



## DESCRIPCIÓN

Uso de la anfiregulina como un agente protector en el daño hepático agudo.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología aplicada al sector médico-farmacéutico para el tratamiento de las enfermedades hepáticas y, en especial, del daño hepático agudo como por ejemplo del fallo hepático agudo (FHA).

Más específicamente, la presente invención proporciona un nuevo tratamiento para dicha enfermedad basado en el uso de la anfiregulina (AR).

**Estado de la técnica anterior a la invención**

El daño hepático agudo es una patología extremadamente grave que puede expresarse como fallo hepático agudo (FHA) que se origina como consecuencia de la pérdida de masa funcional hepática debido a la muerte del hepatocito. El FHA no es una enfermedad en si mismo, sino un síndrome de severidad proporcional al grado de pérdida de masa hepatocitaria. Esta es una situación patológica dramática cuyas complicaciones tienen una repercusión multiorgánica que incluye encefalopatía, edema cerebral, sepsis, fallo respiratorio y renal, sangrado intestinal y colapso cardiovascular [Sanyal, A.J., Stravitz, R.T. The liver. Capitulo 16. Págs.: 445-496. Zakim y Boyer Eds. Saunders. Filadelfia. 2003].

A pesar de no ser una afección muy común, da lugar a una mortalidad comprendida entre el 40% y el 95% de los casos [Sanyal, A.J., Stravitz, R.T. The liver. Capitulo 16. Págs.: 445-496. Zakim y Boyer Eds. Saunders. Filadelfia. 2003; y Galun, E., Axelrod, J.H. Biochim. Biophys. Acta. 1592:345-358.2002 (identificada como (15) mas adelante)].

La etiología del FHA es diversa, presentando variabilidad geográfica, siendo importante su correcta definición a la hora de emitir un pronóstico y de instaurar un tratamiento.

Entre los agentes causantes de FHA pueden mencionarse los virus de la hepatitis, ciertos fármacos y toxinas, determinadas alteraciones metabólicas, algunos casos de isquemia aguda y la resección masiva del parénquima hepático [Sanyal, A.J. *ibid*; Galun, E. *ibid*].

La resolución con éxito del FHA depende tanto de la posibilidad de inhibir el daño hepatocelular como de la regeneración del parénquima dañado. La mayoría de los recursos terapéuticos disponibles en la clínica actual se dirigen a paliar las manifestaciones multiorgánicas del FHA, sin embargo no existen estrategias terapéuticas capaces de reducir la necrosis y apoptosis ni de promover la regeneración de los hepatocitos, siendo finalmente el trasplante hepático la única alternativa posible [Sanyal, A.J. *ibid*; Galun, E. *ibid*] para curación del paciente.

Se conoce que los mecanismos citoprotectores y regenerativos se ponen en marcha en el hígado después de la pérdida de masa de parénquima hepático debida a una hepatectomía parcial (HP) o después de una lesión o daño de origen tóxico, viral, isquémico o inmunológico [(1) Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C. 1997. Liver regeneration. Science 276: 60-66. (2) Fausto, N. 2000. Liver regeneration. J. Hepatol. 32 (suppl 1): 19-31. (3) Taub, R.A. 2003. Hepatic regeneration. In The Liver. D. Zakim, J.L. Boyer, editores Saunders, Philadelphia. U.S.A. 31-48]. Diferentes aproximaciones experimentales han ayudado a perfilar los mecanismos subyacentes que contribuyen a preservar la función hepática y a restaurar la masa hepática funcional después de un daño hepático grave [(4) Koniaris, L.G., McKillop, I.H., Schwartz, S.I., Zimmers, T.A. 2003. Liver regeneration. J. Am. Coll. Surg. 197: 634-659]. Esta respuesta compleja está mediada por una red de citoquinas, comitógenos y factores de crecimiento en un proceso que se desarrolla en una serie de etapas de manera coordinada [(2), (3), (5) Kosai, K., Matsumoto, K., Nagata, S., Tsujimoto, Y., Nakamura, T. 1998. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: 683-690. (6) Éthier, C., Raymond, V-A., Musallam, L., Houle, R., and Bilodeau, M. 2003. Antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes associated with downregulation of proapoptotic Bid protein. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 285: G298- G308. (7). Kanda, D., Takagi, H., Toyoda, M., Horiguchi, N., Nakajima, H., Otsuka, T., Mori, M. 2002. Transforming growth factor  $\alpha$  protects against Fas-mediated liver apoptosis in mice. FEBS Lett. 519: 11-15]. Se considera que muchas de las citoquinas y factores de crecimiento que son críticos en la respuesta regenerativa frente al daño o lesión o resección en animales, se expresan también en humanos durante la regeneración del hígado, lo que sugiere la conservación de los mecanismos fundamentales entre especies (4).

A nivel experimental se ha demostrado que la administración a animales (rata y ratón) de determinados factores de crecimiento y citoquinas protegen frente al FHA, evitando la muerte celular y estimulando la regeneración del parénquima hepático. Entre dichos factores cabe citar el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) . [Kosai, K., Matsumoto, K. Nagata, S., Tsujimoto, Y., Nalamura, T. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244:683-690.1998 identificada como (5) más adelante; Kand, D., Takagi, H., Toyoda, M., Horiguchi, N., Nakajima, H., Otsuka, T., Mori, M. FEBS Lett. 519-11-15.2002; y Ethier, C., Raymond, V.A., Musallam, L., Houle, R., Bilodeau, M. Am. J. Physiol. 285: G298-G308.2003]. Entre las citoquinas pueden mencionarse la interleuquina 6 (IL-6) y la cardiotrofina-1 (CT-1).[Kovalovich, K., DeAngelis,

R.A., Li, W., Durth, E.E, Ciliberto, G., Taub, R. *Hepatology* 31:149-159.2000 identificada como (26) más adelante; y Bustos, M., Beraza, N., Lasarte, J.J., Baixeras, E., Alzuguren, P., Bordet, T., Prieto, J. *Gastroenterology* 125:192-201.2003 identificada como (43) más adelante]. La regeneración del hígado es una respuesta única dirigida a restaurar la masa hepática después de una resección del parénquima o de un daño hepático. Las señales de supervivencia y proliferación son transmitidas por una compleja red de citoquinas y de factores de crecimiento que actúan de forma ordenada. Sin embargo, a pesar de las intensas investigaciones llevadas a cabo en las últimas décadas, las moléculas y mecanismos implicados en la respuesta adaptativa fisiológica frente al daño hepático no son completamente conocidos.

Los inventores han observado recientemente que la expresión del gen WT1 supresor del tumor de Wilms se induce en el hígado de pacientes con daño hepatocelular así como en el hígado de ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> [(8) Berasain, C., Herrero, J.I., García-Trevijano, E.R., Avila, M.A., Esteban, J.I., Mato, J.M., and Prieto, J. 2003. Expression of Wilms' tumor suppressor in the cirrhotic liver: relationship to HNF4 levels and hepatocellular function. *Hepatology* 38: 148-157]. El gen WT1 codifica para un factor de transcripción provisto de dedos de zinc que puede regular la expresión de una diversidad de genes relacionados con el crecimiento y la diferenciación [(9) Scharnhorst, V., Van der Eb, A.J, and Jochemsen, A.G. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. 2001]. *Gene* 273:141-161].

Una de las principales dianas fisiológicas directamente inducidas por WT1 es la anfíregulina (AR) [(10) Lee, S.B., Huang, K., Palmer, R., Truong, V.B., Herzlinger, D., Kolquist, K.A., Wong, J., Paulding, C., Yoon, S.K., Gerald, W., Oliner, J.D., and Haber, D.A. 1999. The Wilms tumors suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* 98: 663-673]. La AR es un factor de crecimiento polipeptídico de la familia del EGF y un ligando del receptor de EGF (EGF-R), que fue originalmente aislada de medio condicionado de células de carcinoma de mama humano MCF-7 tratadas con 12-miristato 13-acetato de forbol [(11) Shoyab, M., McDonald, V.L., Bradley, G., and Todaro, G.J. 1988. Amphiregulin: a bifunctional growth- modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6528-6532]. Al igual que el EGF y TGF $\alpha$ , la AR se sintetiza como un precursor transmembrana que se procesa proteolíticamente hasta la forma madura secretada [(12) Lee, D.C., Sunnarborg, S.W., Hinkle, C.L., Myers, T.J., Stevenson, M.Y., Russell, W.E, Castner, B.J., Gerhart, M.J., Paxton, R.J., Black, R.A., Chang, A., and Jackson, L.F. 2003. TACE/ADAM17 processing of EGF-R ligands indicates a role as a physiological convertase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 995: 22-38]. La expresión de la AR es tejido-específica. En humanos se ha observado que es más predominante en el ovario y la placenta e indetectable en el hígado [(13) Plowman, G.D., Green, J.M., McDonald, V.L., Neubauer, M.G., Disteché, C.M., Todaro, G.J., and Shoyab, M. 1990. The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Mol. Cell Biol.* 10: 1969-1981].

La AR muestra propiedades bifuncionales, estimulando la proliferación de una diversidad de células normales e inhibiendo la de numerosas líneas celulares tumorales [(10), (13) y (14) Kato, M., Inazu, T., Kawai, Y., Masamura, K., Yoshida, M., Tanaka, N., Miyamoto, K., and Miyamori, I. Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A75. 2003. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301: 1109-1115].

La patente US-5115096 describe las características físico-químicas de la anfíregulina y su efecto antiproliferativo sobre células cancerosas de origen epitelial, así como su uso en el tratamiento de heridas y en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Se hace referencia a cierto nivel reducido de producción de anfíregulina en el hígado de lo que se deduce que aparentemente "juega algún papel funcional".

La patente US-5980885 describe un método en el que se usa la AR, junto con el factor de crecimiento de fibroblastos, para inducir la proliferación de células precursoras en tejidos neuronales de mamíferos.

La patente US-6204359 describe el uso de una nueva forma de AR producida por queratinocitos en el tratamiento de heridas y del cáncer.

La solicitud de patente US-20011051358 describe la obtención y el uso de polipéptidos del factor de crecimiento epidérmico/extracelular (EEGF = Extracellular/Epidermal Growth Factor) para, entre otras aplicaciones, el tratamiento de trastornos hepáticos. Asimismo, hace referencia a la posibilidad de tratamientos relativos a la regeneración del hígado. No obstante, la AR sólo se menciona como un producto conocido del estado de la técnica que supuestamente queda superado por la invención descrita en ese documento.

La solicitud de patente WO-0145697 describe un agente regulador que inhibe la expresión de la AR y su uso para el tratamiento de la piel humana.

Finalmente, la solicitud de patente WO-02102319 describe polinucleótidos que codifican para polipéptidos BGS-8 así como fragmentos y homólogos de los mismos, útiles, entre otras aplicaciones, para el tratamiento y la prevención de trastornos hepáticos y estados proliferativos que afectan al hígado. Se indica además que, debido a "la fuerte homología con miembros de la familia de las proteínas del factor de crecimiento epidérmico, tales como bFGF, PDGF, AR, betacelulina, cripto y TGF- $\alpha$ ", es de esperar que el polipéptido BGS-8 comparta al menos alguna actividad biológica con proteínas de dicha familia.

El estado de la técnica demuestra la necesidad de poder disponer de nuevas alternativas para el tratamiento del FHA. Por lo tanto, era deseable encontrar un tratamiento más eficaz del FHA basado en la aplicación de un factor de crecimiento o una citoquina, cuya administración produciría un efecto hepatoprotector en el FHA.

## 5 Descripción de la invención

Partiendo del estado de la técnica anteriormente descrito, los inventores han encontrado en sus investigaciones que, inesperadamente, la AR administrada externamente es útil como agente protector en el daño hepático agudo que, por ejemplo, puede conducir o ha conducido ya, a un fallo hepático agudo (FHA).

Por tanto, un objeto de la presente invención es el uso de la anfíregulina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del daño hepático agudo.

Otro objeto de la presente invención es el uso de tal medicamento, en que tal factor se administra, para potenciar una reacción protectora endógena primaria del tejido hepático frente al daño hepático agudo.

Aún otro objeto de la presente invención es el uso de la anfíregulina, en la fabricación de un medicamento que se administra para promover la síntesis del DNA en las células parenquimales del hígado en el daño hepático agudo.

