



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 616**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/52** (2006.01)  
**A61K 38/19** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02772422 .8**  
96 Fecha de presentación : **20.09.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1437365**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Uso de la cardiotrofina en enfermedades hepáticas.**

30 Prioridad: **21.09.2001 ES 200102120**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **Proyecto de Biomedicina Cima, S.L.**  
**Etxesakan, 28 - Oficina 5, Planta Baja**  
**31180 Zizur Mayor, Pamplona, ES**

72 Inventor/es: **Bustos de Abajo, Matilde;**  
**Prieto Valtueña, Jesús;**  
**Lasarte Sagastibelza, Juan José y**  
**Baixeras Llano, Elena**

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

ES 2 316 616 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

Uso de la cardiotrofina en enfermedades hepáticas.

5 **Ámbito de la invención**

La invención se refiere al uso de la cardiotrofina (CT-1) para estimular la regeneración hepática y proteger a los hepatocitos frente a procesos de apoptosis y necrosis. Por ello esta invención hace referencia a la utilización de cardiotrofina para el tratamiento de las hepatitis agudas, subagudas, fulminantes y crónicas y para el tratamiento de la cirrosis hepática, y también para facilitar la regeneración hepática tras hepatectomías, tras el trasplante hepático.

**Estado de la técnica**

El hígado, tanto en humanos como en animales, tiene la capacidad única de regular su crecimiento y su masa. Si un agente injuriantes destruye parte del parénquima hepático los hepatocitos sobrevivientes son capaces de replicarse y reemplazar el parénquima dañado. Si la resección hepática o la lesión hepatocelular de causa vírica, tóxica, inmunológica o metabólica afecta a una proporción muy elevada del parénquima de modo que se supere la capacidad regenerativa del tejido hepático remanente se desarrolla una insuficiencia hepática que puede ser letal. Actualmente, no existe ningún fármaco con efecto hepatoprotector y estimulante de la regeneración que pueda ser utilizado en la insuficiencia hepática aguda o crónica. Es por tanto urgente e importante aportar a la farmacopea hepatológica productos terapéuticos para estas indicaciones.

Un agente hepatoprotector es un producto o un principio activo capaz de proteger las células hepáticas contra una variedad de estímulos que causan toxicidad y/o daños en los hepatocitos y, por último, la necrosis o apoptosis. Por lo tanto, cuando se induce daño hepático, la administración de agentes hepatoprotector en la dosis correcta mejoraría la supervivencia de las células hepáticas facilitando la regeneración hepática, contribuyendo a la normalización de la función hepática y en casos extremos, a la supervivencia del individuo. Los daños hepáticos pueden ser inducidos por agentes tóxicos (incluido el alcohol), virus, trastornos autoinmunes, isquemia, isquemia/reperfusión (como en el caso del daño inducido en el hígado implantado durante el trasplante hepático) y, en general, por cualquier proceso inflamatorio. Un buen agente hepatoprotector impide o disminuye el desarrollo de daño hepático y muerte celular hepática en esas situaciones.

Por regeneración hepática entendemos la reacción del hígado para compensar una disminución en su masa funcional (ya sea disminución por la pérdida de tejidos o de células), mediante la proliferación de hepatocitos normales hasta que la masa hepática es restaurado. Hay varios eventos clínicos en los que la regeneración del hígado desempeña un papel importante, incluyendo la resección hepática durante la intervención quirúrgica (hepatectomía parcial o el trasplante hepático de donante vivo) o en situaciones de daño hepático, tal como se describe anteriormente (agentes tóxicos, virus, isquemia, isquemia/reperfusión, etc.). Tanto un agente estimulante como la regeneración hepática son capaces de inducir la proliferación hepatocelular, ayudando a reducir la mortalidad relacionada con el descenso de la masa funcional hepática.

Mediante la presente invención se propone el uso de cardiotrofina en enfermedades hepáticas.

Existen aplicaciones previas de cardiotrofina (también llamada CHF o factor de hipertrofia cardíaca) en el tratamiento de trastornos cardíacos y enfermedades neuro-degenerativas y neurológicas (WO 95/29237), como modulador de procesos inflamatorios locales ligados al receptor LIFR $\beta$  (WO 97/30146), incluyendo la regulación del metabolismo de hepatocitos en las respuestas inflamatorias (16), y particularmente las respuestas proteicas de fase aguda de respuesta (17) y más precisamente la expresión de ARNm de la haptoglobina humana y de la 2<sub>2</sub>-manoglobulina (18) en el diagnóstico y tratamiento de tumores (WO 00/43790), y en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson (WO 97/39629).

La invención no versa sobre ninguna de estas aplicaciones, pero se centra en los usos de CT-1 en las composiciones terapéuticas útiles en el tratamiento de los hepatocitos, especialmente como agente protector de éstos frente a procesos de apoptosis y necrosis y como agente estimulador de la regeneración hepática en general.

La CT-1 es una de las denominadas citoquinas neuro-poyéticas perteneciente a la familia de la IL-6 (1). Los receptores de las citoquinas de esta familia están compuestos de distintas subunidades, compartiendo todos ellos la subunidad gp130 (2). Algunos miembros de la familia (IL-6 y IL-11) inducen la homodimerización de gp130 (3), mientras que otros como el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la oncostatina y el factor neurotrófico ciliar (CNTF), inducen la heterodimerización de la subunidad gp130 con el receptor de LIF de 190 kDa (4). El receptor de CT-1 contiene la cadena gp130, la subunidad  $\beta$  del receptor LIF (LIFR $\beta$ ) y un tercer componente conocido como la subunidad  $\alpha$  del receptor CT-1 (5, 6). Este último participa en la formación de un complejo tripartito que confiere una alta sensibilidad y especificidad a CT-1. La activación del receptor de CT-1 induce una serie de señales intracelulares que incluyen la activación temprana de tirosina quinasas de la familia JAK (JAK-1, JAK-2 y Tyk2). Los principales efectores de las JAK son el grupo de factores de transcripción citosólicos STATs (STAT-1 y STAT 3; signal-transducing activators of transcription). La activación de las JAK señala también a través de la vía de Ras-MAP quinasa e interviene en la activación de la vía de PI3-K (phosphatidil inositol 3-quinasa) (2).

## ES 2 316 616 T3

La CT-1 fue originalmente identificada como factor hipertrófico en cardiomiocitos (7, 8) habiéndose demostrado un papel estimulante del desarrollo embrionario de cardiomiocitos y una acción protectora de cardiomiocitos frente a la apoptosis inducida por hipoxia, isquemia, y daño por isquemia-reperusión (8, 9, 10, 11, 12). Se ha descrito igualmente un efecto protector del miocardio en situaciones de fallo cardiaco (10). Otros efectos de la CT-1 son la promoción de la supervivencia de motoneuronas y neuronas dopaminérgicas (13, 14).

### Bibliografía

- 1.- **Gadient RA, Patterson PH.** Leukemia inhibitory factor, interleukin 6 and other cytokines using the GP-130 transducing receptor: Roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 1999; 17:127-137.
- 2.- **Kishimoto T, Taga T, Akira S.** Cytokine signal transduction. *Cell.* 1994 Jan 28;76(2):253-262.
- 3.- **Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T.** IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science.* 1993 Jun 18;260(5115):1808-1810.
- 4.- **Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Yancopoulos GD.** LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science.* 1993 Jun 18;260(5115): 1805-1808.
- 5.- **Pennica D, King KL, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh SM, Darbonne WC, Knutzon DS, Yen R, Chien KR, Baker JB.** Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* . 1995 Feb 14;92(4):1142-1146.
- 6.- **Robledo O, Fourcin M, Chevalier S, Guillet C, Auguste P, Pouplard-Barthelaix A, Pennica D, Gascan H.** Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third component. *J. Biol. Chem.* 1997, 272(8): 4855-4863
- 7.- **Sheng Z, Pennica D, Wood WI, Chien KR.** Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival. *Development* 1996; 122: 419-426.
- 8.- **Jin H, Yang R, Ko A, Pennica D, Wood WI, Paoni NF.** Effects of cardiotrophin-1 on haemodynamics and cardiac function in conscious rats. *Cytokine* 1998; 10: 19-25.
- 9.- **Latchman DS.** Cardiotrophin-1 (CT-1): a novel hypertrophic and cardioprotective agent. *Int. J. Exp. Pathol.* 1999; 80: 189-196.
- 10.- **Jougsaki M, Tachibana I, Luchner A, Ileskinen H, Redfield MM, Burnett JC.** Augmented cardiac cardiotrophin-1 in experimental congestive heart failure. *Circulation* 2000; 101: 14-17.
- 11.- **Hishinuma S, Funamoto M, Fujio Y, Kunisada K, Yamauchi-Takahara K.** Hypoxic stress induces cardiotrophin-1 expression in cardiac myocytes. *Biochem. Biophysic. Res. Commun* 1999; 264: 436-440.
- 12.- **Stephanou A, Brar B, Heads R, Knight RD, Marber MS, Pennica D, Latchman DS.** Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them from stressful stimuli. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1998; 30: 849-855.
- 13.- **Pennica D.** Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron* 1996; 17: 63-74.
- 14.- **Bordet T, Schmalbruch H, Pettmann B, Hagege A, Castelanu-Ptakhine, Kahn A, Haase G.** Adenoviral cardiotrophin-1 gene transfer protects pmn mice from progressive motor neuronopathy. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 1077-1085.
- 15.- **Bustos M, Sangro B, Alzuguren P, Gil A, Ruiz J, Beraza N, Qian C, Garcia-Pardo A, Prieto J.** Liver damage using suicide genes. A model for oval cell activation. *Am. J. Pathol.* 2000; 157(2): 549-559.
- 16.- **Olivier Robledo, Catherine Guillet, Sylvie Chevalier, Maryvonne Fourcin, Josy Froger, Annick Pouplard-Barthelaix, Diane Pennica and Hugues Gas-can.** Hepatocyte-derived cell lines express a functional receptor for cardiotrophin-1. *Eur. Cytokine Netw.*, Vol. 8 no. 3, September 1997, 245-252.
- 17.- **CD. Richards, C. Langdon, D. Pennica, and J. Gauldie.** Murine cardiotrophin-1 stimulates the acute-phase response in rat hepatocytes and H35 hepatoma cells. *Journal of interferon an cytokine research.* 16:69-75(1996).
- 18.- **Malte Peters, Elke Roeb, Diane Pennica, Karl-Hermann Meyer zum Büschenfelde, Stefan Rose-John.** A new hepatocyte stimulating factor: cardiotrophin-1 (CT-1). *FEBS Letters* 372 (1995) 177-180.

## Descripción de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el gen de la CT-1 se sobreexpresa durante el proceso de la regeneración hepática después de la resección quirúrgica de una porción del parénquima hepático, alcanzando el máximo de expresión a las 48 horas tras la hepatectomía en coincidencia con el momento de máxima proliferación de hepatocitos. A partir de este hallazgo se ha investigado la influencia de la CT-1 sobre el proceso de regeneración hepática habiéndose hallado que la trasducción del parénquima hepático con secuencias génicas codificantes para CT-1 estimula significativamente la regeneración hepática tras la hepatectomía parcial y previene la muerte del animal tras hepatectomías subtotales. Igualmente se ha comprobado que la trasducción del hígado con secuencias que codifican para CT-1 protege de manera altamente eficiente a los hepatocitos frente a diversidad de agentes hepato-tóxicos reduciendo marcadamente los fenómenos de apoptosis/necrosis hepatocelular. En definitiva, estos hallazgos prueban que la CT-1 es un poderoso agente protector de las células hepáticas frente a agentes causantes de muerte celular y posee además la propiedad de estimular los procesos de regeneración hepática.

Por ello, con la presente invención se propone y reivindica el uso de CT-1, o de una secuencia polinucleotídica que codifica y expresa para CT-1, en la fabricación de composiciones útiles para estimular la regeneración hepática tras resecciones quirúrgicas parciales del hígado o tras lesiones hepáticas inducidas por agentes químicos, agentes biológicos, mediadores inflamatorios o inmunológicos y también como fármaco hepatoprotector en las diversas variedades de hepatitis aguda, subaguda, fulminante o crónica de causa tóxica, viral, inmunológica o metabólica y para estimular la regeneración, proteger a los hepatocitos y mejorar la función hepática en la cirrosis hepática de causa alcohólica, vírica, metabólica o inmunológica y en el hígado trasplantado.

