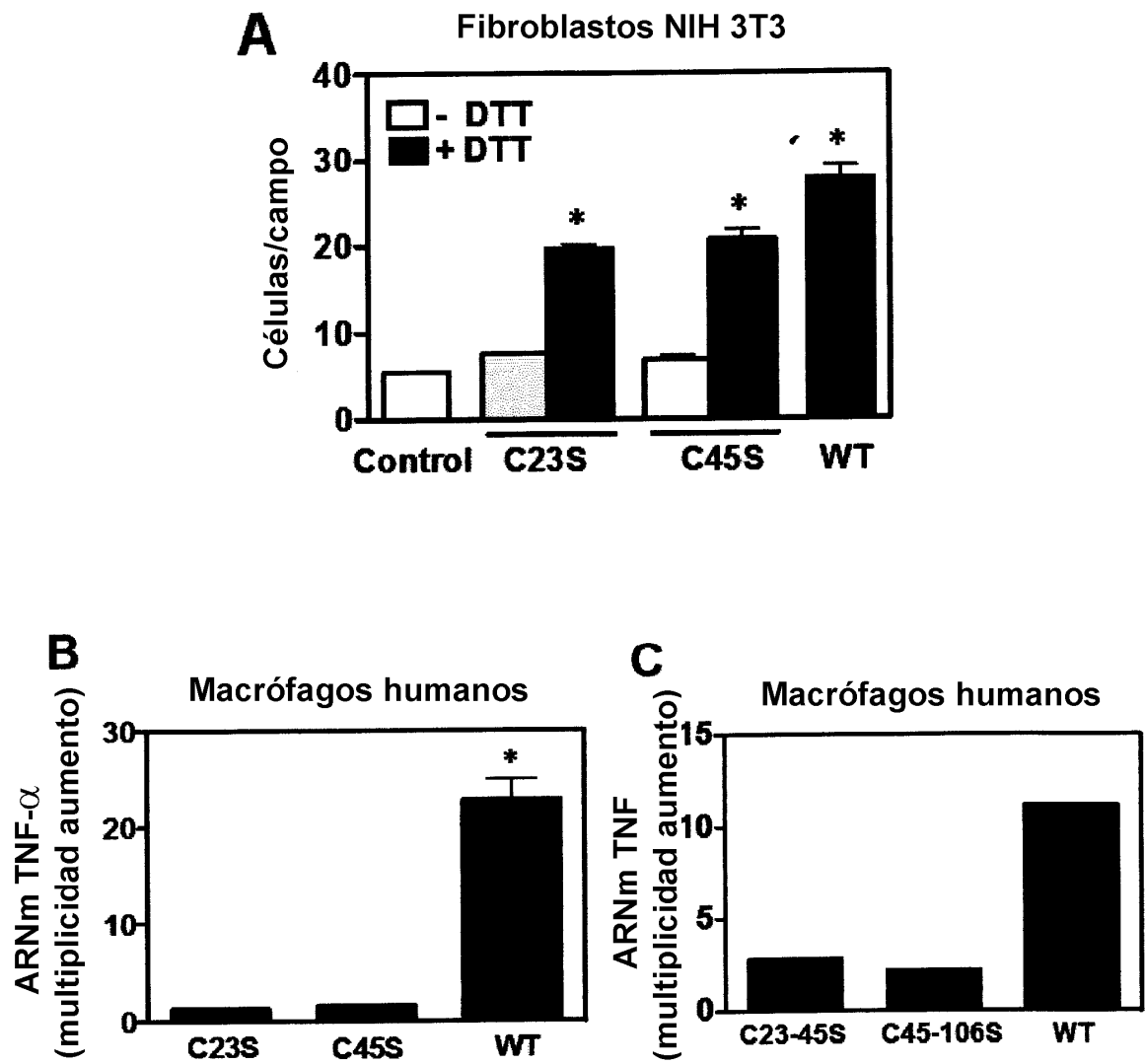


Fig. 9