Otro objeto de la presente invención es el uso de la AR en la fabricación de un medicamento que se administra para prevenir la muerte de las células parenquimales del hígado en el daño hepático agudo.

Todavía otro objeto es el uso de la AR en la fabricación de un medicamento que se administra para estimular la regeneración del parénquima remanente hepático tras un daño hepático agudo, de cualquier etiología.

Otro objeto de la invención es el uso de la AR en la fabricación de un medicamento útil para estimular la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial

Aún otro objeto de la invención es el uso de la AR en la fabricación de un medicamento útil como fármaco hepatoprotector y estimulante de la regeneración hepatocitaria en pacientes receptores de trasplante hepático de vivo o de cadáver.

La anfíregulina es, por tanto, útil en el tratamiento del daño hepático agudo por administración a un paciente necesitado de tal tratamiento. Así, la anfíregulina puede emplearse en un método para el tratamiento del daño hepático agudo que comprende administrar una cantidad eficaz de AR a un paciente que tenga necesidad de ello. Dentro de este uso, la AR puede usarse por ejemplo en un método de tratamiento en el que dicha AR se administra a un paciente que precisa tal tratamiento, para

\* potenciar una reacción protectora endógena primaria del tejido hepático frente al daño hepático agudo, y/o

\* promover la síntesis del DNA en los hepatocitos durante el daño hepático agudo, y/o

\* prevenir la muerte de los hepatocitos durante el daño hepático agudo, y/o

\* estimular la regeneración del parénquima hepático remanente tras un daño hepático agudo, y/o

\* potenciar una reacción protectora endógena primaria del tejido hepático frente al daño hepático agudo, y/o promover la síntesis de DNA en hepatocitos, y/o

\* prevenir la muerte de hepatocitos en tejido hepático en pacientes con daño hepático agudo, y/o

\* estimular la regeneración del parénquima hepático remanente tras un daño hepático agudo de cualquier etiología, y/o

\* estimular la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial, y/o

\* estimular la regeneración hepatocitaria en pacientes receptores de trasplante hepático de vivo o de cadáver.

Los inventores han encontrado que, sorprendentemente, la AR es un factor que cuya administración es susceptible de inducir la supervivencia del hepatocito durante la lesión hepática. Así, se ha podido constatar que la AR se comporta como un factor mitogénico o proliferador. Los inventores han demostrado que la AR tiene capacidad de actuar directamente sobre hepatocitos aislados, fomentando su proliferación e inhibiendo la apoptosis. Estos efectos parecen ser mediados por la activación del EGF-R y de las quinasas 1/2 reguladas extracelularmente (ERK1/2), del factor de transcripción activador y transductor de señal-3 (STAT-3), de la quinasa N-terminal de c-jun (JNK) y de Akt. Además, la AR induce la expresión de dos mediadores de la supervivencia, TGF $\alpha$  y CT-1, en hepatocitos aislados.

Asimismo, los inventores han podido demostrar que la administración *in vivo* de AR a ratones sometidos a un daño hepático agudo con anticuerpo Jo2, que activa específicamente al receptor del ligando Fas, o con CCl<sub>4</sub>, dos

## ES 2 246 156 A1

modelos clínicamente relevantes de daño hepático [(4), (15) Galun, E., and Axelrod, J.H. 2002. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592: 345-358], dio como resultado una significativa protección del tejido hepático y la inhibición de la apoptosis. Por lo tanto, los hallazgos de los inventores muestran nuevas funciones para la AR en el hígado que demuestran su utilidad terapéutica para reducir el daño hepatocelular en los casos de lesiones o daños hepáticos graves.

Lo anterior pone de manifiesto las propiedades hepatoprotectoras de la anfiregulina y su efecto mitogénico sobre modelos de daño hepatocelular que son relevantes para la patología humana del daño hepático agudo.

La AR puede administrarse por inyección por vía parenteral y, especialmente, preferentemente por vía intravenosa si bien puede ser también administrarse subcutánea o intramuscularmente.

Las formas de administración parenteral se pueden obtener de manera en sí convencional mezclando la AR con tampones, estabilizantes, agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes tonificantes y/o agentes de suspensión. A fin de evitar efectos sobre los puentes disulfuro existentes en la molécula de AR, no deben incluirse componentes capaces de modificar (reducir) estos puentes disulfuro. Las composiciones son esterilizadas por técnicas conocidas y envasadas para ser administradas como inyecciones.

Como tampones se pueden usar por ejemplo sales basadas en organofosfatos.

Ejemplos de agentes solubilizantes son aceite de ricino solidificado con polioxietileno, polisorbato 80, nicotinamida, y macrogol.

Como estabilizantes sulfito sódico, metasulfito sódico; y como agentes conservantes se pueden usar ácido sórbico, cresol, paracresol y otros.

Como forma de administración preferente la preparación inyectable puede ser una solución, una emulsión o una dispersión estéril. Dicha preparación inyectable se prepara por disolución, emulsión o dispersión de la AR junto con uno o más excipientes, en agua para inyección.

Entre los excipientes que puede comprender la preparación inyectable para administración subcutánea se encuentran los tampones, dependiendo de la inyección en tejidos, con poder tamponante o sin poder tamponante, y dependiendo de la estabilidad del, o de los ingredientes activos a pH fisiológico. Entre los tampones se pueden citar las soluciones reguladoras como ácido cítrico-citrato sódico, ácido acético-acetato sódico, y carbonato monosódico-carbonato disódico entre otras.

Otros excipientes opcionales son agentes esterilizantes para evitar la presencia de pirógenos y/o contaminantes.

Otro componente opcional de la composición farmacéutica para administración por vía subcutánea es uno o más agentes vehiculizantes, tales como por ejemplo agua, hidrocarburos, alcoholes, polioles, éteres, aceites vegetales, lanolina, metilcetona, entre otros.

Las composiciones inyectables por vía intravenosa o intraperitoneal pueden estar diseñadas para permitir, en una o varias dosis, la administración de 0,5 a 1,8 mg/kg de peso corporal del paciente por día, como por ejemplo de 0,85 a 1,55 mg/kg de peso corporal del paciente por día y más específicamente de 1 a 1,5 mg/kg de peso corporal del paciente por día.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1A: Expresión del gen AR en cirrosis hepática humana y experimental, medida mediante PCR en tiempo real en muestras de hígado procedente de individuos control (n=26), y pacientes cirróticos (cirrosis Child-Pugh A, n=7, cirrosis Child-Pugh B+C, n=22).

Figura 1B: Expresión del gen AR en hígado de rata control y en hígado cirrótico por CCl<sub>4</sub> según se determinó mediante RT-PCR (n=6 animales por grupo).

Figura 2A: Expresión de AR en el hígado de ratones control y tras la inducción de daño hepático agudo por anticuerpos Jo2 ó CCl<sub>4</sub>. La expresión de AR fue evaluada por RT-PCR 5 h después de la administración de los mencionados tratamientos.

Figura 2B: Expresión de AR en daño hepático agudo inducido por anticuerpos Jo2 ó CCl<sub>4</sub> evaluada mediante Western blot. Las muestras de tejido hepático fueron obtenidas tras 12 y 24 h de tratamiento con Jo2 y CCl<sub>4</sub> respectivamente. Los análisis fueron llevados a cabo con un anticuerpo anti-AR purificado por afinidad y biotinilado. Las puntas de flecha indican las diferentes formas de AR y se presentan tres muestras representativas por grupo. Las membranas se hibridaron con un anticuerpo específico para actina como control de carga. Se muestran imágenes representativas.

## ES 2 246 156 A1

Figura 3A: El tratamiento con AR previene el daño hepático agudo inducido por  $\text{CCl}_4$ . Se muestra la histología hepática y los niveles de transaminasas séricas en ratones tratados con  $\text{CCl}_4$  (teñido H&E, magnificación original X200). Las muestras de suero y tejido hepático fueron tomadas 24 h después de la administración de  $\text{CCl}_4$ . Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

Figura 3B: Efecto del tratamiento de AR sobre la histología hepática y las transaminasas séricas en ratones tratados con Jo2 (teñido H&E, magnificación original X200). Las muestras de suero y tejido hepático fueron obtenidas 12 h después de la administración de Jo2. Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado. El asterisco indica  $P < 0,01$  vs Jo2 solo.

Figura 3C: Efecto del tratamiento con AR sobre la actividad caspasa-3 en hígado de ratón medida 12 h después de la inyección de Jo2. Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado y el asterisco indica  $P < 0,01$  vs Jo2 solo.

Figura 3D: Efecto del tratamiento con AR sobre los niveles de la subunidad p17 de la caspasa-3 activa y de la proteína Bcl- $x_L$  en hígado de ratones control (C) y en extractos de hígado obtenidos 12 h después de la inyección de Jo2. Las membranas se hibridaron con un anticuerpo específico para actina como control de carga. Se muestran imágenes representativas.

Figura 4A: Efecto antiapoptótico de AR sobre hepatocitos de ratón en cultivo primario. La apoptosis fue inducida mediante tratamiento con actinomicina D y Jo2 en presencia de concentraciones crecientes de AR. La apoptosis se evaluó midiendo el enriquecimiento específico de mono- y oligonucleosomas liberados en el citoplasma (factor de enriquecimiento: EF). Los valores se normalizaron respecto a los obtenidos en hepatocitos control (C). Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado y el asterisco indica  $P < 0,05$  vs Jo2.

Figura 4B: Panel izquierdo: Efecto de la AR (20 nM) sobre la actividad caspasa-3 en hepatocitos de ratón en cultivo tratados con actinomicina D y Jo2. Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado y el asterisco indica  $P < 0,05$  vs células tratadas con actinomicina D y Jo2. Panel derecho: Análisis por Western Blot de la subunidad p17 de la caspasa-3 activa y de la proteína Bcl- $x_L$  en las mismas muestras descritas en el panel izquierdo.

Figura 4C: Activación de las rutas de señalización antiapoptótica por AR en hepatocitos de ratón en cultivo. Se evaluó el estado de fosforilación de Akt, ERK1/2 y STAT3 mediante Western blotting en extractos de hepatocitos de ratón a diferentes tiempos después de la adición de la AR (20 nM). Se muestran imágenes representativas de tres experimentos realizados por duplicado.

Figura 4D: Efecto de la AR (20 nM) sobre la apoptosis inducida por actinomicina D y Jo-2 en hepatocitos de ratón en cultivo en presencia del inhibidor de EGF-R PD153035 (1  $\mu\text{M}$ ), el inhibidor de MEK1 PD98059 (10  $\mu\text{M}$ ) o el inhibidor de PI-3K LY-294002 (20  $\mu\text{M}$ ). Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado y el asterisco indica  $P < 0,05$  vs Jo2.

Figuras 5A, 5B: Expresión génica de la AR en el hígado de rata (Fig. 5 A) y ratón (Fig. 5B) después de la HP. Los niveles de ARNm de la AR se analizaron a diferentes tiempos tras la HP en el parénquima hepático remanente mediante PCR en tiempo real. Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres animales diferentes. Los círculos cerrados corresponden a animales hepatectomizados, los círculos abiertos corresponden a animales sometidos a operaciones simuladas.

Figura 6A: Estimulación de la síntesis de DNA por la AR en hepatocitos de rata en cultivo. Los hepatocitos se trataron con concentraciones crecientes de AR, y se midió la síntesis de DNA determinando la incorporación de [ $^3\text{H}$ ] timidina. Se muestra el efecto del TGF $\beta$  (8 ng/ml) sobre la síntesis de DNA inducida por la AR. Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos llevados a cabo por cuadruplicado. Un asterisco indica  $P < 0,05$  y dos asteriscos indican  $P < 0,01$  vs control.

Figura 6B: Estimulación de la fosforilación del EGF-R en residuos de tirosina por la AR en hepatocitos de rata en cultivo. El EGF-R fosforilado en tirosina y el EGF-R total fueron detectados mediante Western blotting. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos llevados a cabo por duplicado.

Figura 6C: Activación de las rutas de señalización relacionadas con la proliferación celular por AR en hepatocitos de rata en cultivo. Se evaluó el estado de fosforilación de Akt, ERK1/2 y JNK mediante Western blotting utilizando anticuerpos específicos en extractos de hepatocitos de rata a tiempos diferentes después de la adición de AR. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos realizados por duplicado.