## Ejemplos

### 1. Vector adenoviral que contiene la secuencia génica codificante para CT-1 (AdCT-1)

Se ha construido un adenovirus defectivo (con delección en E1 y E3) que contiene el gen de cardiotrofina-1 (AdCT-1) y que fue realizado tal como detallamos a continuación. El cDNA murino de CT-1 se obtuvo por selección de una librería de cDNA de músculo de ratón con una sonda de PCR correspondiente a los nucleótidos 20-639 de la secuencia de cDNA de ratón (No acceso al GenBank. U18366). Fue clonado en el vector pGEM-T/CT-1 y confirmado por secuenciación. Posteriormente, el cDNA de CT-1 fue clonado en el vector pKS para formar pKS-CT-1 que contiene un "cassette de expresión" compuesto por el promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV nucleótidos 4526-5108 de M83237 GenBank), la señal peptídica de factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor, NGF nucleótidos 298-378 de V00836 GenBank), el cDNA murino de CT-1 (nucleótidos 20-639 de U18366 GenBank) y la señal de poliadenilación SV40 (nucleótidos 2546-2775 de NC0016691 GenBank). Este cassette de expresión fue liberado del plásmido pKS-CT-1 por BamHI/Sall y fue ligado al plásmido lanzadera adenoviral pGY63 en el sitio de HinfI para formar el plásmido pGY63-CT-1. Este plásmido pGY63-CT-1 contiene el ITR (inverted terminal repeat) adenoviral de la izquierda, la señal de empaquetamiento (ps) y parte del gen pIX y entre estos dos últimos se encuentra el "cassette" de expresión de CT-1. Este plásmido pGY63-CT-1 fue cotransformado en células electrocompetentes *E. Coli* SF800 junto con pXL2689 conteniendo el genoma adenoviral para recombinación homóloga. Los recombinantes correctos fueron digeridos con PacI y transfectados en células 293 (células renales embrionarias humanas transformadas con DNA del adenovirus 5, número de referencia de la ATCC, CRL-1573), para producción de adenovirus. La estructura de AdCT-1 queda recogida en la figura 1. Las cepas de *E. Coli* transformadas se depositaron el día 12 de septiembre de 2001 en la Colección Española de Cultivo tipo (*E. Coli* PKSCT1 N° CECT 5980) en la Universidad de Valencia (Burjasot, Valencia, España).

Para la producción de un stock de adenovirus se emplearon células 293 infectadas con el sobrenadante que contiene el adenovirus recombinante. Las células 293 se sembraron primeramente en placas de 6 pocillos con una confluencia aproximada del 80% y empleando medio DMEM al 2%. Tras varias horas, el medio de cultivo se retiró y las células se infectaron con 0,5  $\mu$ l del sobrenadante que contiene el adenovirus recombinante diluido en 3 ml de DMEM. Tras una incubación de 1 hora a 37°C, el inóculo se retiró y se agregaron 4 ml de agar. Las células se cultivaron durante un período de 5 a 7 días a 37°C. Empleando una pipeta Pasteur se recogió una muestra de virus a partir de una placa viral formada en la monocapa celular; el cilindro de agar se resuspendió en 500  $\mu$ l de DMEM con 2% de suero fetal bovino y se guardó a -80°C. Para identificar el adenovirus recombinante se sembraron células 293 en placas de 12 pocillos y posteriormente se infectaron con 250  $\mu$ l del virus aislado previamente. Cuando se empezaron a observar efectos citopáticos, se recolectaron las células de cada pocillo de forma independiente. Posteriormente, las células fueron sometidas a tres procesos de congelación y descongelación con el fin de romperlas y liberar el máximo de partículas virales. El lisado celular de cada serie se sometió a centrifugación durante 10 min a 1500 r.p.m. El sobrenadante que contiene el virus, se empleó para infectar de nuevo células 293 cultivadas en placas de 6 pocillos. Tan pronto como las células comenzaron a evidenciar una forma redondeada se recolectó el sobrenadante y la presencia de virus se confirmó por la detección de DNA y RNA viral en tal sobrenadante. El sobrenadante que evidenció altos niveles de expresión viral fue seleccionado para realizar su amplificación con el fin de construir el stock del adenovirus recombinante.

Las células 293 se cultivaron en placas de 150 mm (entre 50 a 100 placas) y se infectaron con adenovirus del stock empleando una M.O.I. de 10 (10 unidades formadoras de placa -pfu-/célula). Cuando las células presentaron efecto citopático fueron recolectadas y centrifugadas a 1500 r.p.m. durante 10 min, resuspendidas en Tris (pH 8) 0.1 M y congeladas a -80°C hasta su posterior purificación.

## ES 2 316 616 T3

El adenovirus recombinante se purificó utilizando gradientes de cloruro de cesio. Para ello, se resuspendieron las células guardadas a -80°C en Tris 0.01 M y se trataron con deoxicolato de sodio al 5% a una relación 1/10 (v/v) durante 30 min. Posteriormente, empleando un homogeneizador manual de cristal previamente enfriado, se rompieron las células hasta lograr una solución semi-líquida. Más tarde, se procedió a añadir el extracto celular a una solución de cloruro de cesio saturada manteniendo una relación de 5,8 ml de solución de cloruro de cesio por cada 10 ml de extracto celular. Esta mezcla se realizó en tubos especiales de polihalómero para sellado por calor (Quick-seal, Beckman Instruments, CA, EE.UU.). La centrifugación se hizo en rotor de ángulo fijo Beckman 50 Ti a 35.000 r.p.m. durante un período de 16-20 horas a 4°C. Se recogió la banda correspondiente al virus con aguja y jeringa estériles para someterla posteriormente a una segunda centrifugación empleando las mismas condiciones. Una vez extraída, la banda fue dializada contra Tris 0,01 M pH 8 a 4°C durante dos procesos independientes de 1,5 horas cada uno. El preparado de virus fue alicuotado en viales con glicerol estéril (ICN, EE.UU.) al 10% (v/v), congelado y mantenido en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

Para determinar la titulación infectiva de los adenovirus recombinantes purificados, se empleó el ensayo de dilución límite en placas de 96 pocillos. Este ensayo se basa en el estudio del efecto citopático que ejerce el virus sobre las células 293 determinando cual es la dilución máxima decimal de la suspensión de virus capaz de infectar y propagarse en las células 293. Las células 293 se sembraron previamente en placas de 96 pocillos a  $10^4$  células por pocillo. A continuación se retiró el medio de los pocillos y las células se infectaron con adenovirus en un volumen de 50  $\mu$ l por pocillo en diluciones seriadas y por duplicado. A las 6 horas después, se añadieron 150  $\mu$ l de medio DMEM fresco y finalmente las células se incubaron a 37°C durante un período máximo de 7 días. Tras este período, se evaluó la presencia de efectos citopáticos del virus sobre las células. El título se determinó tras multiplicar el número de células con efecto citopático por la máxima dilución en la que se observó el efecto y dividiendo el resultado por el volumen total evaluado (0.05 ml), de forma que identificamos el número de unidades formadoras de placa (pfu) por ml. La cuantificación fue repetida al menos en tres ocasiones para cada muestra.

### 2. CT-1, proteína recombinante

El cDNA que codifica para CT-1 se obtuvo del plásmido pGEM-T/CT-1 mediante digestión con EcoR1 y fue clonado en el vector pET28b (Novagen) (pET28b/CT-1). Este vector proporciona una secuencia que codifica para una serie de residuos de histidina (1 kDa) y que se traduce en fase con el cDNA clonado para producir una proteína de fusión que contiene en su extremo amino terminal una cola de histidinas de 1 kDa y a continuación la CT-1, con un sitio de corte por trombina entre ambos.

Para la producción de proteína se utilizaron bacterias competentes de la cepa BL21(DE3) (Novagen, Alemania, N° Cat. 70235) ya que esta cepa contiene un gen inducible de la RNA polimerasa de T7, que es un requisito necesario para la posterior producción de proteína. Las bacterias competentes se transformaron con el vector obtenido previamente: pET14b (vector pET-14b de Novagen, N° Cat. 69660-3) con el cDNA de la CT-1 clonada. Las bacterias transformadas se seleccionaron por su crecimiento en medio LB con ampicilina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a este antibiótico.

Para la producción de la CT-1 recombinante, las bacterias transformadas se crecieron en medio LB con ampicilina a 37°C hasta una densidad óptica de 0,4 a 600 nm. A continuación se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG a una concentración final de 0.5 mM. De esta forma se induce el promotor lac y como consecuencia, el promotor de la RNA polimerasa de T7 que contiene el vector y que regula la expresión del cDNA clonado. El cultivo se creció 4 horas más en las mismas condiciones.

Para obtener los extractos, una vez crecidas las bacterias, se centrifugaron a 4°C. Las bacterias precipitadas se resuspendieron en un tampón Tris/HCl 10 mM, sacarosa 10%, 2-mercaptoetanol 2 mM e inhibidores de proteasas. La homogeneización se realizó por sonicación tras una incubación de 30 minutos con lisozima a 4°C. Esto permitió romper la pared bacteriana y mejorar el rendimiento del proceso de extracción. El extracto citosólico se obtuvo a partir de la centrifugación del homogenizado a 100.000 x g durante 90 minutos. La producción de proteína se verificó mediante el análisis de la fracción citosólica por SDS-PAGE.

La purificación de la proteína de fusión His-CT-1 se purificó mediante la cromatografía del extracto citosólico en una columna de Níquel de 2 ml. Tras el lavado de la columna, la proteína se eluyó con 1 M imidazol. La proteína pura se procesó con trombina y se recuperó la CT-1.

### 3. Ensayos de Northern blot para medir la expresión de CT-1 *in vivo*

Se analizó la expresión de genes de diversas citoquinas (factor de crecimiento hepatocitario, HGF; LIF; Oncostatina; CNTF; CT-1) durante el proceso de regeneración hepática mediante la técnica de Northern blot, previa extracción de RNAm de los hígados de ratas. La extracción de RNA fue realizada mediante el método guanidinium tiocianato-fenol-cloroformo. El análisis mediante Northern blot fue realizado como previamente hemos descrito (15), utilizando la expresión del 28S como control de carga y utilizando sondas específicas para cada uno de los genes analizados.

## ES 2 316 616 T3

### 4. Cultivos Celulares de las líneas derivadas de Hepatocitos

Para los estudios “*in vitro*” se utilizaron células H35 que es una línea hepatocelular derivada de hepatocarcinoma de rata. Las células se cultivaron en medio Dulbecco’s modified Eagle medium (DMEM) suplementado con 10% de suero de ternera, glutamina 2 mM, estreptomycin 100 u/ml, penicilina a 100 mg/ml. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### 5. Técnicas de Análisis de Apoptosis por Ciclo Celular y Expresión de Anexina

Para el análisis del ciclo celular se empleó la técnica de tinción del DNA con yoduro de propidio. Las células (0,5 x 10<sup>6</sup>) se permeabilizaron con 50 µl de una solución de NP40 al 0,1% previamente a la tinción con 0,5 µl de una solución de 50 µg/ml de yoduro de propidio y RNAsa 4 KU/ml (DNA-Prep Coulter reagents kit, Coulter). Las células se incubaron a 37°C durante 20 min antes de examinarlas en el citofluorímetro FACScalibur. Las células positivas para yoduro de propidio se analizaron en el módulo de discriminación “doublet discrimination module”, DDM del citómetro de flujo (FACScalibur, Becton-Dickinson, EE.UU.) excluyendo los dobletes y usando el parámetro FL3. La frecuencia de células subdiploides definió el porcentaje de células en apoptosis.

La presencia de fosfatidilserinas orientadas hacia el exterior celular es uno de los parámetros que definen a una célula como apoptótica. La Anexina V detecta las células apoptóticas por su capacidad de unirse a las moléculas de fosfatidilserinas expuestas hacia el exterior de la membrana celular en el momento en que la célula está determinada a sufrir apoptosis. Las células (0,5 x 10<sup>6</sup>) se lavaron una vez en un tampón de incubación que contiene: NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, CaCl<sub>2</sub>, y Hepes 10 mM. Las células se incubaron en 100 µl de tampón de incubación y 5 µl de conjugado de isotiocianato de fluoresceína acoplado a la anexina V (Anexina-FITC), durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación se examinaron las células por el FACScalibur utilizando el parámetro FL1. El índice de apoptosis se determinó por el porcentaje de células positivas para Anexina-FITC.

