



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 226 597**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 9/72 (2006.01)

A61K 38/49 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00980071 .5**

(96) Fecha de presentación : **30.11.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1411128**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

(54) Título: **Vectores virales recombinantes que contienen el gen del activador de plasminógeno de urocinasa humano y su utilización en el tratamiento de la fibrosis hepática.**

(30) Prioridad: **28.11.2000 MX PA00011713**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

(73) Titular/es: **TGT Laboratories, S.A. de C.V.**
Prolongación División del Norte, nº 4280
Col. Prado Coapa
México, D.F. 14300, MX

(72) Inventor/es: **Armendariz Borunda, Juan y**
Aguilar Cordova, Estuardo

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Vectores virales recombinantes que contienen el gen del activador de plasminógeno de urocinasa humano y su utilización en el tratamiento de la fibrosis hepática.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a la creación de vectores sintéticos, plasmídicos, no virales y virales recombinantes que presentan el gen humano del activador de plasminógeno derivado de urocinasa clonado, en adelante en la presente memoria ADNc (ADN complementario) de huPA. También se refiere a la utilización del gen del receptor truncado de tipo II de TGF-beta. Los vectores virales utilizados pueden ser, de manera no limitativa, vectores adenovirales de primera, segunda, tercera y/o cuarta generación, vectores adenovirales "gutless", vectores retrovirales, vectores adenoasociados. Los vectores no virales pueden estar constituidos por componentes fosfolipídicos, liposomas de diversas estructuras y combinados por medio de diferentes ligandos para receptores específicos. Los vectores sintéticos pueden consistir en la construcción y el acoplamiento de ADNc de huPA y receptor truncado de tipo II de TGF-beta con plásmidos de diferente origen y promotores regulables. El ADNc de huPA codifica para proteínas terapéuticas útiles en el tratamiento de la cirrosis hepática y la fibrosis generalizada, tal como la fibrosis renal, la fibrosis pulmonar, la fibrosis pancreática, la fibrosis cardíaca, cicatrices hipertróficas y queloides (cicatrices de la piel) y/o en otros órganos diana propensos a padecerla. También se refiere a un mecanismo de reconocimiento específico de tejido de las células afectadas *in vivo* por medio del suministro del gen de huPA terapéutico a órganos afectados crónicamente por la fibrosis.

Además, la invención proporciona un modo eficaz para el tratamiento de la fibrosis por medio de la utilización de vectores recombinantes que se reivindican en la presente memoria, así como el procedimiento implicado en la preparación de estos vectores, la composición farmacéutica que los contiene, los métodos de tratamiento y sus utilidades terapéuticas en el tratamiento de la fibrosis, que presentan gran potencial comercial en la industria farmacéutica y también presentan una alternativa importante como terapia génica experimental para el tratamiento de enfermedades degenerativas crónicas caracterizadas por la fibrosis, con aplicación terapéutica importante en el campo de la medicina moderna.

Introducción

Epidemiología y fisiopatología de la cirrosis hepática

La cirrosis hepática representa un problema de salud mundial porque es una causa de mortalidad importante. Es una enfermedad terminal provocada normalmente por la ingestión crónica de alcohol y la infección por hepatitis C y no existe un tratamiento disponible definitivo cuando afecta a adultos. Aproximadamente 14 millones de personas están afectadas por el alcoholismo en los EE.UU. y la cifra es similar en México (Mariani, S., Birmingham, K. y Novak, K. Knocking out Alcohol Damage. *Nature Med.* 1999;5(11):1243). La cirrosis hepática se considera un problema de salud grave en México, puesto que es la cuarta causa de muerte en personas en edad laboral y no existe un tratamiento eficaz al 100%. Además, la cirrosis hepática también es una causa de muerte en niños debido a las consecuencias de la obstrucción biliar. Sin embargo, en este caso, la incidencia es mucho menor y el enfoque quirúrgico por medio de anastomosis de Kasai mitiga la enfermedad durante algunos meses. Sin embargo, el 50% de los niños que se someten a dicha intervención quirúrgica mueren durante los siguientes meses y el resto de ellos que responden parcialmente a los efectos de la anastomosis se dirigen a un posible trasplante de hígado. Actualmente, existen protocolos de terapia génica para otras enfermedades degenerativas crónicas, pero hasta ahora no se ha informado de ningún protocolo en el que se utilice una terapia génica para curar la cirrosis. Por tanto, en la presente invención, se ha desarrollado este protocolo de terapia génica a nivel preclínico. Su utilización adicional con seres humanos dependerá del transporte seguro y satisfactorio de genes que codifican para proteínas terapéuticas en hígados con fibrosis extensa, utilizando como estrategia de transporte principal vectores sintéticos, plasmídicos, no virales y virales. Para este fin, se realizó previamente un estudio preclínico para determinar la seguridad, la eficacia de transducción, la toxicidad y la biodistribución de un vector adenoviral que porta como gen indicador el gen lacZ en ratas Wistar con cirrosis (solicitud de patente mexicana número 998515, en tramitación). Una vez que se ha mostrado la posible utilización de vectores adenovirales para transportar genes exógenos hacia los hígados dañados sin empeorar de manera notable su función, se evaluó el efecto de los "genes terapéuticos" sobre los hígados con cirrosis.