Figura 6D: Efecto de la AR (100 nM) sobre la síntesis de DNA en hepatocitos de rata en presencia del inhibidor del EGF-R PD153035 (1  $\mu\text{M}$ ), el inhibidor de MEK1 PD98059 (10  $\mu\text{M}$ ), el inhibidor de PI-3K LY294002 (20  $\mu\text{M}$ ), el inhibidor de JNK SP600125 (20  $\mu\text{M}$ ) o el inhibidor de p38 MAPK 5E202190 (25  $\mu\text{M}$ ). Los asteriscos indican  $P < 0,05$  vs AR solo. Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

Figura 7A: Expresión génica de la AR en hepatocitos de rata en cultivo tratados con IL-1 $\beta$  (2 ng/ml) (barras cerradas) durante diferentes periodos de tiempo. La expresión génica de la AR fue determinada por PCR en tiempo

## ES 2 246 156 A1

real. El asterisco indica  $P < 0,05$  vs controles (barras abiertas). Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

5 Figura 7B: Expresión génica de la AR en hepatocitos de rata en cultivo tratados con PGE2 (10  $\mu$ M) (barras cerradas) durante diferentes periodos de tiempo. La expresión génica de la AR fue determinada por PCR en tiempo real. El asterisco indica  $P < 0,05$  vs controles (barras abiertas). Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

10 Figura 7C: Análisis de la expresión génica basal de la AR en hepatocitos de rata en función del tiempo en cultivo mediante RT-PCR. Se muestra un experimento representativo.

15 Figura 7D: Expresión génica de la AR en hepatocitos de rata en cultivo 24 h después de la transfección con una mezcla equimolar de plásmidos pCB6 codificantes de las cuatro isoformas de WT1 o con una cantidad equivalente del vector pCB6 vacío. La expresión génica de la AR se determinó mediante PCR en tiempo real.

20 Figuras 8A, 8B: Expresión génica del TGF $\alpha$  (Figura 8A) o la CT-1 (Figura 8B) en hepatocitos de rata en cultivo tratados con AR durante diferentes periodos de tiempo. Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos realizados por triplicado y se expresan como el incremento de veces vs los controles correspondientes a cada tiempo. El asterisco indica  $P < 0,05$  vs controles.

25 Figura 9: Expresión génica de los ligandos del EGF-R, AR, TGF $\alpha$ , EGF y HB-EGF en el hígado de ratones control (C) y en el hígado de ratones tratados con el anticuerpo Jo2. La expresión de estos genes se determinó mediante PCR en tiempo real. El asterisco indica  $P < 0,01$  vs controles. Los valores son medias  $\pm$ SEM de tres experimentos llevados a cabo por triplicado.

### Ensayos

30 La expresión del gen de AR se detecta en hígado humano cirrótico y se induce rápidamente en el daño hepático experimental y después de una hepatectomía parcial. Los experimentos llevados a cabo por los inventores así como un análisis exhaustivo de los resultados obtenidos en los mismos, los cuales constituyen el fundamento y soporte científico para el uso de la AR objeto de la presente invención, se expondrán seguidamente.

#### - Expresión del gen AR inducida en el daño hepático crónico y agudo

35 Los inventores ya habían demostrado con anterioridad que la expresión del factor de transcripción WT1 estaba inducida en casi todas las muestras ensayadas de hígado humano cirrótico y en cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub> en ratas (8). El hecho de que la AR sea una diana transcripcional principal para WT1 (10) llevó a los inventores a examinar la expresión de este factor de crecimiento en el hígado de pacientes cirróticos. Aunque el análisis por PCR en tiempo real (RTi-PCR) mostró niveles apenas detectables de expresión de AR en hígado humano sano, se detectaron valores de mRNA de AR elevados en aproximadamente el 75% de los pacientes con cirrosis (Figura 1A). Es de gran interés el hallazgo de que los niveles de expresión del gen AR estén directamente correlacionados con los del gen WT1 en el hígado control y en sujetos cirróticos ( $r=0,752$ ,  $P < 0,001$ ). Coincidiendo con los datos en humanos, la expresión de AR también se incrementó en cirrosis experimental inducida en ratas por administración de CCl<sub>4</sub> (Figura 1B), y ligadura del conducto biliar (no mostrado).

45 Para evaluar si la AR podría formar parte de la pronta respuesta del hígado frente a la agresión, se examinaron los niveles de mRNA de AR y proteína en hígado de ratón después de la administración de una sola inyección intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> (1  $\mu$ l/g), o después de la inyección del anticuerpo Jo2 (4  $\alpha$ g/ratón?). La Figura 2A muestra que los niveles de mRNA de AR estuvieron marcadamente inducidos 5 h después del inicio de los tratamientos. Se llevó a cabo un Western blot con muestras de hígado obtenidas 12 y 24 h después de la administración de anticuerpo Jo2 o CCl<sub>4</sub> respectivamente. Utilizando un anticuerpo específico para la AR de ratón purificado por afinidad y biotinilado, se detectaron un conjunto de proteínas que estaban presentes solamente en el hígado de los ratones tratados (Figura 2B). Las cuatro bandas de aproximadamente 50, 43, 28 y 19 kDa son consistentes con las diferentes formas de la AR descritas en células epiteliales [(22) Brown, C.L., Meise, K.S., Plowman, G .D., Coffey, R.J., Dempsey, P.J. 1998. Cell surface ectodomain cleavage of human amphiregulin precursor is sensitive to a metalloprotease inhibitor. J. Biol. Chem. 273: 17258-17268]. Las bandas de 50 y 28 kDa representan probablemente formas de la AR ancladas a la membrana, mientras que las bandas de 43 y 19 kDa pueden ser formas solubles de la AR procesadas proteolíticamente (22).

60 *Atenuación del daño hepático agudo inducido por CCl<sub>4</sub> ó activación de Fas en ratones mediante la administración de AR*

65 Para evaluar si la AR puede limitar la extensión del daño hepático, los inventores han examinado el efecto de la administración de AR a ratones sometidos a un daño hepático agudo por tratamiento con CCl<sub>4</sub> ó anticuerpo Jo2. El CCl<sub>4</sub> induce necrosis y apoptosis hepática debida a la alteración celular, lisosomal y permeabilidad de la membrana mitocondrial [(23) Berger, M.L., Bhatt, H., Combes, B., Estabrook, R. 1986. CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in isolated hepatocytes: the importance of direct solvent injury. Hepatology 6: 36-45. (24) Kovalovich, K., Li, W., DeAngelis, R., Greenbaum, L.E., Ciliberto, G., and Taub, R. 2001. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing

a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-x<sub>L</sub>. J. Biol. Chem. 276: 26605-26613. (25) Shi, J., Aisaki, K., Ikawa, Y., Wake, K. 1998. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. Am. J. Pathol. 153: 515-525. (26) Kovalovich, K., DeAngelis, R.A., Li, W., Furth, E.E., Ciliberto, G., Taub, R. 2000. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. Hepatology 31: 149-159. (27) Czaja, M.J., Xu, J., Alt, E. 1995. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. Gastroenterology 108: 1849-1854]. Los niveles en suero de AST y ALT se elevaron apreciablemente 24 h después de la inyección con CCl<sub>4</sub>. Este incremento, sin embargo, fue claramente atenuado en ratones tratados con AR (Figura 3A). Consistente con esto, el grado de daño histológico se redujo en los ratones que se habían tratado con AR (Figura 3A).

Los niveles en suero de AST y ALT se elevaron considerablemente 12 h después de la inyección de Jo2 (Figura 3B). El tratamiento con AR suprimió potentemente la elevación de transaminasas en suero, y el análisis histopatológico confirmó que la administración de AR casi evitó completamente el daño hepático (Figura 3B). La muerte celular apoptótica es un determinante principal en el daño hepático mediado por Fas [(5)-(7), (28) Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., Nagata, S. 1993. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature 364: 806-809. (29) Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365]. Para confirmar que los efectos hepatoprotectores de AR frente al daño hepático mediado por Fas procede de una actividad anti-apoptótica, los inventores midieron la activación proteolítica de la caspasa-3 y su actividad en extractos de hígado de ratón. Observaron que la inducción de la actividad de caspasa-3 detectada en ratones tratados con anticuerpo Jo2 era fuertemente inhibida por la administración de la AR (Figura 3C). Utilizando un anticuerpo que reconoce solamente la subunidad p17 de la caspasa-3 activa se observó que la ruptura de caspasa-3 era evitada por el tratamiento con AR, lo que sugiere el bloqueo específico por AR de la ruta apoptótica inducida por Fas (Figura 3D). Las proteínas de la familia Bcl-2 inhiben la apoptosis inducida por una diversidad de estímulos, incluyendo la apoptosis mediada por Fas [(30) Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. 1995. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub>. Nature 374: 811-813. (31) Stoll, S.W., Benedict, M., Mitra, R., Hiniker, A., Elder, J.T., Nuñez, G. 1998. EGF receptor signalling inhibits keratinocyte apoptosis: evidence for mediation by Bcl-x<sub>L</sub>. Oncogene 16: 1493-1499. (32) Lacronique, V., Mignon, A., Fabre, M., Viollet, B., Rouquet, N., Molina, T., Porteu, A., Henrion, A., Bouscary, D., Varlet, P., Joulin, V., Kahn, A. 1996. Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. Nat. Med. 2: 80-86]. Se ha evaluado la expresión de la proteína Bcl-x<sub>L</sub> mediante Western blotting 6 h después de la inyección del anticuerpo Jo2. Los niveles de la proteína Bcl-x<sub>L</sub> fueron superiores en el hígado de ratón tratado con AR y anticuerpo Jo2 en comparación con los observados en ratones tratados con anticuerpo Jo2 sólo (Figura 3D).

#### *Efecto antiapoptótico directo de AR sobre hepatocitos en cultivo primario*

Para determinar si los efectos antiapoptóticos *in vivo* de la AR podrían estar mediados por una acción directa de la AR sobre las células del parénquima hepático, los presentes inventores utilizaron hepatocitos de ratón en cultivo primario. Se ha descrito que los hepatocitos expuestos a los anticuerpos Jo-2 experimentan apoptosis eficazmente en presencia de actinomicina D [(5), (6), (33) Ni, R., Tomita, Y., Matsuda, K., Ichihara, A., Ishimura, K., Ogasawara, J., Nagata, S. 1994. Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. Exp. Cell Res. 215: 332-337]. Los hepatocitos se pretrataron con diferentes concentraciones de AR durante 3 h antes de la adición de la actinomicina D y el anticuerpo Jo2. Se midieron la apoptosis, y los sucesos moleculares relacionados con la apoptosis, 18 horas después. Como se muestra en la Figura 4A, los hepatocitos fueron protegidos de la apoptosis por la AR de forma dosis-dependiente, indicando un efecto citoprotector directo de la AR en la prevención de la apoptosis hepática mediada por Fas. También se observó actividad citoprotectora de AR en la apoptosis inducida por otros agentes tales como TNF $\alpha$  más galactosamina, ácido okadaico y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (datos no mostrados). De acuerdo con el efecto antiapoptótico de la AR, los inventores observaron que la proteólisis y activación de la caspasa-3 inducida por el anticuerpo Jo2 eran significativamente inhibidas por AR (Figura 4b). Asimismo, encontraron que la proteína antiapoptótica Bcl-x<sub>L</sub> era inducida por tratamiento con AR en hepatocitos de ratón tratados con Jo2 (Figura 4B). Con el fin de conocer los mecanismos de señalización del efecto antiapoptótico de la AR, se examinaron las rutas de PI-3K/Akt y ERK1/2, mediadores generales de la supervivencia celular [(4), (6)]. Los hepatocitos de ratón en cultivo tratados con AR mostraron una fosforilación incrementada de Akt y ERK1/2 (Figura 4 C). Una molécula señalizadora clave implicada en la protección del daño hepático inducido por Fas es STAT3 [(34) Shen, Y., Devgan, G., Darnell, J.E., Bromberg, J.F. 2001. Constitutively activated Stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated Stat1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 1543-1548. (35) Haga, S., Terui, K., Zhang, H.Q., Enosawa, S., Ogawa, W., Inoue, H., Okuyama, T., Takeda, K., Akira, S., Ogino, T., *et al.* 2003. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. J. Clin. Invest. 112: 989-998]. Se observó que la AR estimulaba la fosforilación de STAT3 (Figura 4C).