### 6. Métodos de análisis de proteínas

*Electroforesis.* Para el análisis de proteínas, las células se lisaron en un tampón de lisis (20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton x-100, 2,5 mM pirofosfato sódico, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 1 µg/ml de leupeptina, pepstatina, 10 µg/ml de inhibidor de la tripsina, 1 mM PMSF. El lisado de 0,5 x 10<sup>6</sup> de células se resuspendió V/V en un tampón de migración (125 mM Tris-ClH (pH 6,8), 10% dodecilsulfato sódico, 20% de glicerol, 100 mM ditiotreitol, 0,2% de azul de bromofenol). Las muestras de extracto de proteínas se calentaron a 100°C durante 5 min y se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%.

*Inmunodetección por Western blot.* Tras la electroforesis, las proteínas se sometieron a una transferencia a membranas de nitrocelulosa en un tampón de transferencia (25 mM Tris, 0,2M glicina, 20% Metanol, pH 8,5) a un amperaje de 300 mA durante 1 h. Las proteínas transferidas se tiñeron con una solución de rojo ponceau para comprobar el éxito de la transferencia. A continuación, las membranas se sometieron a la inmunodetección de las proteínas específicas. Para ello, las membranas se bloquearon en un tampón de incubación TBS-T (20 mM Tris, 137 mM ClNa, a pH 7,6 y 0,5% de Tween 20) con 2% de BSA (albúmina fracción V) durante 1 h. Las membranas se sometieron a la incubación con anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína a estudiar durante 2 h. Seguidamente se lavaron las membranas con tampón TBS-T durante 1h y se volvieron a someter a la incubación con proteína G-HRPO (BIORAD) durante 1h. Tras varios lavados en tampón TBS-T, las membranas se revelaron con los reactivos de quimioluminiscencia (NEN Life Science Products) y se sometieron inmediatamente a la exposición sobre películas hipersensibles (Amersham) a tiempos determinados.

*Inmunoprecipitación.* Para la inmunoprecipitación de proteínas específicas, los lisados de 10<sup>6</sup> de células se sometieron a una incubación durante 18h en presencia del anticuerpo específico y 20 µl de proteína G-sefarosa a 4°C. Los inmunocomplejos se aislaron por centrifugación, se lavaron dos veces en tampón de lisis y se disolvieron en tampón de migración. Seguidamente, las muestras se calentaron a 100°C y se sometieron a migración por electroforesis en geles del 10%. La inmunodetección de las proteínas específicas se llevó a cabo por western blot.

### 7. Determinación de síntesis de DNA. Ensayos de proliferación

Las células H-35 se sembraron en placas de 96 pocillos. Tras 24 horas de privación de suero se estimularon con CT-1 (50 ng/ml) diluida en DMEM sin suero. Después de 24 horas de incubación con CT-1, se marcó con 10 µCi/ml [methyl-<sup>3</sup>H]-thimidina (ICN, Amersham) por 12 horas. El medio radioactivo se quitó y las células se despegaron usando 100 µl de Tripsina a 37°C recogidas en 25 µl de líquido de centelleo (Ecolite; ICN). La incorporación [<sup>3</sup>H]-timidina fue analizada usando a tri Carb 2900TR contador de centelleo (Packard, Meriden, CT).

### 8. Ensayos *in vivo* de regeneración hepática tras hepatectomía parcial (resección quirúrgica del 75%)

Los estudios de regeneración hepática se realizaron en ratas Fisher (machos de 180 grs de peso). La resección quirúrgica incluía el 75% de hígado y las ratas se sacrificaron a distintos tiempos (1 h, 3 h, 6 h, 10 h, 24 h, 48h, 3 días, 6 días y 9 días). Las muestras de hígado se recogieron posteriormente y se repartieron en tres partes para: el estudio histológico (fijadas en formol), el estudio inmunohistoquímico (fijadas en OCT) y para el análisis de RNA (congeladas en nitrógeno líquido). Para cada tiempo analizado se utilizaron un mínimo de 4 ratas. Como parámetros de

regeneración hepática se analizó el % de peso del hígado así como la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) mediante inmunohistoquímica.

### 8.1. Expresión génica de CT-1 durante la regeneración hepática

La expresión de genes de diversas citoquinas (HGF, LIF, Oncostatina, CNTF, CT-1) se analizó en el modelo de hepatectomía parcial con el fin de estudiar su implicación en regeneración hepática. Para este estudio, se analizaron muestras procedentes de hígados de rata obtenidos a distintos tiempos tras hepatectomía parcial (1 h, 3 h, 6 h, 10 h, 24 h, 48 h, 3 días, 6 días y 9 días). Cada grupo incluía un mínimo de 4 animales. Asimismo, fueron analizados hígados procedentes de ratas sanas a las que no se practicó hepatectomía (controles). Mediante la técnica de Northern blot se comprobaron los niveles de RNAm correspondientes de cada citoquina. Estos experimentos permitieron realizar la observación enteramente novedosa de que los niveles de RNAm de CT-1 aumentan significativamente a las 24 y 48 horas post-hepatectomía (Fig. 2 y 3) coincidiendo con la máxima proliferación de hepatocitos, tal como la demuestra la expresión de PCNA e incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) por hepatocitos en el examen inmunohistoquímico de las muestras de tejido hepático de los animales estudiados. Además pudimos observar que el incremento en la expresión transcripcional de CT-1 era precedido por un pico en la expresión de HGF, el cual ocurría a las 10 horas tras la hepatectomía.

### 8.2. Efecto de CT-1 sobre la regeneración hepática tras la hepatectomía parcial

Para estudiar el papel de CT-1 en regeneración hepática, se inyectó el adenovirus CT-1 (AdCT-1) por vía intravenosa a dosis de 10<sup>8</sup> pfu o el adenovirus con gen reportero LacZ (AdLac-Z) como control a la misma dosis. A las 48 h más tarde se procedió a la resección quirúrgica del 75% del hígado. Las ratas se sacrificaron entonces a los mismos tiempos anteriormente mencionados. Para cada tiempo analizado se utilizó un mínimo de 4 ratas y un máximo de 8 ratas.

La administración de AdCT-1 indujo un incremento del peso del hígado en las ratas tratadas con AdCT-1 frente a las que recibieron AdLac-Z con diferencias significativas entre los dos grupos a las 48 horas, momento en el que tiene lugar la máxima proliferación de hepatocitos (tal como lo demuestran las inmunotinciones para PCNA en las muestras de hígado obtenidas de estas ratas tras la hepatectomía). A los 3 y 6 días tras la hepatectomía el peso de los hígados de las ratas tratadas con AdCT-1 era superior al de las ratas control, sin embargo en estos tiempos las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas (Fig. 4). Estos resultados indican que los hígados tratados con CT-1 muestran una aceleración de la regeneración hepática presentando pesos superiores a los controles en la fase inicial tras la hepatectomía pero alcanzando finalmente valores semejantes a los controles por los mecanismos homeostáticos que controlan el tamaño final de la víscera hepática.

### 9. Ensayos *in vivo* de regeneración hepática tras hepatectomía ampliada (resección quirúrgica de > 85%)

Con el fin de valorar si la CT-1 podría evitar la muerte de animales sometidos a hepatectomía subtotal se realizaron experimentos en ratas Fischer en las que se realizó resección quirúrgica superior al 85% del hígado. Para esta parte de la experimentación se emplearon 2 grupos de 30 ratas. Un grupo se trató con AdLac-Z y el otro grupo con AdCT-1 por vía intravenosa y a las dosis anteriormente mencionadas. A las 48 horas después de la administración del adenovirus, se procedió a la práctica de este tipo de resección quirúrgica. El número de ratas que sobrevivieron a la resección quirúrgica se redujo a 14 ratas para el grupo de AdLac-Z y 13 ratas para el grupo de las inyectadas con AdCT-1. Estas ratas fueron controladas para ver supervivencia a largo plazo tras la amplia resección quirúrgica.

Se observó que en la primera hora tras la hepatectomía la mortalidad fue del 77% en el grupo AdLac-Z, mientras que no llegó al 20% en el grupo AdCT-1. A las 24 horas tras la hepatectomía solo el 7% de ratas tratadas con el AdLac-Z estaban vivas mientras que la supervivencia fue del 61% en las ratas tratadas con AdCT-1, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Estos porcentajes se mantuvieron en los mismos valores a los 4 días tras la intervención (Fig 5). Nuestros datos indican que la CT-1 protege frente a la mortalidad asociada a resecciones hepáticas extensas.

### 10. Efecto protector de CT-1 frente a apoptosis/necrosis de hepatocitos "*in vivo*". Ensayos de daño hepático fulminante

Para valorar el papel de CT-1 en la modulación del daño hepático inducido por diversos agentes injuriantes se utilizaron ratones Balb/c (machos de 30 grs de peso) valorándose el daño hepático en tres modelos de lesión hepatocelular: i) daño inducido por la administración intravenosa de 100 mg/Kg de Concanavalina A, ConA (Sigma, St. Louis, MO. USA); ii) daño inducido por la combinación de administración intravenosa de TNF $\alpha$  (Peptotech) (0,5  $\mu$ g/ratón) y administración intra-peritoneal de 25 mg D-galactosamina, TNF $\alpha$ /D-Gal (Sigma); iii) daño inducido por la administración intravenosa de 1,5  $\mu$ g/ratón anti-Fas (Jo2, Pahrmingen). A las 6 horas después de la administración de ConA, o TNF $\alpha$ /D-Gal o anti-Fas, se extrajo sangre de los ratones y se sacrificaron.

Para determinar el efecto de la CT-1 sobre el daño hepático, se trató un grupo "A" de ratones con solución salina, un grupo "B" con AdLac-Z (10<sup>7</sup> pfu) y un grupo "C" con AdCT-1 (10<sup>7</sup> pfu). Tras 48 horas se indujo daño hepático en cada grupo en los 3 modelos descritos en el párrafo anterior. Se incluyó también un grupo de ratones tratados con suero salino, en lugar del inductor de hepatitis, como control negativo (CN) del experimento. Cada grupo de animales incluía 5 ratones. Después de 6 horas, se examinó la intensidad del daño hepático según 2 parámetros: medida de

## ES 2 316 616 T3

transaminasas (GPT) en suero mediante ensayo colorimétrico automatizado (Technicon RA-1000, Bayer) y medida de apoptosis mediante la técnica de TUNEL en muestras de hígado fijadas en OCT, utilizando la técnica de “*in situ* death cell detection kit” (Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, IN, USA).

5 Se extrajeron las muestras de sangre de cada ratón para la determinación de transaminasas e inmediatamente después, los animales fueron sacrificados y los hígados fueron procesados para estudio histológico (fijación en formol) y estudio de apoptosis por la técnica de TUNEL (congelación en OCT).

10 En el primer modelo de daño hepático agudo inducido por la administración de Con-A, se pudo comprobar que mientras los ratones de los grupos control (animales que habían recibido salino o AdLac-Z) mostraban unos valores muy elevados de GPT, los niveles de transaminasas apenas se modificaron en los animales tratados con AdCT-1 siendo las diferencias entre éstos y los ratones de los grupos control altamente significativas (Fig. 6A). Al realizar la técnica de TUNEL en el tejido hepático observamos ausencia de apoptosis en las muestras de hígado de ratones tratados con AdCT-1 frente a amplias zonas de necrosis y apoptosis en los animales que habían recibido suero salino o AdLac-Z  
15 previamente a la administración de Con-A (Fig. 7).

20 En el segundo modelo de daño hepático agudo, inducido mediante la administración del anticuerpo monoclonal anti-Fas, también pudimos observar que el tratamiento con AdCT-1 prevenía la muerte hepatocelular (Fig. 6B). Seis horas después de la administración de anti-Fas se observó que la cifra de transaminasas en los animales que habían recibido AdCT-1 era considerablemente inferior (con diferencias estadísticamente significativas) en aquellos animales tratados con AdCT-1 que en los que habían recibido suero salino o AdLac-Z. Asimismo en muestras de tejido hepático se observó mediante la técnica de TUNEL y el análisis histológico una gran disminución de cuerpos apoptóticos en los ratones tratados con AdCT-1 en comparación con los animales de los grupos control.