La cirrosis hepática está caracterizada porque presenta un aumento de la fibrosis cuando existe una acumulación de proteínas de matriz extracelular (especialmente colágeno de tipo I, IV y III) sintetizadas por las células estrelladas hepáticas (Arthur, M. J. P. Collagenases and liver fibrosis, *J. Hepatology* 1995;22:43-48; Kim, T. H. Mars, W. M., Stolz, D. B., Petersen, B. E., y Michalopoulos, G.K. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 1997;26:896-904; y Olaso, E. y Friedman, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J. Hepatology* 1998;29:836-847) por todo el parénquima del hígado, principalmente alrededor de las venas central y porta, formando una barrera que bloquea el intercambio libre de nutrientes entre el sinusoides y los hepatocitos lo que conduce al deterioro de la función (figura 1A) (Arthur, M. J. P. Collagenases and liver fibrosis, *J. Hepatology* 1995;22:43-48; y Kim, T. H. Mars, W. M., Stolz, D. B., Petersen, B. E., y Michalopoulos, G. K. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 1997;26:896-904). Por tanto, los inventores de la presente invención sugieren como teoría que podrían utilizarse vectores no virales y virales recombinantes en terapia génica para revertir la fibrosis exacerbada, la característica fundamental de los hígados con cirrosis, y, a su vez,

con la inducción de genes que promueven la proliferación de células hepáticas, potenciar el restablecimiento rápido de la masa hepática funcional. Para este fin, en dichos vectores, el ADN modificado del activador de plasminógeno de tipo urocinasa humano (huPA), que activa una cascada (parte inferior de la figura 1B), en la que, por un lado activa las metaloproteasas de matriz (MMP) o collagenasas hepáticas latentes para promover la degradación *in situ* de matriz extracelular en exceso (ECM) en el espacio perisinusoidal o espacio de Disse. La matriz extracelular en exceso depositada bloquea los intercambios de nutrientes entre los hepatocitos y la sangre circulante y por tanto se ve afectada la función del hígado. De manera concomitante, huPA restablece la masa hepática funcional induciendo la replicación de los hepatocitos restantes y por tanto repoblando el parénquima del hígado (figura 1B). El motivo para utilizar dichos vectores recombinantes se debe a la ventaja adicional de que, ya que no secretan una cantidad significativa de huPA, no provocan la hipocoagulación o la hemorragia espontánea que es la principal desventaja en los animales con cirrosis. De este modo, induciendo dos cascadas diferentes de acontecimientos beneficiosos, la terapia de ADNc de huPA modificado puede ser muy útil para el tratamiento de la cirrosis hepática. Es importante observar que hasta la fecha no se ha descrito ningún agente terapéutico que revierta y/o prevenga con una eficacia del 100% la acumulación progresiva del colágeno hepático.

Tales alteraciones fisiopatológicas que se producen en la cirrosis hepática son constantes y comunes para los otros órganos que también experimentan fibrosis, tales como, pulmón, corazón, riñón, páncreas y la piel, entre otros, que no deben considerarse como limitación del alcance de protección de esta invención. Por tanto, la metodología presentada en la presente memoria para el tratamiento de la cirrosis hepática podría aplicarse también a los órganos que son propensos a, o están afectados por fibrosis.