La activación del EGF-R por la AR parece ser esencial en la mediación del efecto antiapoptótico de este factor de crecimiento sobre la muerte celular inducida por Fas. Esto se hace evidente cuando los hepatocitos de ratón fueron pretratados durante 1 hora con el inhibidor del EGF-R, PD153035, antes de la adición de la AR, y se perdió la protección proporcionada por la AR (Figura 4D). También fue necesaria para evitar la apoptosis la activación de la ruta PI-3K/Akt por AR, que opera por debajo del EGF-R. Esto pudo demostrarse por el marcado efecto inhibitorio del inhibidor de PI-3K, LY294002 sobre la protección conferida por la AR (Figura 4D). Sin embargo, el inhibidor de MEK1, PD98059, no interfirió con el efecto antiapoptótico de AR (Figura 4D).

*Expresión de AR en el hígado después de la HP*

Los presentes inventores examinaron también la expresión de AR en hígado de ratón y de rata después de una HP de dos tercios [(1), (4)]. Como se muestra en la Figura 5A, el mRNA de AR no era detectable en el hígado de rata antes de la HP pero su aparición fue detectada a la media hora después de la intervención, alcanzando su máximo valor a las 6 horas y decreciendo uniformemente entre 15 y 24 horas. Es interesante la observación de que la expresión del gen AR de ratas sometidas a operaciones simuladas ("sham operated": SH) se inducía de forma transitoria entre las 6 y las 15 h (Figura SA). La expresión del gen AR de hígado de ratón también fue inducida prontamente después de la HP. Los niveles de mRNA de AR se vieron incrementados 0,5 h después de la HP, alcanzando un pico entre las 24 y 48 h y decreciendo posteriormente (Figura 5B). La expresión del gen de la AR también fue inducida en ratones sometidos a operaciones simuladas, aunque con cinéticas mucho más rápidas que en ratas. En el punto de tiempo más breve evaluado (0,5 h), los ratones sometidos a operaciones simuladas mostraron niveles de mRNA de AR similares a los de los animales hepatectomizados. Sin embargo, 1 hora después de la intervención los niveles de mRNA de AR se redujeron significativamente en los ratones sometidos a operaciones simuladas en comparación con los animales sometidos a resección, y se mantuvieron así para todo el estudio (Figura 5B).

*Inducción por la AR de la síntesis de DNA en hepatocitos aislados*

Una vez que los presentes inventores han demostrado que la expresión del gen AR es inducida con prontitud en el daño hepático y la HP, y que la AR puede jugar un papel protector para el parénquima hepático, van a tratar de demostrar en los siguientes párrafos que la AR puede tener también un comportamiento mitógeno para los hepatocitos.

Como se muestra en la Figura 6A, la AR se comporta como un mitógeno puro para el hepatocito aislado en cultivo primario, estimulando la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina en el DNA de forma dosis-dependiente. El efecto del AR sobre la síntesis del DNA fue abrogado por el TGF(3, un factor de crecimiento implicado en la terminación fisiológica de la respuesta regenerativa del hígado (1).

La AR es un ligando del EGF-R, un receptor que se expresa abundantemente en el hepatocito del animal adulto [(36) Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 19: 183-232. (37) Carver, R.S., Stevenson, M.C., Scheving, L.A., and Russell, W.E. 2002 Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration. Gastroenterology 123: 2017- 2027]. Los inventores examinaron la señalización intracelular de la AR en hepatocitos de rata en cultivo. El tratamiento de hepatocitos de rata aislados con AR induce la fosforilación rápida y transitoria del EGF-R (Figura 6B). Se analizaron las rutas de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y de la de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI-3K), como las principales cascadas señalizadoras en la respuesta mitogénica de los hepatocitos frente a los factores de crecimiento [(38) Band, C.J., Mounier, C., Posner, B. 1999. Epidermal growth factor and insulin-induced deoxyribonucleic acid synthesis in primary rat hepatocytes is phosphatidylinositol 3-kinase dependent and dissociated from protooncogene induction. Endocrinology 140: 5625-5634. (39) Coutant, A., Rescan, C., Gilot, D., Loyer, P., Guguen-Guillouzo, C., Baffet, G. 2002. PI3K-FRAP/mTOR Pathway is critical for hepatocyte proliferation whereas MEK/ERK supports both proliferation and survival. Hepatology 36: 1079-1088]. Mas recientemente, se ha demostrado que la activación de la c-Jun-N- terminal quinasa (JNK) contribuye significativamente a la proliferación de los hepatocitos después de la HP [(40) Schwabe, R.F., Bradham, C.A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B.L., Schoonhoven, R., Brenner, D.A. 2003. c-Jun-N-Terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. Hepatology 37: 824-832]. Como se observó en hepatocitos murinos, el tratamiento de hepatocitos de rata aislados con AR induce rápidamente la fosforilación de ERK1/2 y Akt (Figura 6C). Además, los inventores han observado también la fosforilación de JNK como respuesta al tratamiento con AR (Figura 6C).

Para evaluar la señalización de la AR en la proliferación de los hepatocitos, los inventores midieron la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina en el DNA en hepatocitos de rata tratados con AR en presencia de inhibidores de estas rutas señalizadoras. Como se muestra en la Figura 6D, el inhibidor de la actividad tirosina quinasa del EGF-R, PD153035, impide completamente la síntesis de DNA estimulada por AR. Se observó un grado de inhibición similar para el inhibidor de la PI-3K, LY294002, mientras que los inhibidores de MEK1, PD98059, y de JNK, SP600125, redujeron los efectos de la AR en un 70% (Figura 6D). Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor de p38-MAPK, SB202190, no tuvo un efecto significativo sobre la síntesis de DNA estimulada por la AR (Figura 6D).

*Expresión génica de la AR en hepatocitos aislados*

Los presentes inventores han demostrado que la AR se expresa en el hígado bajo diferentes situaciones de daño y regeneración del tejido hepático. Para identificar los mecanismos responsables de la inducción de la AR se aislaron células de parénquima de hígado de rata y se examinó la expresión del gen AR bajo diferentes condiciones. Primeramente evaluaron el efecto de diferentes factores implicados en los procesos inflamatorios y regenerativos hepáticos, tales como la IL-1 $\beta$ , la IL-6, el TNF $\alpha$ , el HGF y la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [(1)-(4), (41) Rudnick, D.A., Perlmutter, D.H., and Muglia, L.J. 2001. Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 8885-8890]. Entre las citoquinas y los factores de crecimiento ensayados, la IL-1 $\beta$ , fue la única molécula que estimuló la expresión del gen AR (Figura 7A). De acuerdo con observaciones previas realizadas en células de cáncer de colon [(42) Shao, J., Lee, S.B., Guo, H., Evers, M., and Sheng, H. 2003. Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin. Cancer Res. 63: 5218-5223], se observó que el tratamiento de los hepatocitos de rata con PGE<sub>2</sub> daba lugar a la rápida inducción de la expresi

sión del gen AR (Figura 7B). Se ha postulado que la estimulación por PGE<sub>2</sub> de la expresión del gen AR está inducida por la ruta cAMP/proteína quinasa A (PKA), que actúa sobre un elemento de respuesta de cAMP (CRE) en el promotor de AR (42). Consistentemente con este mecanismo, los presentes inventores observaron que el agente inductor de cAMP, forskolina, promovía la expresión del gen AR en hepatocitos aislados (datos no mostrados). El tratamiento de hepatocitos con diferentes agentes inductores de estrés oxidativo, tales como el peróxido de hidrógeno y la menadiona, no tuvieron efecto sobre la expresión del gen AR (datos no mostrados).

También se encontró que la expresión de gen AR se inducía en hepatocitos en cultivo y que la magnitud de este efecto aumentaba con el tiempo de cultivo (Figura 7C). El AR es un diana bona fide para el factor transcripción WT1 (10). Los inventores han encontrado que la transfección de hepatocitos con una mezcla equimolar de plásmidos que codifican para las 4 isoformas de WT1 dio lugar a un aumento de los niveles de mRNA de AR determinado por PCR en tiempo real. Aunque estos datos muestran que el WT1 puede controlar la expresión del gen AR en hepatocitos aislados, la inducción de AR en el hepatocito en cultivo precede a la de WT1 (datos no mostrados), indicando que los factores identificados previamente, IL-1b y PGE<sub>2</sub>, podrían ser responsables de la rápida inducción inicial de la expresión del gen AR en los hepatocitos en cultivo.

#### *Inducción por la AR de la expresión de mediadores de la protección y regeneración hepática en hepatocitos aislados*

Con el fin de profundizar más en los mecanismos de los efectos hepatoprotectores de la AR, los presentes inventores evaluaron los efectos de este factor de crecimiento sobre la expresión del TGF $\alpha$  y la cardiotrofina-1 (CT-1, moléculas clave implicadas en la respuesta endógena frente al daño hepático y la PH [(7), (43) Bustos, M., Beraza, N., Lasarte, J-J., Baixeras, E., Alzuguren, P., Bordet, T., Prieto, J. 2003. Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. Gastroenterology 125: 192-201. (44) Webber, E.M., Fitzgerald, M.J., Brown, P.I., Bartlett, M.H., Fausto, N. 1993. Transforming growth factor- $\alpha$  expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor- $\alpha$  and hepatocyte growth factor. Hepatology 18: 1422-1431]. Se observó que el tratamiento con AR de hepatocitos de rata aislados incrementó los niveles de mRNA de TGF $\alpha$  y CT-1 (Figura 8A y B). Estas respuestas subrayaron la relevancia de la AR como factor hepatotrófico.

#### *Expresión de ligandos EGF-R en daño hepático agudo mediado por Fas*

Además de la AR, el EGF-R puede ser activado por una familia de ligandos que junto a EGF y TGF $\alpha$  incluyen el factor de crecimiento tipo EGF capaz de unirse a heparina (HB-EGF)[(36), (45) Holbro, T., Hynes, N.E. 2004. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44: 195-217]. Para profundizar en la contribución relativa de estos ligandos del EGF-R a la pronta respuesta hepatoprotectora y regenerativa que sigue al daño hepático agudo, los inventores han examinado su perfil de expresión génica en ratones tratados con anticuerpos Jo2. Como se muestra en la Figura 9, la expresión de EGF, TGF $\alpha$  y HB-EGF fue detectada por PCR en tiempo real en el hígado de ratones control, que previamente habían mostrado niveles indetectables de mRNA de AR. Cinco horas después de la administración del anticuerpo Jo2 los niveles de mRNA de EGF, TGF $\alpha$  y HB-EGF se redujeron significativamente, mientras que la expresión del gen AR fue apreciablemente inducida. Todas estas observaciones en conjunto indican que la AR es el único ligando de EGF-R examinado que es inducido en hígado de ratón durante las fases tempranas del daño hepático agudo.

Como resumen de la exposición anterior, se ha demostrado que la expresión del gen AR se induce de manera rápida y consistente en diferentes modelos de daño hepático, y que la administración exógena de la AR proporciona una hepatoprotección significativa.

Las observaciones anteriormente expuestas, consideradas en su conjunto, indican de forma clara y contundente que la AR puede ser considerada como un nuevo participante activo en el complejo proceso de la regeneración hepática. De este modo, la AR presentaría un incalculable potencial terapéutico en el tratamiento de situaciones patológicas producidas por lesiones hepáticas de tipo agudo, siendo de destacar su aplicación en situaciones especialmente críticas tales como las debidas al FHA.

#### **55 Modos de realización de la invención**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, que junto con las Figuras descritas anteriormente, ilustra la metodología experimental empleada para el desarrollo de la presente invención. Se entiende que los expertos en la materia serán capaces de comprender las modificaciones, variaciones y cambios que pueden hacerse dentro del alcance de la presente invención.