25 El papel hepatoprotector de la CT-1 se evaluó también en un tercer modelo de lesión hepática consistente en la administración combinada de TNF $\alpha$  y de D-galactosamina (TNF- $\alpha$ /DGal). A las 6 horas del daño hepático los niveles de transaminasas, así como los resultados histológicos mostraron una marcada disminución de la cifra de transaminasas y del número de hepatocitos apoptóticos por la técnica de TUNEL en los ratones tratados con AdCT-1 en comparación con los ratones de los grupos control (Fig. 6C).

30 Todos estos datos indican que la CT-1 tiene la capacidad de proteger a las células hepáticas frente a una diversidad de estímulos causantes de apoptosis o necrosis hepatocelular.

### 35 11. *Análisis del efecto de la CT-1 sobre el ciclo celular y supervivencia en hepatocitos derivados de líneas celulares*

Utilizando la línea hepatocelular de rata H35 se han analizado los efectos biológicos que la CT-1 recombinante podría ejercer como citoquina reguladora de la apoptosis de hepatocitos. Para los ensayos de estimulación con CT-1, las células se depleccionaron previamente de suero durante 18h. Los ensayos de estimulación con CT-1 se realizaron en ausencia de suero.

40 Primero se analizó el efecto de la CT-1 sobre el ciclo celular de esta línea hepatocelular. El ciclo celular fue determinado mediante tinción del DNA con yoduro de propidio y posterior análisis por citofluorometría de flujo. La apoptosis se indujo mediante privación de suero en el medio de cultivo de las células durante 4 días. Los resultados mostraron que a los 4 días de cultivo en estas condiciones, un 86% de las células H35 entraban en apoptosis. Se pudo observar que con la presencia de CT-1 a dosis de 50 ng/ml y en ausencia de otro coestimulo, CT-1 fue capaz de retardar de forma evidente la entrada en apoptosis de las células H35 las cuales presentaron apoptosis en un 52% de las células (Fig. 7).

45 Experimentos similares se llevaron a cabo sometiendo a los cultivos celulares de H35 a privación de suero durante 3 días y midiendo posteriormente la capacidad de las células de unir Anexina purificada acoplada a FITC (isotiocianato de fluoresceína) en su superficie. La unión de Anexina-FITC a la superficie de las células H35 se estudió mediante análisis por citofluorometría de flujo. Se pudo comprobar que mientras las células cultivadas en ausencia de CT-1 presentaban un 21% de positividad para anexina, las que habían sido tratadas con 50 ng/ml de CT-1 presentaron un 12%. (Fig. 8). Estos experimentos confirmaron por tanto que la CT-1, a la dosis empleada, es capaz de ejercer un efecto antiapoptótico.

### 55 12. *Análisis del efecto de la CT-1 sobre la proliferación celular*

60 Utilizando la línea celular H-35 se analizó la capacidad que CT-1 puede tener en la síntesis de DNA en células hepatocitarias. Para ello se sembraron 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Para ver su posible estimulación, las células fueron depleccionadas previamente de suero durante 24 horas. Los ensayos de estimulación con CT-1 se realizaron en ausencia de suero y a dosis de 50 ng/ml durante 24 horas. Los resultados mostraron que las células cultivadas con la presencia de CT-1 exhibían un mayor porcentaje de síntesis de DNA que las células controles donde no se puso CT-1 (Fig. 9). Estos experimentos confirmaron por tanto que CT-1, a la dosis utilizada, es capaz de inducir  
65 síntesis de DNA.

## 13. Estudio y análisis de las vías señalización inducidas por CT-1 en las líneas derivadas de hepatocitos

El descubrimiento de que la CT-1 ejercía un efecto antiapoptótico en hepatocitos tanto *in vivo* como *in vitro*, llevó a estudiar las vías de señalización implicadas en la estimulación del receptor de la CT-1 en hepatocitos. La estimulación de receptores de la familia de citoquinas IL-6/LIF resulta en la inmediata fosforilación de transmisores de la señal pertenecientes a la familia de JAK-1. Tras la estimulación de H35 con CT-1 a distintos tiempos, se realizó una inmunoprecipitación de la JAK-1 con un anticuerpo específico (Cell Signaling Technology) a partir de lisados totales de estas células. Utilizando un anticuerpo específico para tirosinas fosforiladas (4G10, Upstate Biotechnology) y mediante la técnica de western blot, se pudo comprobar que la CT-1 indujo una fosforilación en tirosinas de la molécula JAK-1 a los 5 minutos, desapareciendo la señal a los 60 min después (Fig. 10A).

La fosforilación de STAT-3, es una de las vías de activación descritas que interviene en la señal de citoquinas de la familia de la IL-6 a través de JAK. Su activación por fosforilación está asociada a la inducción de diferenciación celular en algunos casos e hipertrofia en otros (miocardiocitos). Mediante la técnica de western blot se analizaron lisados de H35 tratadas *in vitro* con 50 ng/ml de CT-1 a distintos tiempos. La utilización de un anticuerpo específico para STAT-3 fosforilada (Santa Cruz Biotechnology) sirvió para comprobar que la CT-1 es capaz de inducir la fosforilación de STAT-3 a partir de los 5 min post-estimulación, alcanzando un máximo a los 30 min (Fig. 10B).

Una de las vías claramente implicadas en la inhibición de la señal apoptótica es la vía de la PI-3/AKT (quinasa fosfatidinositol-3/quinasa AKT). La activación de PI-3K induce la activación por fosforilación de AKT en la serina 475 y treonina 308. La activación de AKT provoca a su vez la fosforilación de BAD en las serinas 112 y 136. BAD es un miembro de la familia de Bcl-2 y es un regulador importante de la señal de supervivencia. BAD inactivo dimeriza con las proteínas Bcl-x o Bcl-2 neutralizando su actividad antiapoptótica. La fosforilación de BAD conlleva la liberación de Bcl-2 o Bcl-x que suprimirán la vía de apoptosis. Por tanto, la fosforilación de BAD supone la supresión de la vía de apoptosis. En el presente estudio examinamos si la CT-1 podía activar esta vía de supervivencia en las H35. Tras el tratamiento de las células con 50 ng/ml de CT-1 a distintos tiempos se procedió a la obtención de la fracción citosólica y posterior inmunoprecipitación de AKT con un anticuerpo policlonal anti-AKT (Cell Signaling Technology). Posteriormente se analizó por western blot la presencia de AKT fosforilada mediante la utilización de un anticuerpo policlonal específico para la forma de AKT fosforilada en serina 475 (Cell Signaling Technology). Se comprobó que la CT-1 inducía la fosforilación de AKT estable en la serina 475 a los 15 y 30 min para desaparecer a los 60 min. Por tanto, la CT-1 induce una señal de supervivencia en líneas celulares hepatocitarias (Fig. 10 C).

En resumen, la CT-1 es capaz de inducir la vía de señalización de JAK/STAT así como la vía de supervivencia PI-3K/AKT. Por tanto, la cascada de señales inducida por la CT-1 en hepatocitos explica que la CT-1 actúe como una citoquina con efectos antiapoptóticos a través de la vía PI-3k/AKT y posiblemente como inductora de la proliferación y diferenciación en hepatocitos a través de la vía JAK/STAT-3.

14. Estudio y análisis de las vías de señalización inducidas por AdCT-1 en modelos “*in vivo*” de fallo hepático agudo

Con el fin de analizar el efecto protector del AdCT-1 observado en los modelos “*in vivo*” de daño hepático agudo en rata y ratón, se estudiaron también en estos modelos “*in vivo*” las vías de señalización que, como se había observado “*in vitro*”, parecen estar implicadas en la estimulación del receptor de la CT-1 en hepatocitos.

Tal como se ha descrito anteriormente *in vitro*, CT-1 es capaz de inducir activación de las tres vías principales implicadas en supervivencia o anti-apoptosis: STAT-3 (signal transducer and activator of transcription), PI-3K(phosphatidylinositol 3-OH kinase)/AKT y Erk1/2 (extracellular regulated kinases).

## a. Modelo en rata de hepatectomía ampliada

Como se comprobó en los experimentos descritos en el ejemplo 9 (resección hepática > 85%), la mayor mortalidad se observó 1 hora después de la resección quirúrgica (ver Figura 5). Por este motivo, se repitieron dichos experimentos con 3 grupos de tratamiento (AdCT-1, AdLac-Z y salino), pero esta vez se sacrificaron las ratas 1 hora después de la resección quirúrgica para tomar muestras de hígado.

Las muestras de hígado recogidas se repartieron en tres partes para el estudio histológico (fijadas en formol), el estudio inmunohistoquímico (fijadas en OCT) y para el análisis de proteínas (congeladas en nitrógeno líquido). A partir de las muestras congeladas en nitrógeno líquido se obtuvieron homogeneizados de hígado en buffer de lisis (20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1mM EDTA; 1% Triton x-100; 2,5 mM sodium pyrophosphate; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y un cocktail de antiproteasas). Mediante Western blots con anticuerpos específicos obtenidos de Cell Signalling Tech (Beverly, Massachusetts) se realizó el estudio de señalización en los tres grupos de ratas: tratadas con AdCT-1, con AdLac-Z, y con salino (S). Los anticuerpos utilizados fueron anti-Stat-3, anti-Stat-3 fosforilada (Stat-3-Y-705), anti-AKT, anti-AKT fosforilada (Akt-Ser-473), anti-Erk1/2, y anti-Erk1/2 fosforiladas que detecta simultáneamente las formas fosforiladas de Erk1 (Erk1-Thr-202) y Erk2 (Erk2-Y-204). De esta manera, se observó que los hígados de ratas tratadas con AdCT-1 mostraban fosforilación de STAT-3, ERK1/2 y AKT en contraposición con los de ratas tratadas con AdLac-Z y salino que no lo mostraban (Figura 12A).

Por otra parte, la Caspasa-3 participa en la ejecución de apoptosis en respuesta a muchos estímulos, incluyendo hepatectomías ampliadas (> 85%). Por este motivo se realizó un ensayo de actividad caspasa-3 (CaspACE, Promega,

Madison, Wisconsin), siguiendo el protocolo de ensayo dado por la casa comercial, sobre una parte de las muestras recogidas en nitrógeno líquido. Se observó que los hígados de ratas tratadas previamente con AdCT-1 mostraban una actividad caspasa-3 más baja comparada con la observada en hígados de ratas tratadas con AdLac-Z y salino (Figura 12B) indicando así un menor índice de apoptosis en los primeros.

5

Todo esto sugiere que el efecto protector producido por AdCT-1 en el daño hepático en rata viene dado por la iniciación de cascadas de señales anti-apoptóticas inducidas por CT-1 con la consiguiente reducción de apoptosis tal como lo demuestra la baja actividad de caspasa-3 encontrada.

#### 10 b. Modelo en ratones de daño hepático agudo inducido por Concanavalina A

Para estudiar la señalización en este modelo, se repitieron los experimentos de inducción con Con-A (ver ejemplo 10) con 3 grupos de tratamiento (AdCT-1, AdLac-Z y salino), pero esta vez sacrificando los ratones 1 hora después de la administración de Con-A. Las muestras de hígado obtenidas en el momento del sacrificio se procesaron como se ha descrito en el ejemplo 14a anterior. Los Western blot se realizaron del mismo modo y utilizando los mismos anticuerpos.

15

Tal como se observa en la Figura 13, el tratamiento con AdCT-1 indujo fosforilación de AKT y ERK 1/2, principales vías anti-apoptóticas y de supervivencia inducidas por CT-1. Por tanto, estos resultados sugieren que AdCT-1 protege a los ratones del daño hepático inducido por Con-A activando estas vías principales de anti-apoptosis.

20

### Descripción de las figuras

25 Fig. 1. Esquema de la estructura del vector adenoviral AdCT-1 que contiene la secuencia codificante para CT-1. RSV: promotor del virus del sarcoma de Rous; NGF: señal peptídica de factor de crecimiento de nervios; CT-1: cDNA de CT-1 murino; SV40: señal de poliadenilación del virus SV40. En negro las regiones E1 y E3 suprimidas.