Vectores no virales y virales en la terapia génica hepática

Los vectores virales utilizados en esta invención para implementar esta tecnología pueden ser, sin limitación, vectores adenovirales de primera, segunda, tercera y/o cuarta generación, vectores adenovirales "gutless", vectores retrovirales y vectores adenoasociados. Los vectores no virales pueden estar constituidos por plásmidos, fosfolípidos, liposomas (catiónicos y aniónicos) de diferentes estructuras y combinados con diferentes ligandos para receptores específicos. Los vectores sintéticos consisten en la construcción y el acoplamiento de ADNc de huPA y ADNc de receptor truncado de tipo II de TGF-beta con plásmidos de diferente origen y con promotores regulables y/o inducibles. En muchos protocolos, los vectores retrovirales se han utilizado para introducir genes en hepatocitos (Douglas J.T., y Curiel D.T., Adenoviruses as Vectors for Gene Therapy. Science and Medicine marzo/abril de 1997 44-53). Sin embargo, han de tomarse precauciones puesto que estos vectores pueden generar posibles virus competentes para la replicación. Entre las ventajas de estos vectores se encuentra su capacidad para integrar su genoma de un modo estable en los cromosomas de la célula huésped, que confiere la posibilidad de expresión, de un modo indefinido, del transgén terapéutico clonado en el retrovirus. Por otro lado, hasta la fecha, ningún estudio ha informado de incidencias de mutagénesis mediante la inserción o activación de oncogenes por medio de la integración con retrovirus si los virus utilizados no son competentes para la replicación. No obstante, la utilización de vectores retrovirales para transducir genes hacia el hígado está limitada por las siguientes consideraciones: 1) estos vectores infectan sólo a células que se dividen activamente y 2) se obtienen títulos de partículas virales muy bajos en las líneas de células de empaquetamiento utilizadas para amplificar estos virus (Graham F.L., y Van Dyer Eb AJ. A New Technique for the Assay of Infectivity of Humun Adenovirus 5 DNA. Virology 1973, 52:456-467). Estas dos limitaciones se han superado satisfactoriamente en otros protocolos de terapia génica por medio de la inducción de la proliferación de hepatocitos *in vivo*, por medio de la utilización de factores de crecimiento hepático y por medio de hepatectomía parcial, procedimiento quirúrgico por medio del cual la eliminación del 70% de la masa hepática induce la división de las células hepáticas restantes *in vivo*. La utilización de vectores lentivirales ha permitido superar parcialmente dichas limitaciones, ya que pueden transducir células que no están dividiéndose realmente.

Antecedentes de la invención

La cirrosis hepática es una enfermedad crónica del hígado, en la que la necrosis celular difusa y una regeneración limitada de las células hepáticas del parénquima dan como resultado un aumento del porcentaje difuso del tejido conjuntivo, lo que provoca la distorsión de la arquitectura hepática lobulillar e induce alteraciones hemodinámicas. Por tanto, algunas estrategias para el tratamiento de la cirrosis hepática podrían incluir la prevención y/o reversión de la fibrogénesis, estimulación de la mitosis hepática y transposición de la arquitectura del tejido hepático. Los documentos del estado de la técnica relacionados con la presente invención se proporcionan a continuación en la presente memoria únicamente como referencia.

La patente US nº 5.240.846 se refiere a la utilización de terapia génica denominada "CFTR", que induce una corrección estable de la regulación del canal de cloro. Este defecto está presente en las células epiteliales. En dicha invención, se utilizan vectores adenovirales recombinantes así como vectores plasmídicos. Sin embargo, no presenta ninguna asociación con los genes terapéuticos de la presente invención. Asimismo, la patente US nº 5.910.487 describe la utilización de vectores plasmídicos para transportar moléculas terapéuticas, pero no existe ninguna asociación con el suministro de genes de huPA modificado y/o natural o de los genes del receptor truncado de tipo II de TGF-beta (factor de crecimiento transformante-beta) tal como se presentan en la presente memoria. La patente US nº 5.827.703 se refiere a la utilización de vector adenoviral y vector adenoviral modificado para transportar genes, sin embargo, ninguno de estos vectores contienen los genes utilizados en la presente invención para el tratamiento de la fibrosis.