##### Ejemplo

##### *Pacientes*

Se obtuvieron muestras de tejido hepático procedentes de 2 grupos de sujetos: (a) Individuos control (n=26; 19 varones; edad media 50,8, intervalo 18-73 años) con alteraciones hepáticas mínimas. Se recogieron muestras de tejido por cirugía de tumores digestivos (16 casos) o a partir de biopsia percutánea de hígado realizada a causa de una débil

alteración de las pruebas de función hepática (10 casos) y (b) Cirrosis hepática (n=29; 24 varones; edad media 56, rango 36-77 años) que fueron debidos a infección por virus de la hepatitis C (HCV) en 8 casos, alcoholismo en 13 casos, infección por virus de la hepatitis B (HBV) en 3 casos, hepatitis autoinmune en 3 casos, hemocromatosis en un caso y criptógeno en otro caso. Estuvo presente el carcinoma hepatocelular asociado (HCC) en 10 pacientes cirróticos.

5 Este estudio fue aprobado por el Comité de Revisión de Investigación Humana de la Universidad de Navarra, España, y estaba de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

#### *Modelos animales*

10 Los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías de la Universidad de Navarra para el uso de animales de laboratorio. Se indujo cirrosis con CCl<sub>4</sub> en ratas Wistar macho como se describe en [(16) Castilla-Cortazar, I., Garcia, M., Muguerza, B., Quiroga, J., Perez, R., Santidrian, S., Prieto, J. 1997. Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology* 113:1682-1691]. Se realizó una HP de dos tercios u operaciones simuladas en ratas Wistar macho (150g) y ratones C57/BL6 macho (20g) de acuerdo con el método de Higgins y Andersen [(17) Higgins, G. M., Andersen, R. M. 1931. Experimental pathology of liver: restoration of liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12:186-202. (18) Latasa, M. U., Boukaba, A., Garcia-Trevijano, E. R., Torres, L., Rodriguez, J. L., Caballería, J., Lu, S. C., López-Rodas, G., Franco, L., Mato, J. M., *et al.* 2001. Hepatocyte growth factor induces MAT2A expression and histone acetylation in rat hepatocytes. Role in liver regeneration. *FASEB J.* 10.1096/fj.00-0556fje. (19) Chen, L., Zeng, Y., Yang, H., Lee, T.D., French, S.W., Corrales, F.J., García-Trevijano, E.R., Avila, M.A., Mato, J.M., and Lu, S.C. 2004. Impaired liver regeneration in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J.* 18: 914-916]. A los animales en que se practicó una operación simulada, después de sedarlos, se les expuso el hígado y luego se les retornó a la cavidad abdominal. Se indujo daño agudo en el hígado en ratones macho C57/BL6 (20 g) (n=3-5 por condición y punto de tiempo) con una única inyección intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> (1 µl/g de peso corporal en aceite de oliva) (Sigma, St. Louis, MO, USA) o anticuerpo monoclonal Jo2 (4 µg/ratón en solución salina) (BD PharMingen, San Diego, CA, USA) [(5), (20) Martínez-Chantar, M.L., Corrales, F.J., Martínez-Cruz, A., García-Trevijano, E.R., Huang, Z.Z., Chen, L.X., Kanel, G., Avila, M.A., Mato, J.M., Lu, S.C. 2002. Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J.* 10.1096/fj.02-0078fje]. Los controles recibieron el volumen equivalente de aceite de oliva o solución salina. En los casos indicados los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de AR recombinante humana (9,5 µg/ratón) (Sigma) 6 y 0,5 h antes y 3 h después del anticuerpo Jo2, ó 0,5 h antes y 12 h después de CCl<sub>4</sub>. En los puntos de tiempo indicados los ratones se sometieron a extracción de sangre, y se analizaron los sueros en cuanto a las alanina y aspartato aminotransferasas (ALT y AST) como se describe en [(16) y (21) Lasarte, J.J., Sarobe, P., Boya, P., Casares, N., Arribillaga, L., López-Díaz de Cerio, A., Gorraiz, M., Borrás-Cuesta, F., Prieto, J. 2003. A recombinant adenovirus encoding hepatitis C virus core and El proteins protects mice against cytokine-induced liver damage. *Hepatology* 37: 461-470]. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y los hígados se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, o se fijaron mediante formalina y se embebieron en parafina para tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

#### *Aislamiento, cultivo y tratamiento de hepatocitos de rata y de ratón*

40 Se aislaron hepatocitos de ratas Wistar (150g) y de ratones C57/BL6 (20g) mediante perfusión con colagenasa (Gibco-BRL, Paisley, UK) como se describe en [(18), (20)]. Las células (5x10<sup>5</sup> células por pocillo) se plaquearon sobre placas de 6 pocillos recubiertos de colágeno (colágeno de tipo I, Collaborative Biomedical, Bedford, MA, USA). Los cultivos se mantuvieron en medio MEM suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, aminoácidos no esenciales, glutamina 2 mM y antibióticos (procedentes, todos ellos, de Gibco-BRL). Al cabo de 2 h de incubación, se retiró el medio y las células se volvieron a cultivar en el mismo medio con un 5% de FCS. Cuando procedió, los hepatocitos fueron tratados con IL-1β o TNFα de Roche (Mannheim, Germany), HGF o forskolina de Calbiochem (San Diego, CA, USA), IL6 de RD Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Germany), o PGE<sub>2</sub> de Alexis QBiogene (Carlsbad, CA, USA).

50 La apoptosis fue inducida en hepatocitos de ratón en cultivo mediante tratamiento con 0,5 µg/ml de anticuerpo Jo2 y 0,05 µg/ml de actinomicina D como se describe en (5). Cuando procedió, los hepatocitos fueron tratados con AR 6 h antes de la adición del anticuerpo Jo2 y de la actinomicina D. La apoptosis fue estimada por la determinación de complejos solubles de histona-DNA utilizando el Cell Death Detection Assay (Roche). Los ensayos de ELISA para determinar la muerte celular se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El enriquecimiento específico de mono- y oligonucleosomas liberados en el citoplasma (factor de enriquecimiento, EF) se calculó como la relación entre los valores de absorbancia de las muestras procedentes de las células tratadas y de las células control. También se evaluó el efecto de AR sobre la apoptosis mediada por Fas en presencia del inhibidor de MEK1, PD98059, el inhibidor de la PI-3K, LY-294002, y el inhibidor de la actividad tirosina quinasa del EGF-R, PD153035, todos ellos de Calbiochem.

#### *Evaluación de la síntesis de DNA*

65 Para la síntesis de DNA se plaquearon hepatocitos de rata a una densidad de 3x10<sup>4</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno en medio MEM suplementado con FCS al 10%. Cinco horas después del plaqueado, se cambió el medio y las células se mantuvieron en ausencia de suero durante 20 horas más. Se midió la síntesis de DNA tras un tratamiento con AR de 30 h. Se administró un pulso de [<sup>3</sup>H]timidina (1µCi/pocillo) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 22 h después de la adición de AR. Las células fueron cosechadas y se determinó la

## ES 2 246 156 A1

incorporación de timidina en contador de centelleo. Se evaluó el efecto de la AR sobre la síntesis de DNA en presencia del inhibidor de MEK1, PD98059, del inhibidor de PI-3K, LY294002, del inhibidor de la p38 MAPK, SB202190, del inhibidor de JNK, SP600125, y del inhibidor de la actividad tirosina quinasa del EGF-R, PD153035, todos ellos de Calbiochem.

### 5 *Transfección transitoria de hepatocitos de rata*

Los hepatocitos de rata en cultivo primario se transfectaron 24 h después de su aislamiento empleando el reactivo Tfx™-50 (Promega, Madison, WI, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transfectaron las células con una mezcla equimolar de plásmidos pCB6 que codificaban las cuatro isoformas del WT1 (caracterizadas por la presencia o ausencia de los exones 5 y KTS), o con una cantidad equivalente del vector pCB6 vacío, suministrados por gentileza del Dr. Jochemsen (Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands). Se monitorizó la eficacia de la transfección de la mezcla equimolar de las cuatro isoformas de WT1 mediante análisis por RT-PCR utilizando cebadores específicos que discriminan estas isoformas.

### 15 *Aislamiento de RNA y análisis de la expresión génica*

Se extrajo el RNA total utilizando el Reactivo TRI (Sigma). Se trataron 2 µg de RNA con DNaseI (Gibco-BRL) antes de la transcripción inversa para la que se empleó el enzima M-MLV (Gibco-BRL) en presencia de RNaseOUT (Gibco-BRL). Se utilizó 1/10 de cada preparación de cDNA para cada PCR. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%, se tiñeron con bromuro de etidio y se cuantificaron utilizando el software Molecular Analyst (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Los datos se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de la β-actina. Solamente se incluyeron en el estudio las muestras con una amplificación comparable del mRNA de la β-actina. Se designaron todos los cebadores para distinguir entre la amplificación del DNA genómico y del cDNA y se secuenció la totalidad de los productos para confirmar la especificidad. Los cebadores utilizados se describen en la siguiente Tabla I:

TABLA I

<b>Cebador</b>	<b>Sentido (5' -3')</b>	<b>Antisentido (5' -3')</b>
<b>Actina Humana</b>	<b>AGCCTCGCCTTTGCCGA</b> (SEQ ID NO:1)	<b>CTGGTGCCTGGGGCG</b> (SEQ ID NO:11)
<b>Actina de ratón</b>	<b>ACTGCGCTTCTTGCCGC</b> (SEQ ID NO:2)	<b>CATGACGCCCTGGTGTC</b> (SEQ ID NO:12)
<b>Actina de rata</b>	<b>CAACCTCCTTGCAGCTC</b> (SEQ ID NO:3)	<b>CTGGTGCCTAGGGCG</b> (SEQ ID NO:13)
<b>AR humana</b>	<b>CATGCTGTGAGTTTTTCATGGAC</b> (SEQ ID NO:4)	<b>CTGTGCTCTTGATACTCGG</b> (SEQ ID NO:14)
<b>AR de ratón y rata</b>	<b>CTGCTGGTCTTAGGCTCAGG</b> (SEQ ID NO:5)	<b>CCAGGTTCTCGATGTATCTGC</b> (SEQ ID NO:15)
<b>CT1</b>	<b>GTCTGGAAGACCACCAGACTG</b> (SEQ ID NO:6)	<b>AGCCGCTCGGACACCGGTAGC</b> (SEQ ID NO:16)
<b>EGF</b>	<b>CCCTGGATCCTATTACTGCAC</b> (SEQ ID NO:7)	<b>GAAAGCAATCACATTCACAGG</b> (SEQ ID NO:17)
<b>HB-EGF</b>	<b>ATGAAGCTGCTGCCGTCGGTG</b> (SEQ ID NO:8)	<b>TGGATGCAGTAGTCCTTGATT</b> TC (SEQ ID NO:18)
<b>TGFα</b>	<b>GCCCAGATTCCCACACTCAG</b> (SEQ ID NO:9)	<b>AGGACAGCCAGGGCCAC</b> (SEQ ID NO:19)
<b>WT1</b>	<b>CGTTTCTCACTGGTCTCAGATG</b> CCG (SEQ ID NO:10)	<b>GGAATCAGATGAACTTAGGAG</b> (SEQ ID NO:20)

## ES 2 246 156 A1

La PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando un iCycler (BioRad) y el iQ SYBR Green Supermix (BioRad). Para monitorizar la especificidad de los productos de PCR finales se analizaron por curvas de fusión y electroforesis. La cantidad de cada transcrito fue expresada como n-veces la diferencia con respecto a la expresión del gen de referencia ( $\beta$ -actina) ( $2^{\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct$  representa la diferencia en el ciclo umbral entre los genes diana y el gen control).

5

### *Medida de la actividad de la caspasa-3*

Se midió la actividad de la caspasa-3 en hepatocitos de ratón y lisados de tejido hepático utilizando el Kit de evaluación colorimétrica de Caspasa-3/PPP32 (BioVision, Palo Alto, CA, USA). Las células en cultivo ( $5 \times 10^5$  por condición) fueron lisadas directamente en el tampón de lisis del kit después de los correspondientes tratamientos. El tejido hepático fue homogeneizado con un homogeneizador Dounce en tampón de lisis y se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min. Se utilizaron los lisados celulares y los sobrenadantes procedentes de los homogeneizados hepáticos (200  $\mu$ g en 50  $\mu$ l) para medir la actividad de la caspasa-3 siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 15 *Análisis de Western blot*

Los homogeneizados procedentes de las muestras de hígado y los hepatocitos aislados se sometieron a análisis por Western blot como se describe en [(19), (20)]. Los anticuerpos que se utilizaron fueron: anticuerpo policlonal biotinilado y purificado por afinidad, específico para la AR de ratón (BAF989) (RD Systems); anticuerpo específico para: la subunidad p17 de caspasa-3 activa (9664S), la Akt (Ser<sup>473</sup>) fosforilada (9271S) y STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) fosforilado (9131S) (Cell Signaling, Beverly, MA, USA); ERK1/2 (06-182), EGF-R fosforilado (Tyr<sup>1173</sup>) (05-483) y STAT3 (06-596) (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA, USA). Todos los demás anticuerpos procedían de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA): Bcl<sub>L</sub> (sc8392), Bcl2 (sc7382), EGF-R (sc-03), ERK1/2 (Tyr<sup>204</sup>) fosforilado (sc7383), Akt (sc5298), JNK (sc571), JNK (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) fosforilado (sc6254).