30 Fig. 2. Detección por Northern blot del RNAm codificante para CT-1 en muestras de hígados de rata obtenidas a distintos tiempos (h=horas; d=días) después de hepatectomía parcial. 28S: RNAr como control de carga.

Fig. 3. Representación gráfica de la expresión de CT-1 a los largo del tiempo (h=horas, d=días) en el Northern blot de la Fig. 2. En ordenadas unidades arbitrarias de densidad óptica (CT-1/28S).

35 Fig.4. Porcentaje de peso del hígado de rata (en ordenadas) a distintos tiempos (abcisas, h=horas, d=días) tras hepatectomía parcial previa administración de AdCT-1 o AdLac-Z y después de realizar una hepatectomía parcial.

Fig. 5. Porcentaje de supervivencia (en ordenadas) en ratas tratadas con AdCT-1 o AdLac-Z y hepatectomizadas (>85%) a las 48 horas después del tratamiento. En abcisas el tiempo (horas) transcurrido tras la hepatectomía.

40

Fig. 6. Representación gráfica de los niveles séricos de transaminasas, GPT (en ordenadas, unidades SF/ml) e imágenes histológicas de tejido hepático (técnica de TUNEL para visualización de apoptosis) procedentes de 3 modelos de inducción de hepatitis fulminante en ratones: mediante administración de Concanavalina A, Con-A (Fig. 6A); mediante administración del anticuerpo anti-Fas (Fig. 6B); y mediante coadministración de TNF $\alpha$  y D-Galactosamina, TNF $\alpha$ /D-Gal (Fig. 6C). 48 horas antes de la inducción de hepatitis los animales fueron tratados con un vector adenoviral (AdCT-1 o AdLac-Z), o con suero salino (S). Control Negativo (CN) corresponde a un grupo de ratones al que se administró suero salino en lugar del agente inductor de hepatitis.

Fig. 7. Análisis del ciclo celular de células H-35 tras 1 día (arriba) y 4 días (abajo) tras la deprivación de suero sin la presencia de CT-1 (C=control) y la presencia de CT-1 (CT-1). Areas seleccionadas de izquierda a derecha: Células con DNA menos de 2n (células apoptóticas, Apo); células en G0-G1 (células en reposo) y células en S y M (células en proliferación). Ordenadas (número de células). Abcisas (Contenido DNA).

50

Fig. 8. Análisis por citometría de flujo de la expresión de Anexina V en células H-35 tras la deprivación de suero durante 3 días sin la presencia de CT-1 (C=control) y en presencia de CT-1 (CT-1). Las células cultivadas con CT-1 presentaban un 12% de células apoptóticas frente al 21% de células apoptóticas observadas con ausencia de CT-1.

55

Fig. 9. Análisis del efecto de la CT-1 sobre proliferación celular medido por incorporación de [ $^3$ H]timidina. Los resultados muestran el porcentaje de incremento (ordenadas) de proliferación en las células tratadas con CT-1 (CT-1) respecto a células controles sin tratar (C=Control).

60

Fig. 10. Inmunodetección de proteínas de señalización fosforiladas (Jak-1-Y, Stat-3-Y-705, y AKT-Ser-475) en lisados celulares H35 tomados a distintos tiempos (minutos) después de incubar las células con CT-1.

65 A.) Inmunoprecipitación de lisados celulares con anticuerpos específicos frente a Jak-1. Posteriormente mediante Western blot con anticuerpos específicos frente a tirosinas fosforiladas se observa fosforilación de la molécula Jak-1 a los 5 minutos.

## ES 2 316 616 T3

B.) Western blot con anticuerpos específicos frente Stat-3 fosforilada (Stat-3-Y-705) donde se observa positividad a los 5 minutos de tratamiento.

C.) Inmunoprecipitación de la fracción citosólica con anticuerpos anti-AKT donde posteriormente, mediante Western blot con anticuerpos específicos para la forma AKT fosforilada en serina 475 (AKT-Ser-475) se observa inducción a los 15 y 30 minutos.

Fig. 11. Estructura del vector pET-14b.

Fig. 12A. Western blot de proteínas de señalización en hígado de ratas tratadas con AdCT-1, AdLac-Z o salino (S), sometidas posteriormente a resección hepática, superior al 85%, y sacrificadas 1 hora después de la resección.

1a) Western blot con anticuerpos específico frente a Stat-3 fosforilada (Stat-3-Y-705)

1b) Western blot con anticuerpos específicos frente a Stat-3 para cuantificar Stat-3 total

Fosforilación de Stat-3 en ratas tratadas con AdCT-1.

2a) Western blot con anticuerpos específicos frente a Erk1 y Erk2 fosforiladas (Erk1-Thr-202 y Erk2-Tyr-204)

2b) Western blot con anticuerpos específicos frente a Erk1 y Erk2 para cuantificar Erk1 y Erk2 total.

Fosforilación ERK1/2 en ratas tratadas con AdCT-1.

5) Western blot con anticuerpos específicos frente a Akt fosforilada (Akt-Ser-473)

6) Western blot con anticuerpos específicos frente a Akt para cuantificar Akt total.

Fosforilación de Akt en ratas tratadas con AdCT-1.

Fig. 12B. Actividad Caspasa-3 en hígado de ratas sometidas a resección hepática ampliada (>85%). Las muestras proceden de los mismos grupos de ratas hepatectomizadas utilizados en los experimentos descritos en la fig. 12A. La gráfica representa el número de veces que aumenta la actividad de caspasa-3 con respecto a hígados sanos.

Fig. 13. Western blot de proteínas de señalización en hígado de ratones tratados con AdCT-1, AdLac-Z o salino (S) respectivamente, antes de administrar Con-A para inducir daño hepático. Las muestras se tomaron en el momento del sacrificio, 1 hora después de la inducción con Con-A.

1a) Western blot con anticuerpos específicos frente a Akt fosforilada (Akt-Ser-473)

1b) Western blot con anticuerpos específicos frente a Akt para cuantificar Akt total

Fosforilación de Akt en ratas tratadas con AdCT-1.

2a) Western blot con anticuerpos específicos frente a Erk1 y Erk2 fosforiladas (Erk1-Thr-202 y Erk2-Tyr-204)

2b) Western blot con anticuerpos específicos frente a Erk1 y Erk2 para cuantificar Erk1 y Erk2 total.

Se observa fosforilación de ERK1/2 en ratas tratadas con AdCT-1.

### Referencias citadas en la descripción

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

### Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9529237 A [0005]
- WO 0043790 A [0005]
- WO 9730146 A [0005]
- WO 9739629 A [0005]

### Literatura no patente citada en la descripción

• GADIEN RA; PATTERSON PH. Leukemia inhibitory factor, interleukin 6 and other cytokines using the GP-130 transducing receptor: Roles in inflammation and injury. *Stem Cells*, 1999, vol. 17, 127-137 [0009].

## ES 2 316 616 T3

- **KISHIMOTO T; TAGA T; AKIRA S.** Cytokine signal transduction. *Cell*, 28 January 1994, vol. 76 (2), 253-262 [0009].
- 5 • **MURAKAMI M; HIBI M; NAKAGAWA; NAKAGAWA T; YASUKAWA K; YAMANISHI K; TAGA T; KISHIMOTO T.** IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*, 18 June 1993, vol. 260 (5115), 1808-1810 [0009].
- 10 • **DAVIS S; ADRICH TH; STAHL N; PAN L; TAGA T; KISHIMOTO T; YANCOPOULOS GD.** LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science*, 18 June 1993, vol. 260 (5115), 1805-1808 [0009].
- 15 • **PENNICA D; KING KL; SHAW KJ; LUIS E; RULLAMAS J; LUOH SM; DARBONNE WC; KNUTZON DS; YEN R; CHIEN KR.** Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 14 February 1995, vol. 92 (4), 1142-1146 [0009].
- 20 • **ROBLEDO O; FOURCIN M; CHEVALIER S; GUILLET C; AUGUSTE P; POUPLARD-BARTHELAIX A; PENNICA D; GASCAN H.** Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third component. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272 (8), 4855-4863 [0009].
- **SHENG Z; PENNICA D; WOOD WI; CHIEN KR.** Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival. *Development*, 1996, vol. 122, 419-426 [0009].
- **JIN H; YANG R; KO A; PENNICA D; WOOD WI; PAONI NF.** Effects of cardiomyotrophin-1 on haemodynamics and cardiac function in conscious rats. *Cytokine*, 1998, vol. 10, 19-25 [0009].
- 25 • **LATCHMAN DS.** Cardiotrophin-1 (CT-1): a novel hypertrophic and cardioprotective agent. *Int. J. Exp. Pathol.*, 1999, vol. 80, 189-196 [0009].
- **JOUGSAKI M; TACHIBANA I; LUCHNER A; LESKINEN H; REDFIELD MM; BURNETT JC.** Augmented cardiac cardiotrophin-1 in experimental congestive heart failure. *Circulation*, 2000, vol. 101, 14-17 [0009].
- 30 • **HISHINUMA S; FUNAMOTO M; FUJIO Y; KUNISADA K; YAMAUCHI-TAKIHARA K.** Hypoxic stress induces cardiotrophin-1 expression in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1999, vol. 264, 436-440 [0009].
- 35 • **STEPHANOU A; BRAR B; HEADS R; KNIGHT RD; MARBER MS; PENNICA D; LATCHMAN DS.** Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them stressful stimuli. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1998, vol. 30, 849-855 [0009].
- 40 • **PENNICA D.** Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron*, 1996, vol. 17, 63-74 [0009].
- **BORDET T; SCHMALBRUCH H; PETTMANN B; HAGEGE A; CASTELANU-PTAKHINE; KAHN A; HAASE G.** Adenoviral cardiotrophin-1 gene transfer protects pmn mice from progressive motor neuronopathy. *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 104, 1077-1085 [0009].
- 45 • **BUSTOS M; SANGRO B; ALZUGUREN P; GIL A; RUIZ J; BERAZA N; QIAN C; GARCIA-PARDO A; PRIETO J.** Liver damage using suicide genes. A model for oval cell activation. *Am. J. Pathol.*, 2000, vol. 157 (2), 549-559 [0009].
- 50 • **OLVIER ROBLEDO; CATHERINE GUILLET; SYLVIE CHEVALIER; MARYVONNE FOURCIN; JOSY FROGER; ANNICK POUPLARD-BARTHELAIX; DIANE PENNICA; HUGUES GASCAN.** Hepatocyte-derived cell lines express a functional receptor for cardiotrophin-1. *Eur. Cytokine Netw.*, September 1997, vol. 8 (3), 245-252 [0009].
- 55 • **C.D. RICHARDS; C. LANGDON; D. PENNICA; J. GAULDIE.** Murine cardiotrophin-1 stimulates the acute-phase response in rat hepatocytes and H35 hepatoma cells. *Journal of interferon an cytokine research*, 1996, vol. 16, 69-75 [0009].
- 60 • **MALTE PETERS; ELKE ROEB; DIANE PENNICA; KARL-HERMANN MEYER ZUM BÜSCHENFELDE; STEFAN ROSE-JOHN.** A new hepatocyte stimulating factor: cardiotrophin-1 (CT-1). *FEES Letters*, 1995, vol. 372, 177-180 [0009].
- 65

## ES 2 316 616 T3

### REIVINDICACIONES

5 1. Uso de cardiotrofina-1 (CT-1) o de una secuencia polinucleotídica que codifica y expresa para CT-1, en la fabricación de una composición útil para inducir la proliferación celular hepática en hígado dañado o reseccionado y restituir la masa funcional del órgano.

10 2. Uso de cardiotrofina-1 (CT-1), o de una secuencia polinucleotídica que codifica y expresa para CT-1, para la fabricación de una composición para proteger las células hepáticas frente a estímulos nocivos y en última instancia para la prevención de la necrosis y apoptosis de las células hepáticas.

3. Uso según la reivindicación 1, para la fabricación de una composición para inducir la proliferación celular hepática tras hepatectomía quirúrgica y restaurar la masa funcional del hígado.

15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 para la fabricación de una composición para el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas de cualquier etiología.

20 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 para la fabricación de una composición para el tratamiento de la hepatitis aguda, subaguda, fulminante o crónica de causa viral, metabólica o tóxica.

25 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 para la fabricación de una composición para el tratamiento de la cirrosis hepática.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 para la fabricación de una composición para el tratamiento de la función hepática del hígado trasplantado.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 para la fabricación de una composición para el tratamiento de tumores intrahepáticos.

30 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la fabricación de una composición que comprende un vector viral portador de una secuencia polinucleotídica que codifica y expresa para CT-1.

35 10. Uso según la reivindicación 9 **caracterizado** porque el vector viral es un adenovirus.

40

45

50

55

60

65

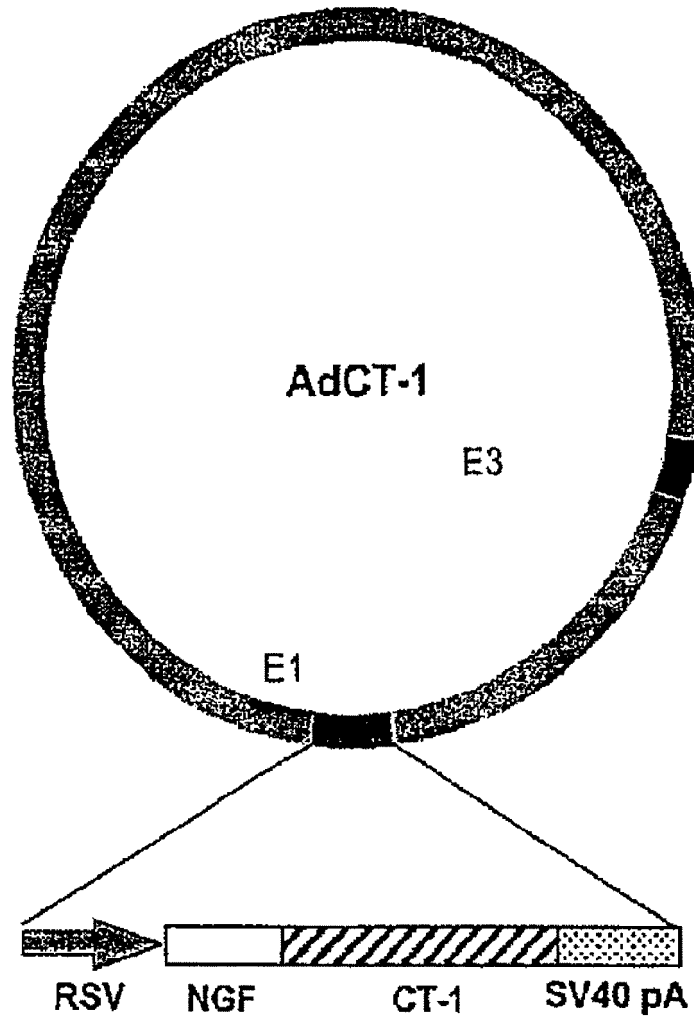


Fig. 1

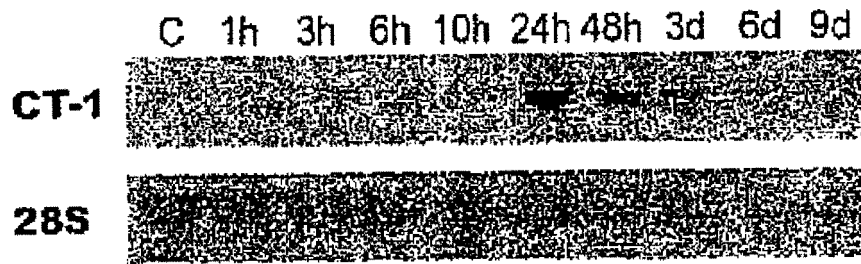


Fig. 2

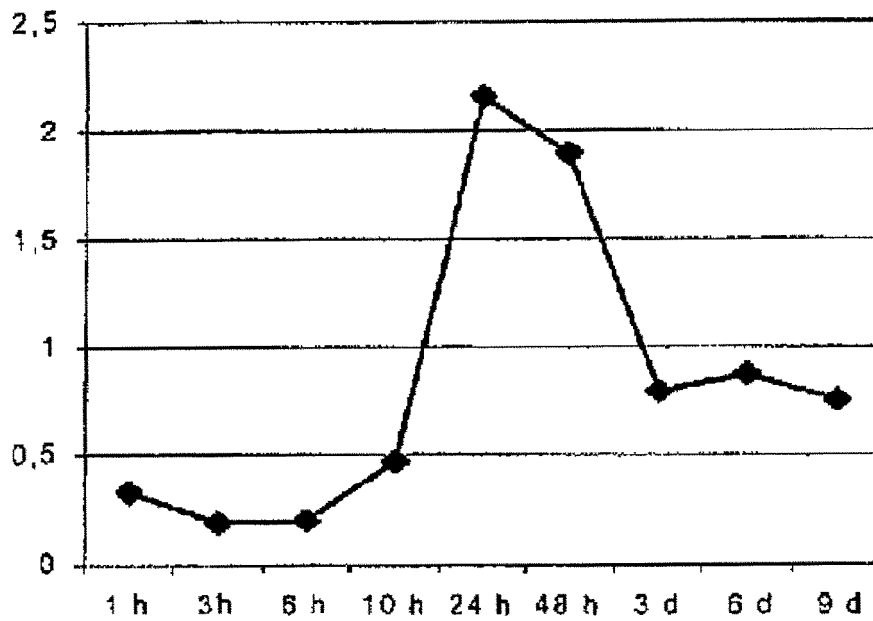


Fig. 3

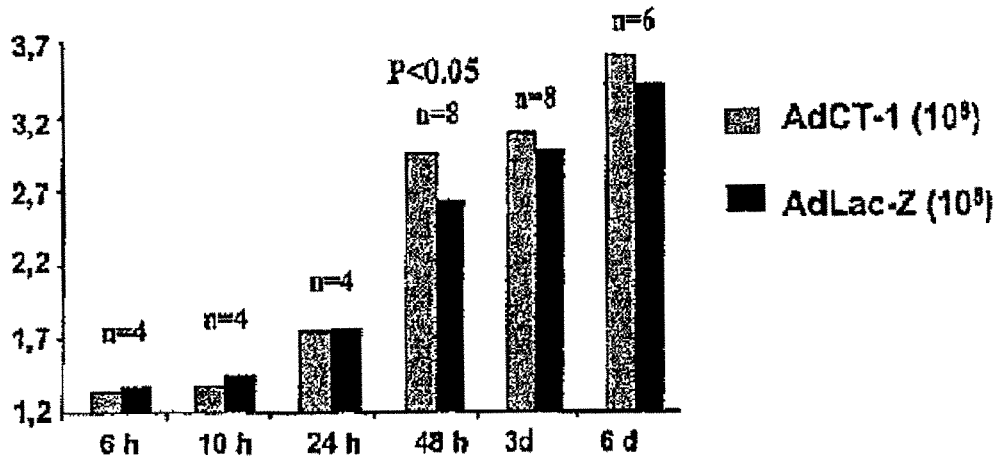


Fig. 4

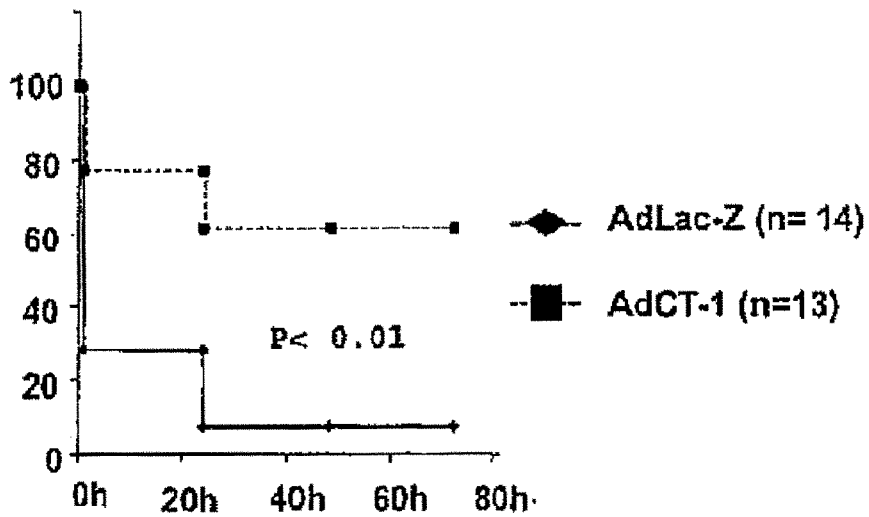


Fig. 5

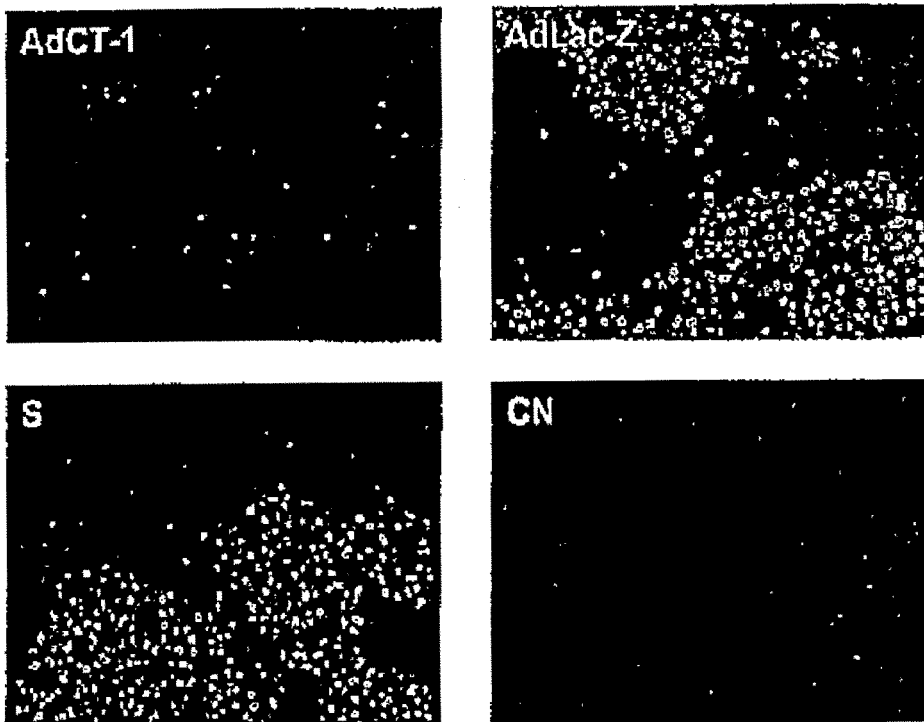
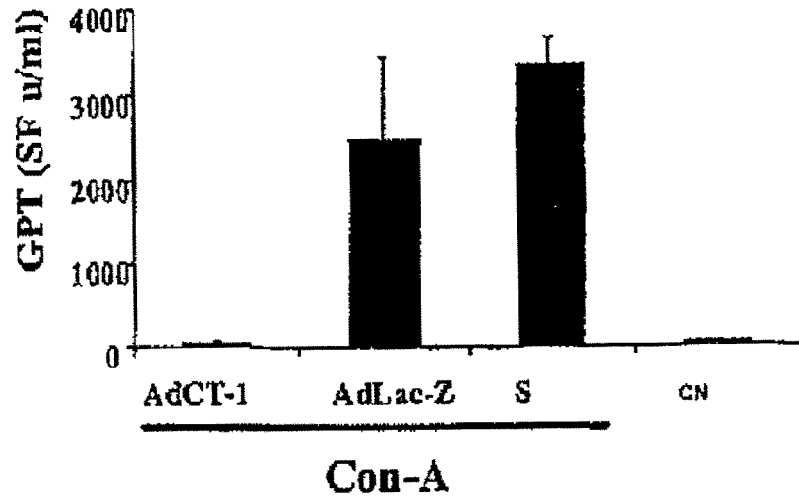