25

### *Análisis estadístico*

Los datos que se ajustaban a una distribución normal fueron comparados entre grupos utilizando un test-t de Student independiente y un análisis de varianza. Los datos que no se ajustaban a una distribución normal fueron comparados utilizando los tests de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney. Se evaluó la correlación mediante los coeficientes de correlación de Spearman o Pearson. Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados significativos. Los datos se proporcionan como medias  $\pm$ SEM o como medianas e intervalo intercuartílico.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de anfiregulina, **caracterizado** porque la anfiregulina se utiliza en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento del daño hepático agudo.
2. Uso de anfiregulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medicamento es útil para potenciar una reacción protectora endógena primaria del tejido hepático frente al daño hepático agudo.
- 10 3. Uso de anfiregulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medicamento es útil para promover la síntesis de DNA en hepatocitos.
4. Uso de anfiregulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medicamento es útil para prevenir la muerte de hepatocitos en tejido hepático en pacientes con daño hepático agudo.
- 15 5. Uso de anfiregulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medicamento es útil para estimular la regeneración del parénquima hepático remanente tras un daño hepático agudo de cualquier etiología.
- 20 6. Uso de anfiregulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medicamento es útil como fármaco hepatoprotector en pacientes con daño hepático agudo de cualquier etiología.
7. Uso de anfiregulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medicamento es útil para estimular la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial
- 25 8. Uso de anfiregulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medicamento es útil como fármaco hepatoprotector y estimulante de la regeneración hepatocitaria en pacientes receptores de trasplante hepático de vivo o de cadáver.

30

35

40

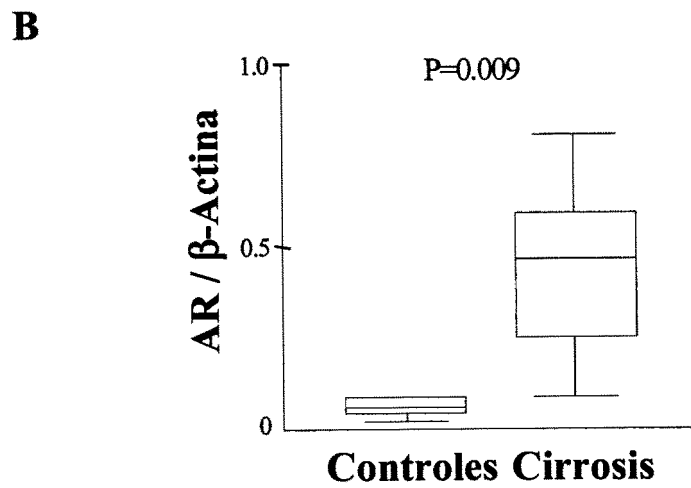
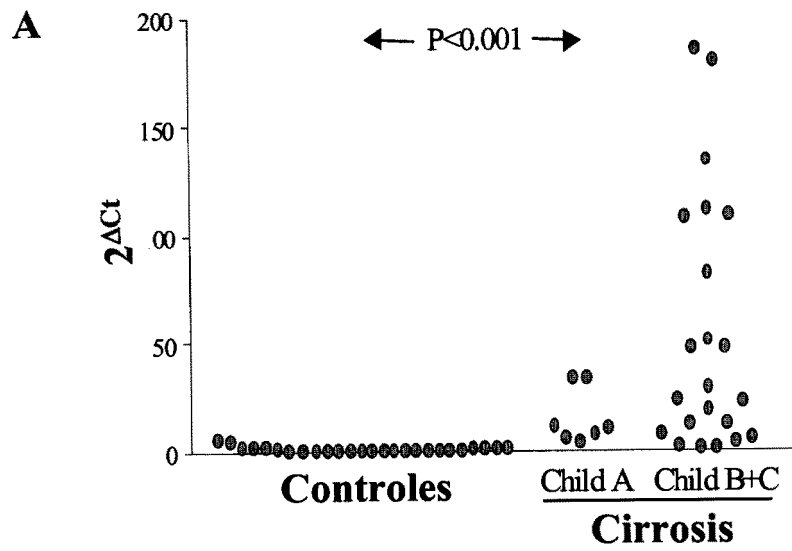
45