Fig. 6A

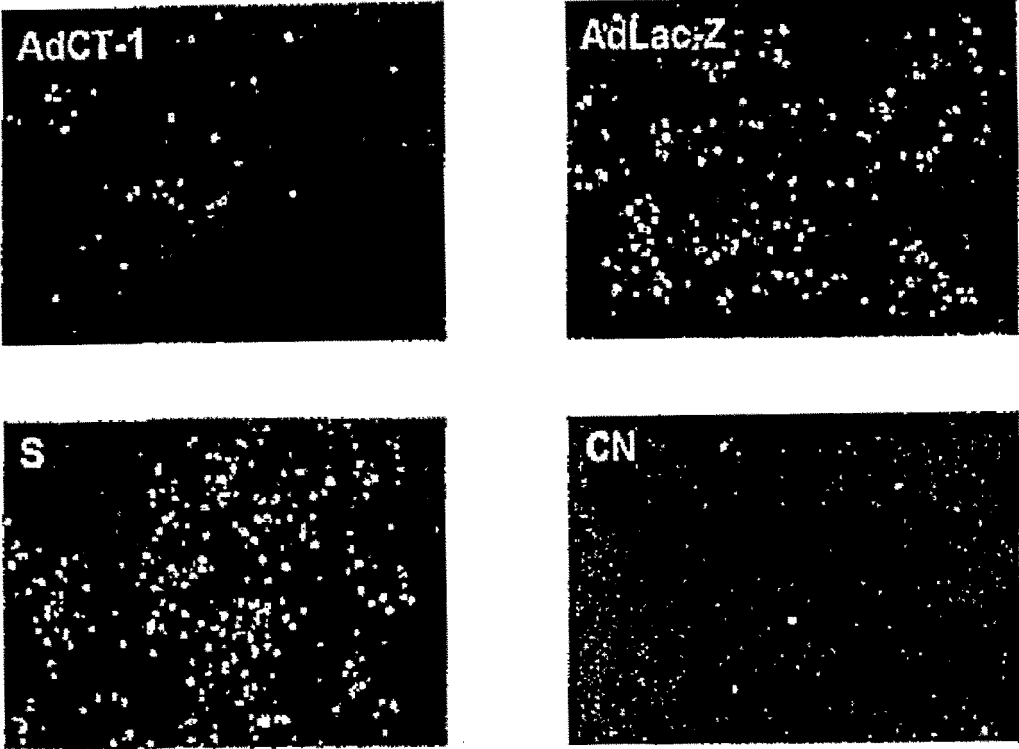
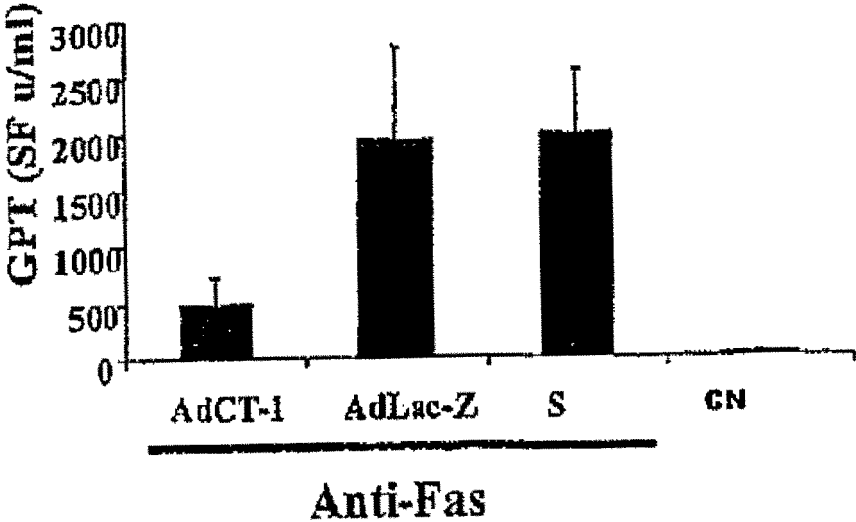


Fig. 6B

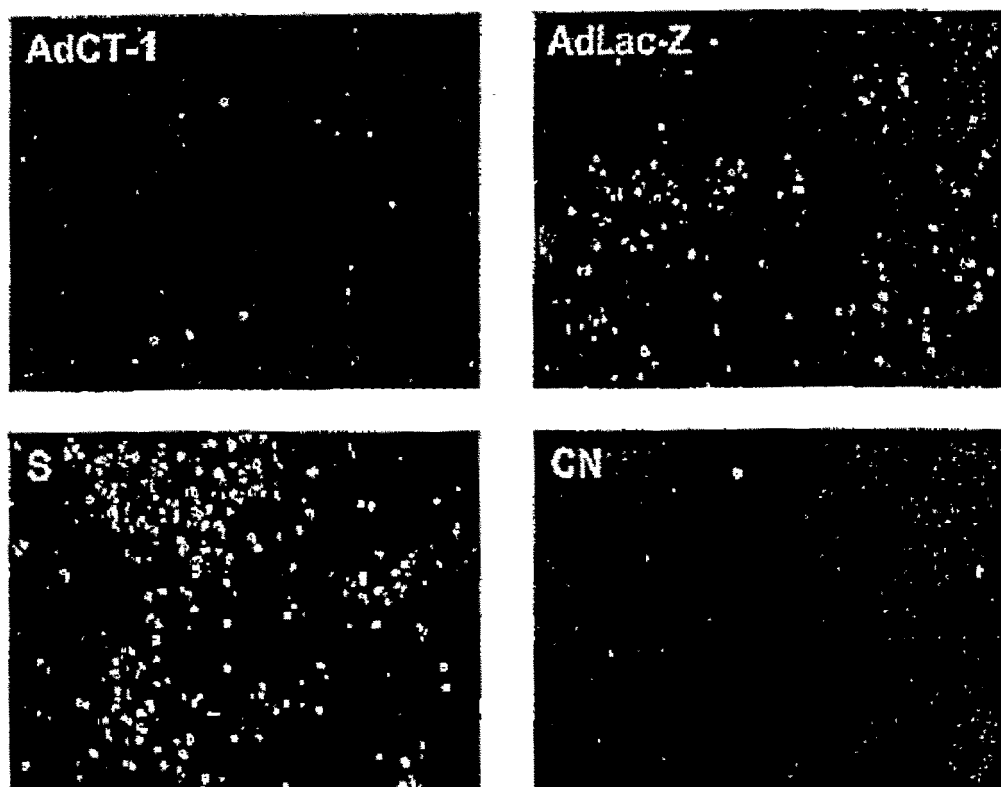
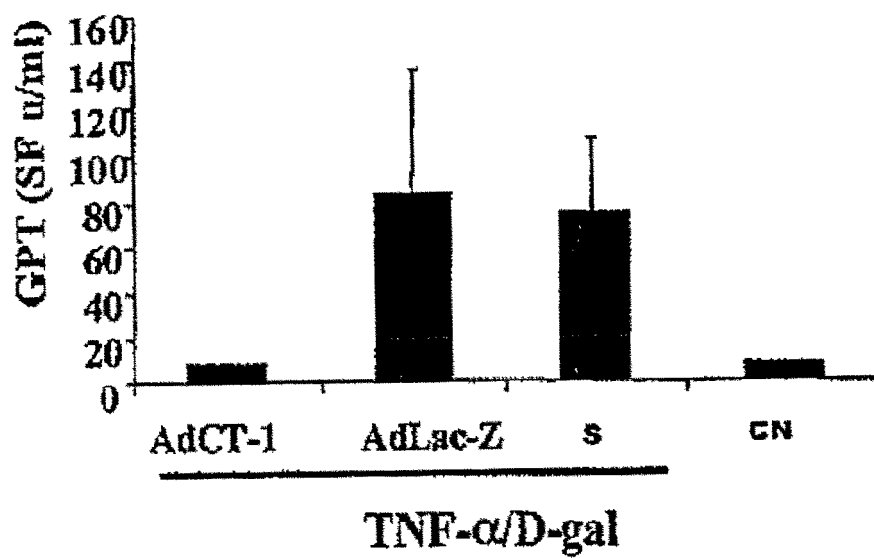