50

55

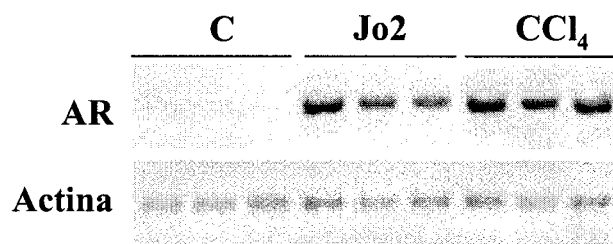
60

65

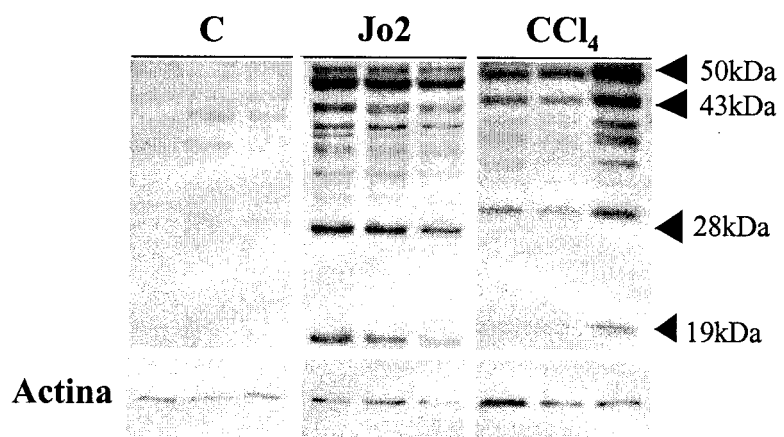


**Figura 1**

**A**



**B**



**Figura 2**

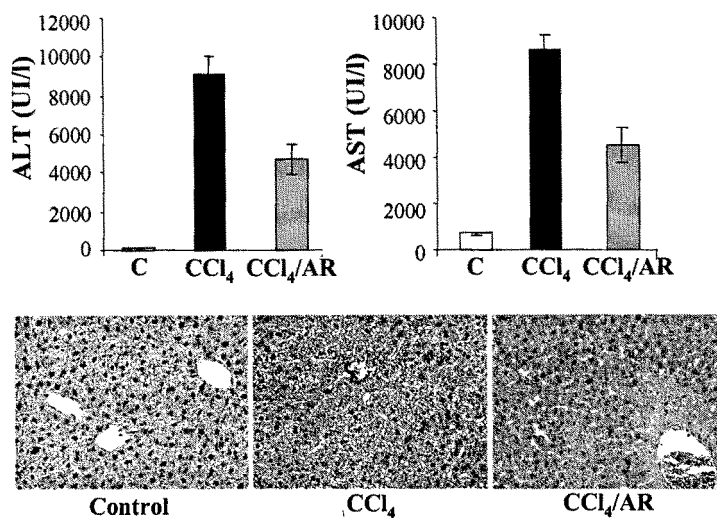


Figura 3A

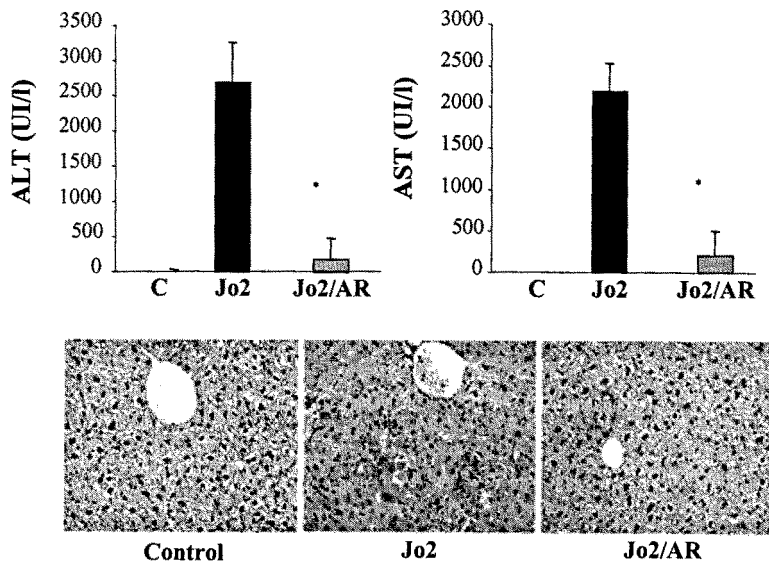


Figura 3B

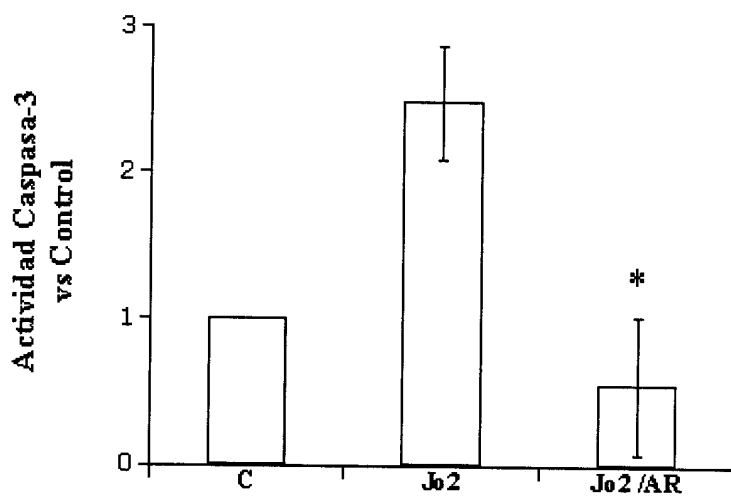


Figura 3C

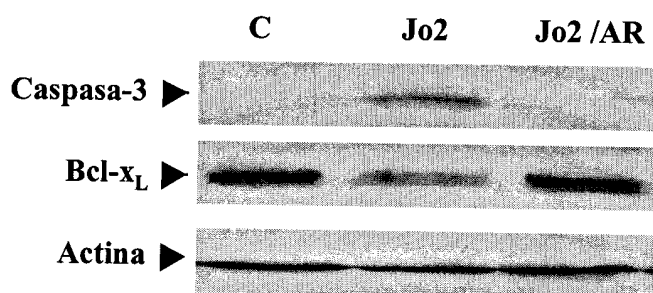


Figura 3D

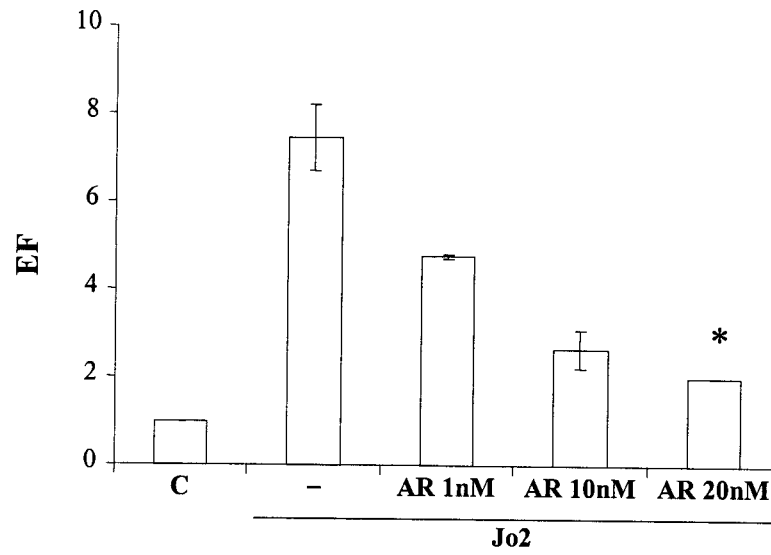


Figura 4A

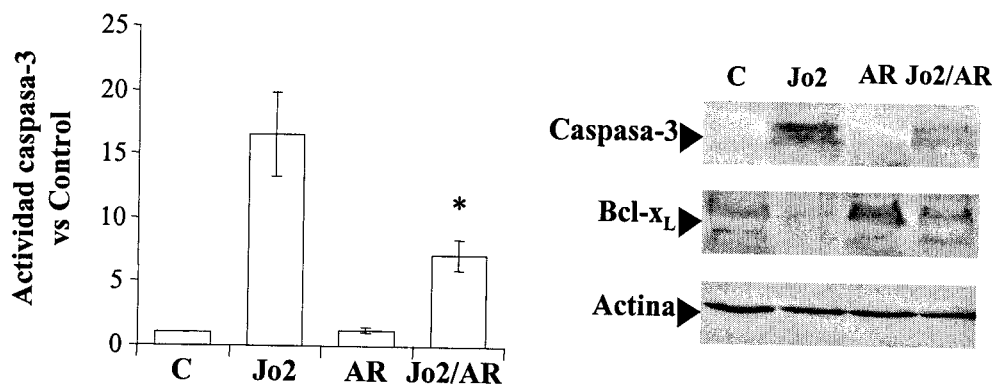


Figura 4B

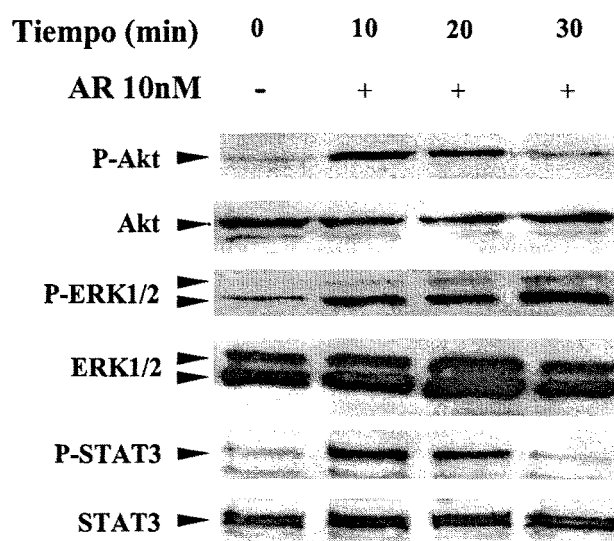


Figura 4C

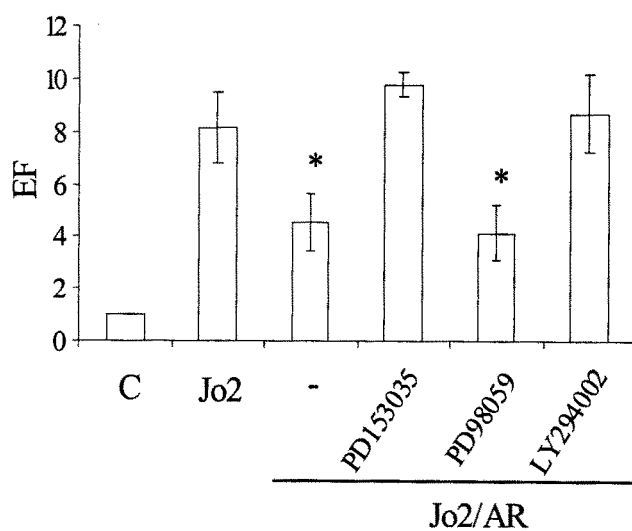
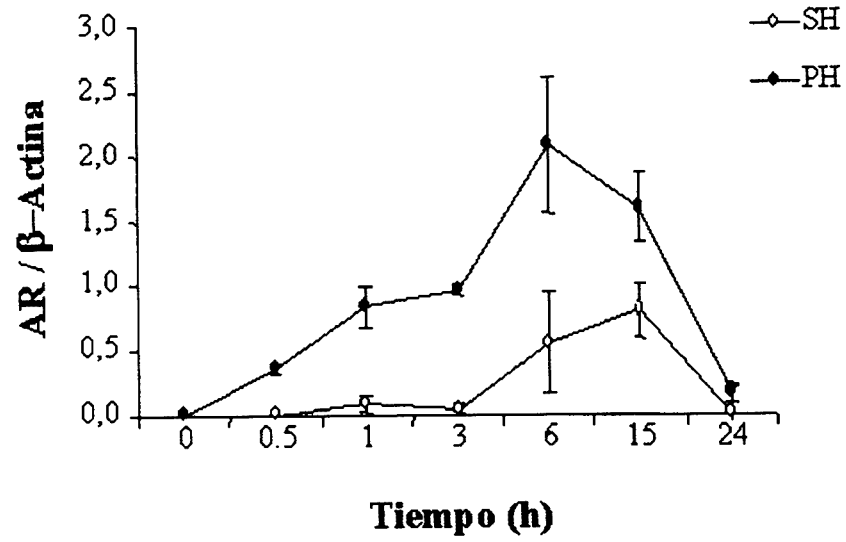
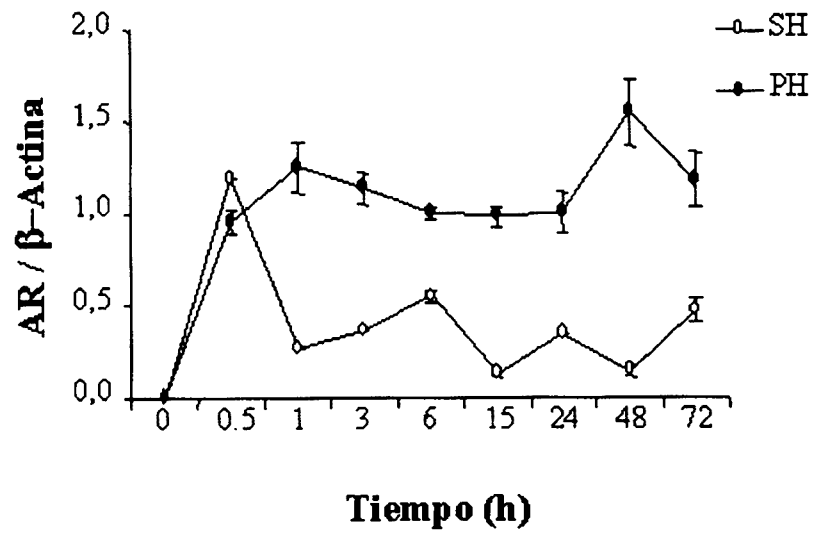


Figura 4D

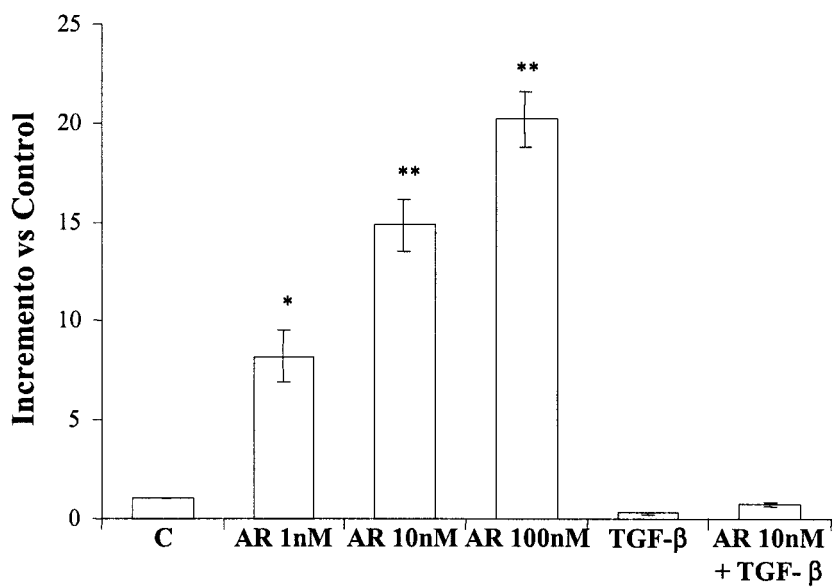
**A**



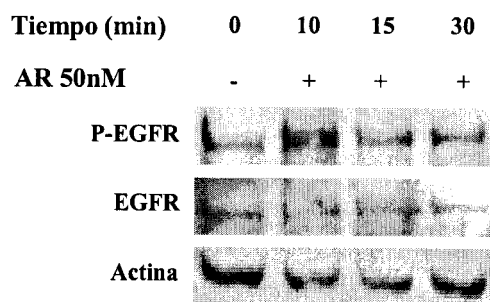
**B**



**Figura 5**



**Figura 6A**



**Figura 6B**

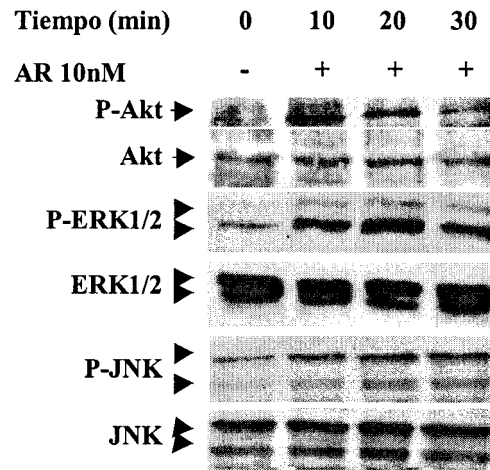


Figura 6C

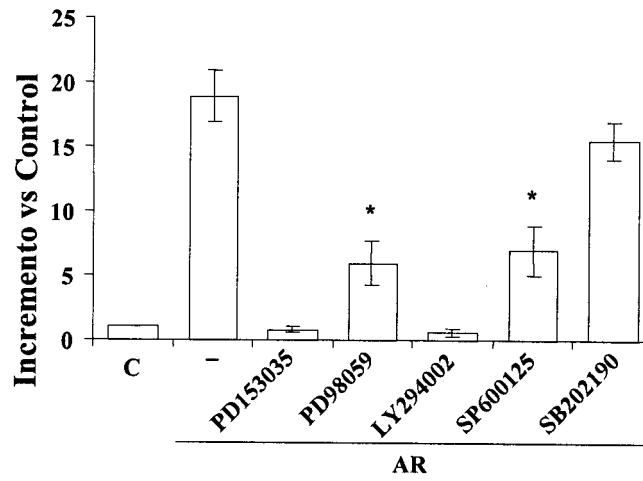


Figura 6D

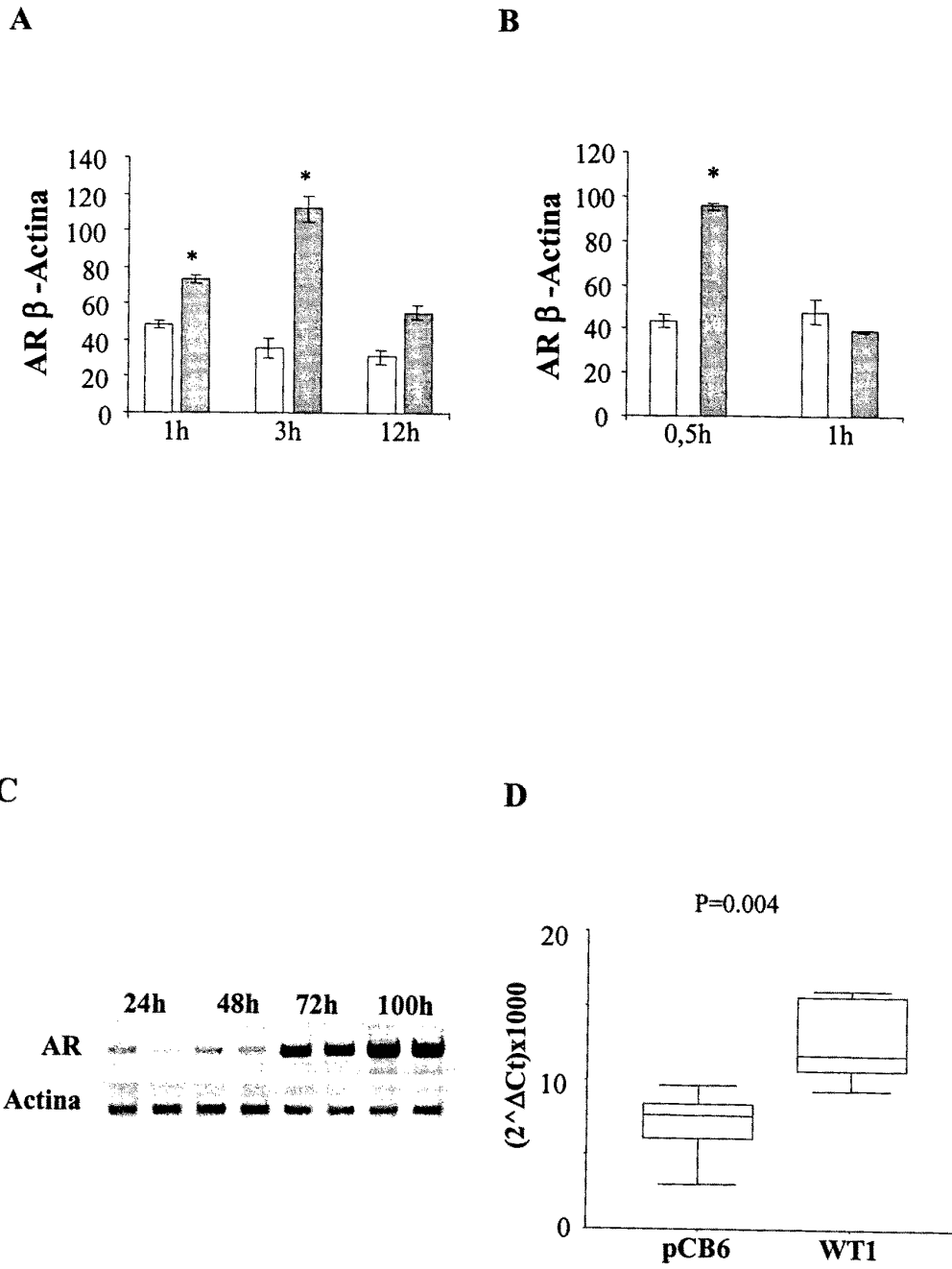
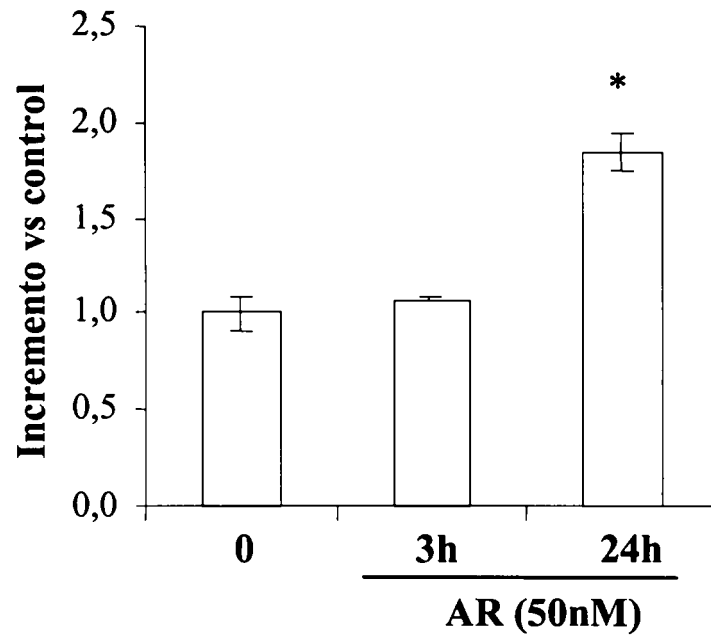
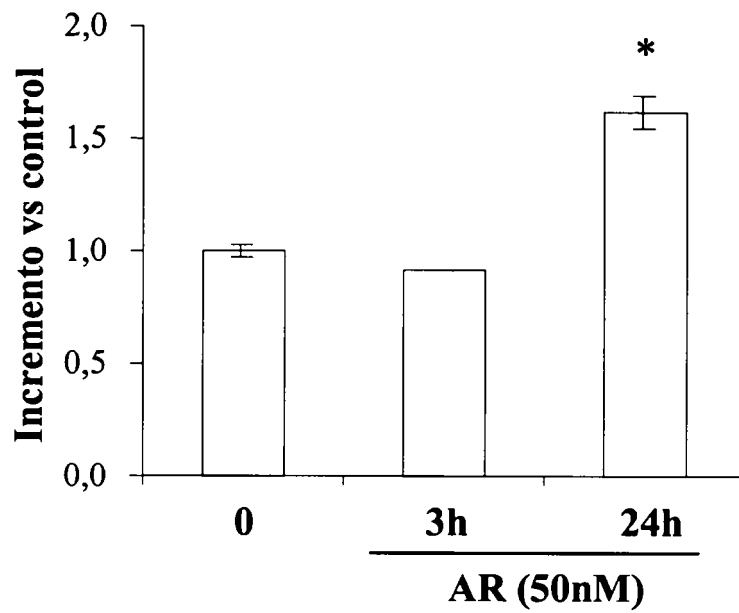


Figura 7

**A**



**B**



**Figura 8**

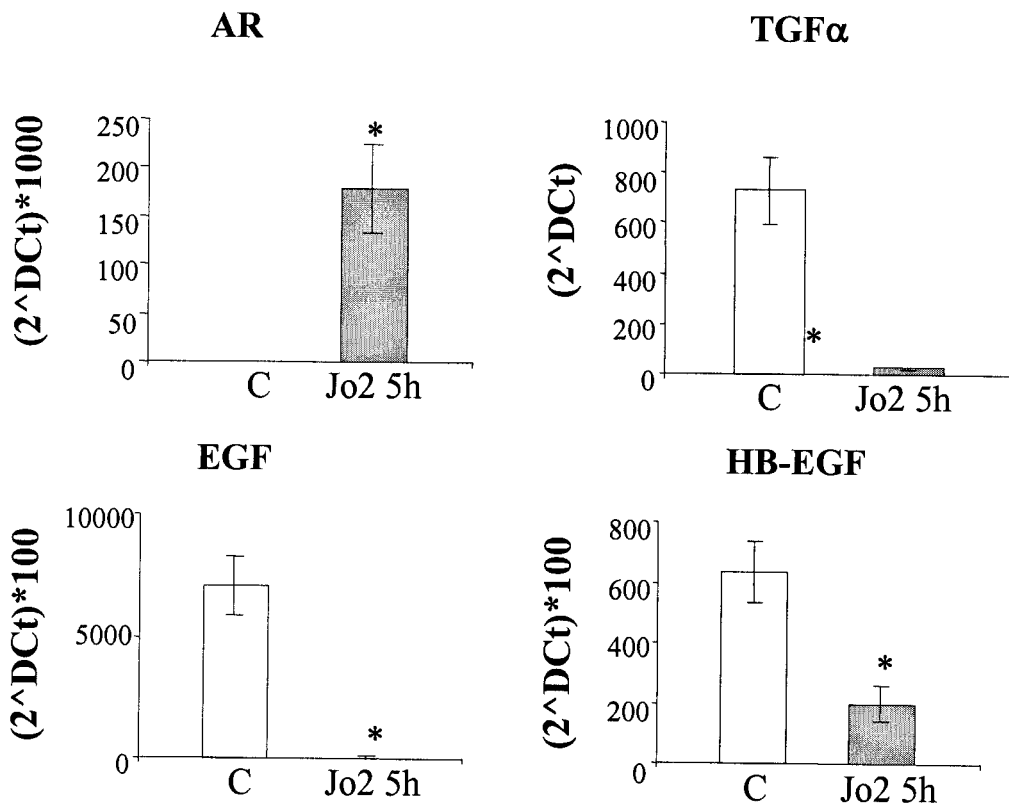


Figura 9



## ES 2 246 156 A1

	<400> 5		
	ctgctggtct taggctcagg		20
5	<210> 6		
	<211> 21		
	<212> ADN		
10	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 6		
15	gtctggaaga ccaccagact g		21
	<210> 7		
	<211> 21		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 7		
25	ccctg gatcc tattactgca c		21
	<210> 8		
30	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
35	<400> 8		
	atgaagctgc tgccgtcggg g		21
40	<210> 9		
	<211> 20		
	<212> ADN		
45	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 9		
	gcccagattc ccacactcag		20
50	<210> 10		
	<211> 25		
	<212> ADN		
55	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 10		
60	cgtttctcac tggctcaga tgccg		25
	<210> 11		
	<211> 15		
65	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		

## ES 2 246 156 A1

	<code>&lt;400&gt; 11</code>		
	<code>ctggtgcctg gggcg</code>		15
5	<code>&lt;210&gt; 12</code>		
	<code>&lt;211&gt; 17</code>		
	<code>&lt;212&gt; ADN</code>		
10	<code>&lt;213&gt; RATÓN</code>		
	<code>&lt;400&gt; 12</code>		
15	<code>catgacgccc tgggtc</code>		17
	<code>&lt;210&gt; 13</code>		
	<code>&lt;211&gt; 15</code>		
20	<code>&lt;212&gt; ADN</code>		
	<code>&lt;213&gt; RATA</code>		
	<code>&lt;400&gt; 13</code>		
25	<code>ctggtgccta gggcg</code>		15
	<code>&lt;210&gt; 14</code>		
30	<code>&lt;211&gt; 20</code>		
	<code>&lt;212&gt; ADN</code>		
	<code>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></code>		
35	<code>&lt;400&gt; 14</code>		
	<code>ctgtcgtctt tgatactgg</code>		20
40	<code>&lt;210&gt; 15</code>		
	<code>&lt;211&gt; 21</code>		
	<code>&lt;212&gt; ADN</code>		
45	<code>&lt;213&gt; RATÓN O RATA</code>		
	<code>&lt;400&gt; 15</code>		
	<code>ccaggttctc gatgatctg c</code>		21
50	<code>&lt;210&gt; 16</code>		
	<code>&lt;211&gt; 21</code>		
	<code>&lt;212&gt; ADN</code>		
55	<code>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></code>		
	<code>&lt;400&gt; 16</code>		
60	<code>agccgctcgg acaccgtag c</code>		21
	<code>&lt;210&gt; 17</code>		
	<code>&lt;211&gt; 21</code>		
65	<code>&lt;212&gt; ADN</code>		
	<code>&lt;213&gt; <i>Homo sapiens</i></code>		

## ES 2 246 156 A1

	<400> 17	
	gaaagcaatc acattcccag g	21
5	<210> 18	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 18	
15	tggatgcagt agtccttgta tttc	24
	<210> 19	
	<211> 17	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 19	
25	aggacagcca gggccac	17
	<210> 20	
30	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 20	
	ggaatcagat gaacttagga g	21
40		
45		
50		
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 246 156

② Nº de solicitud: 200401776

③ Fecha de presentación de la solicitud: **20.07.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C07K 14/475** (2006.01)  
**C07K 14/485** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ISFORT et al. "The combination of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta induces novel phenotypic changes in mouse liver stem cell lines". Dic. 1997. Journal of Cell Science, Vol. 110 (24), páginas 3117-3129.	1-8
A	HUANG H.L. et al. "Epidermal growth factor for enhancing DNA synthesis of hepatocytes and its protecting effect on animals with liver injury". Oct. 1992. Zhonghua yi xue za zhi. Vol. 72 (10), páginas 604-607. Resumen.	1-8
A	KOMURASAKI et al. "Mechanism of growth promoting activity of epiregulin in primary cultures of rat hepatocytes". 2002. Growth Factors. Vol. 20 (2), páginas 61-69.	1-8
A	WO 9846746 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES INC.) 22.10.1998, resumen.	1-8
A	US 6204359 B1 (DELAEY et al.) 20.03.2001, página 1, línea 55 - página 3, línea 2.	1-8
A	US 5115096 A (SHOYAB et al.) 19.05.1992, página 15, líneas 30-68.	1-8

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<b>Fecha de realización del informe</b> 20.09.2005	<b>Examinador</b> A. Collados Martín Posadillo	<b>Página</b> 1/1
---	---	----------------------