Fig. 6C

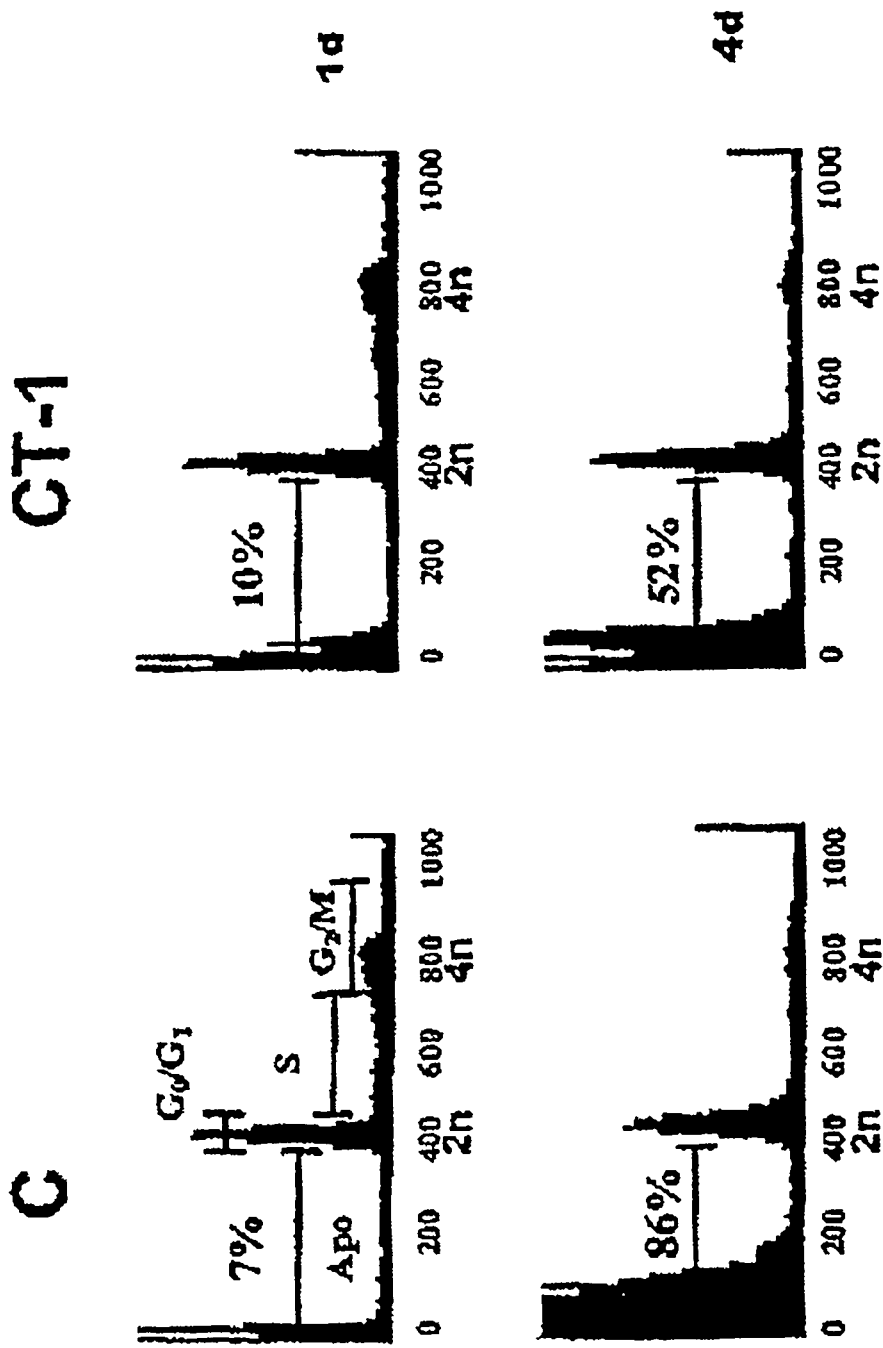


Fig. 7

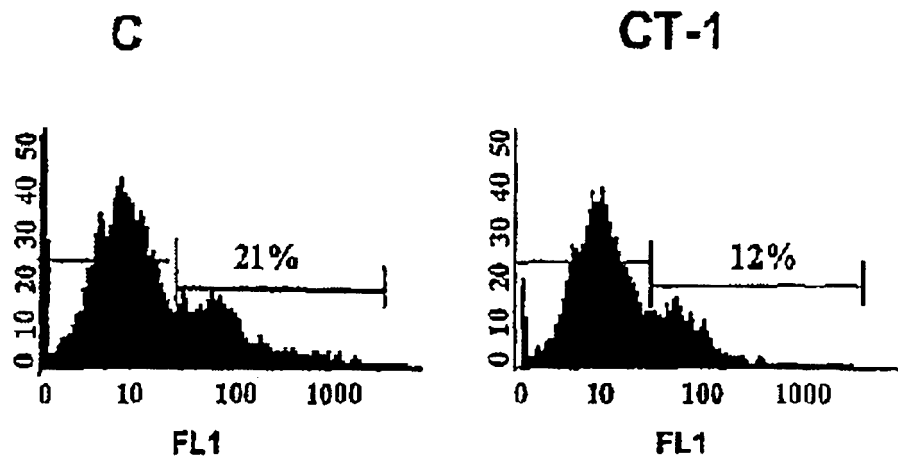


Fig. 8

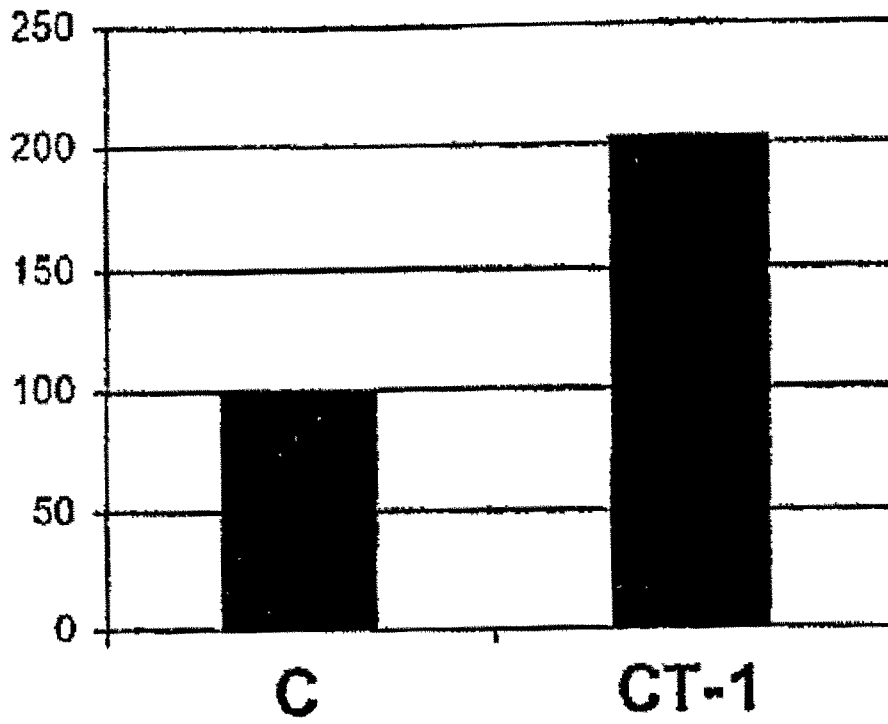


Fig. 9

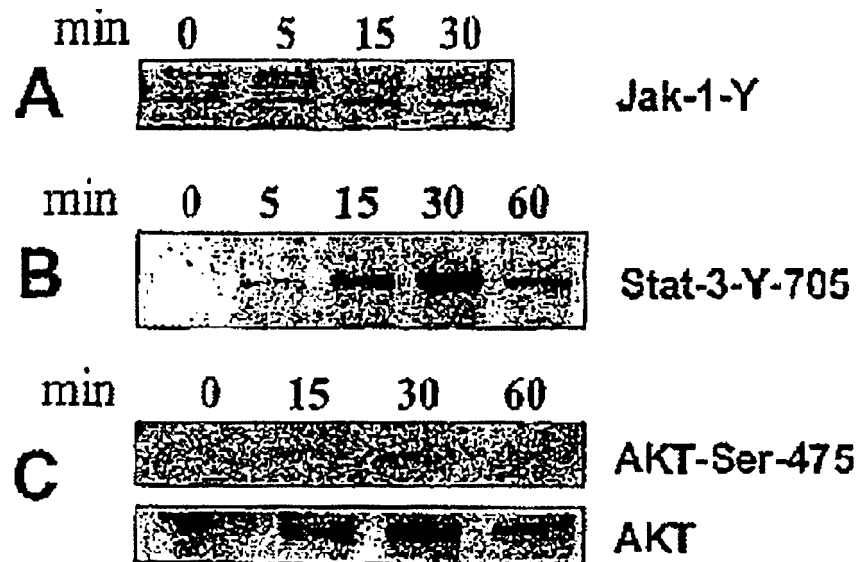


Fig. 10

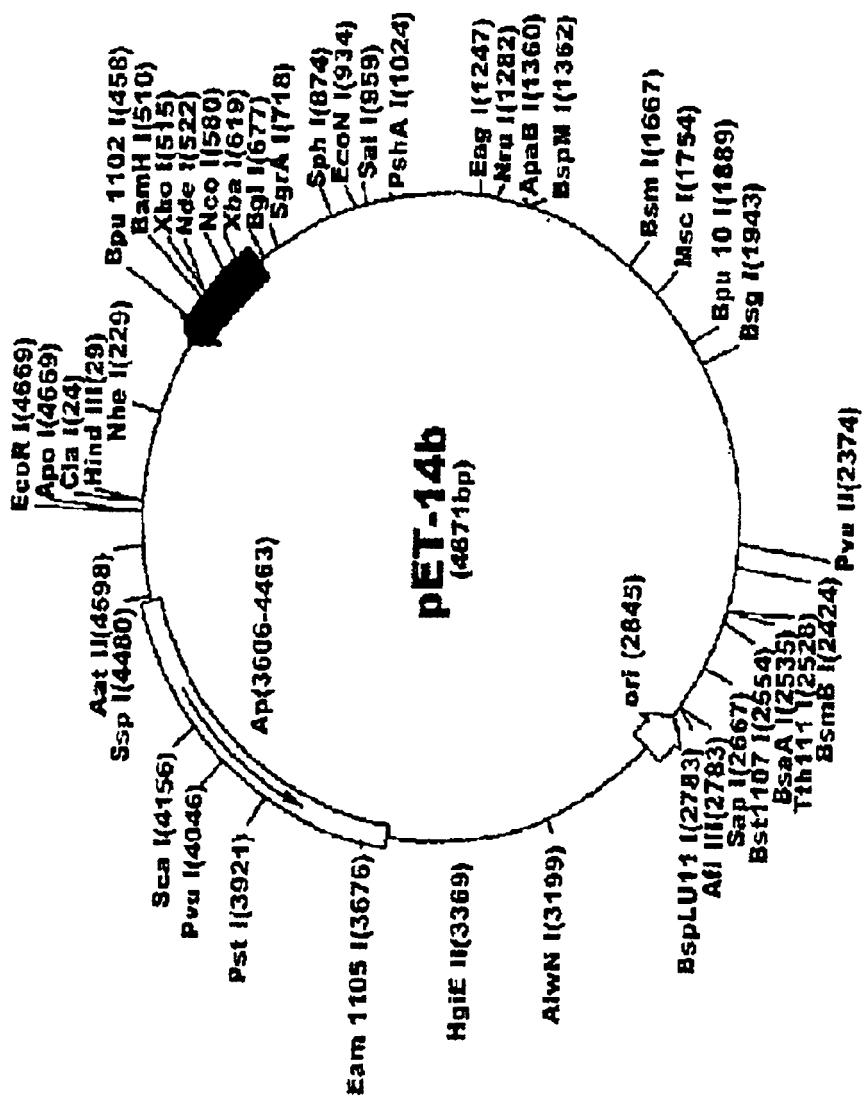


Fig. 11

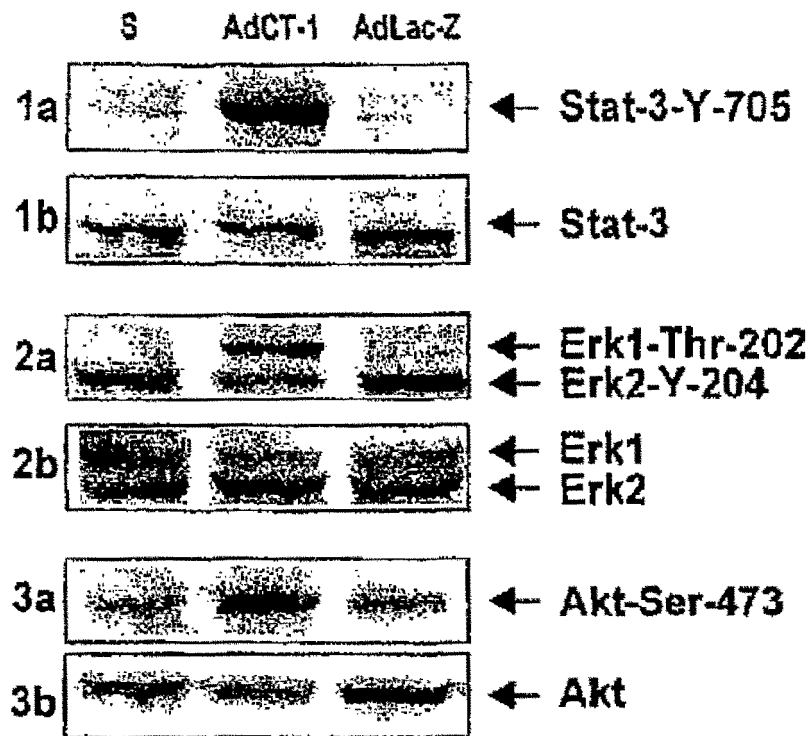


Fig. 12A

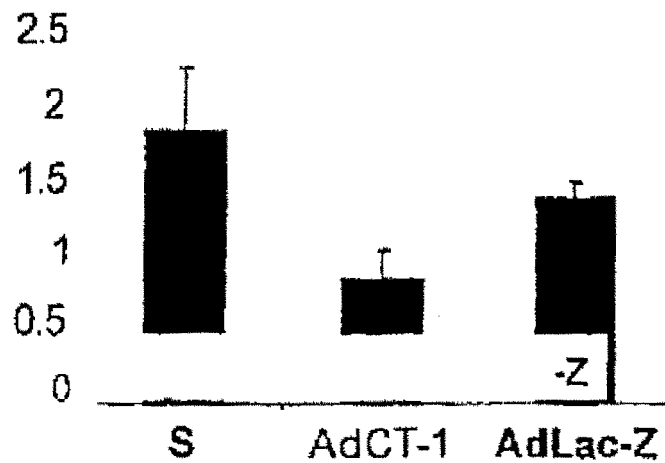


Fig. 12B

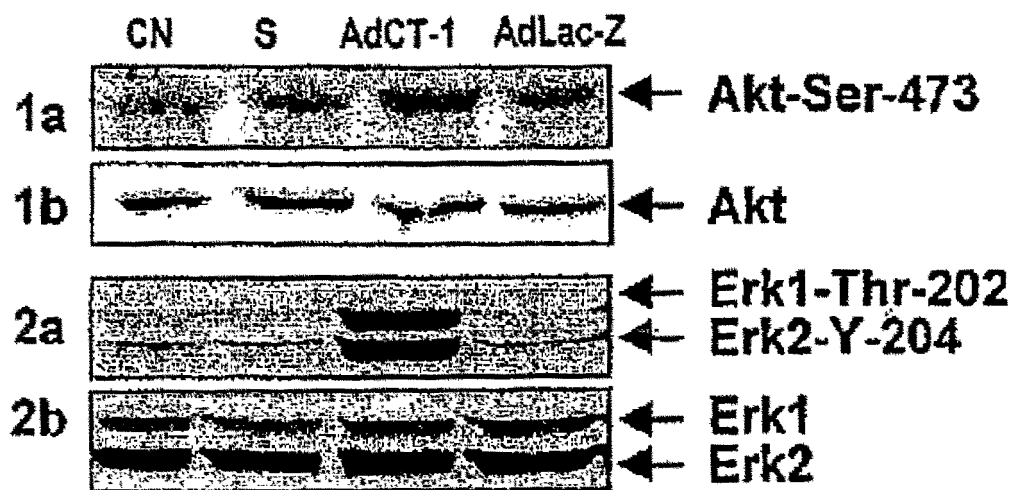


Fig. 13