La patente US nº 5.770.442 reivindica la utilización de un adenovirus recombinante que contiene un gen que dirige la expresión de una proteína denominada “fiber” o una proteína denominada “fiber-chimera”, sin embargo dicha patente no menciona específicamente, cuál es el gen terapéutico. Además, se presenta un procedimiento de terapia génica que implica la utilización de tal adenovirus y un vector de transferencia para la generación de tal adenovirus recombinante. Sin embargo, no se menciona nada con respecto a la utilización de genes terapéuticos clonados e insertados en vectores adenovirales recombinantes utilizados en esta invención en hígados con fibrosis, o a los otros órganos diana tales como riñón, pulmón y cicatrices hipertróficas y otros. Estos genes terapéuticos son el gen que codifica para el activador huPA modificado y/o natural y el receptor truncado de tipo II de TGF-beta (factor de crecimiento transformante-beta), reivindicado en la presente invención. También se incluyen otros miembros de la familia de genes representada.

La patente US nº 5.166.320 se refiere a la utilización de un sistema de suministro dirigido para introducir genes exógenos en células hepáticas de mamífero. Pero no existe asociación con los supuestos genes transportados directamente hacia hígados, riñones, pulmones con fibrosis u otros órganos con fibrosis.

La patente US nº 5.872.154 describe un procedimiento para reducir la respuesta inmunitaria inducida por un vector recombinante adenoviral por medio de la administración conjunta de vector adenoviral recombinante y un modulador inmunitario seleccionado, que funciona inhibiendo la formación de anticuerpos neutralizantes y/o reduciendo la muerte de las células infectadas viralmente. La patente US nº 5.871.982 se refiere a un vector híbrido, en el que una parte de un adenovirus se incluye, junto con una parte de un vector viral adenoasociado que contiene un transgén seleccionado. También se describe un virus híbrido que consiste en la unión de un conjugado con un policonjugado a una malla génica del vector viral adenoasociado para formar una partícula simple. Esto es contrario a la presente invención en la que no se utilizan virus híbridos, sólo vectores adenovirales. Además, en la patente mencionada anteriormente no se exponen el gen, transgén o gen terapéutico utilizados. La patente US nº 5.856.152 se refiere a la creación de un vector híbrido que contiene la parte de un vector adenoviral en combinación con un virus adenoasociado y un gen seleccionado, por medio del cual se producen grandes cantidades de vectores recombinantes, pero no portan genes terapéuticos clonados tal como se describe en esta invención, en la que se utilizan genes terapéuticos específicos para el tratamiento de la fibrosis de hígado, de riñón, de páncreas, de corazón así como queloides y cicatrices hipertróficas. La patente US nº 5.547.932 reivindica un compuesto de complejos de ácido nucleico para transfectar células eucariotas. Estos complejos están formados por ácidos nucleicos y otra sustancia con afinidad por ácidos nucleicos y opcionalmente un factor de internalización, tal como un virus o un componente del virus que puede conjugarse. También utiliza componentes de vectores adenovirales específicos o virus específicos tales como Ad2 o Ad5, pero no menciona los genes que se internalizan en el citoplasma celular y finalmente en el núcleo de estas células eucariotas. De manera similar, la patente US nº 5.521.291 se refiere a adenovirus conjugados unidos por medio de un anticuerpo a una sustancia con afinidad por ácidos nucleicos. De este modo, se transportan genes recombinantes hacia el interior de células eucariotas. Estos complejos conjugados y ácidos nucleicos se internalizan en la célula, pero no se mencionan específicamente los genes que pueden transportarse. En dicha patente, al contrario de lo que se describe en la presente invención, no se menciona la utilización de tal adenovirus para tratar la cirrosis o fibrosis hepática o cualquier otro tipo de fibrosis.

La patente US nº 5.585.362 se refiere a un vector adenoviral mejorado y a procedimientos para obtener y utilizar tales vectores. Aunque la utilización de vectores adenovirales no se menciona en dicha patente, los vectores adenovirales descritos en la presente invención se utilizaron como vectores para transportar genes terapéuticos.

La patente US nº 5.756.086 reivindica un adenovirus, que se representa por una proteína denominada “fiber”. El adenovirus también incluye un ligando, que es específico para un receptor situado sobre un tipo de célula específica. Este adenovirus puede presentar por lo menos una parte de esta proteína denominada “fiber” y puede eliminarse y sustituirse con un ligando, que es específico para un receptor sobre células específicas, tales como los hepatocitos. Estos adenovirus pueden incluir un gen que codifica para un agente terapéutico. Basándose en la declaración anterior, la diferencia técnica destacada de la presente invención, en comparación con el estado de la técnica, es la especificidad del agente terapéutico como huPA modificado y/o natural y el receptor truncado de tipo II de TGF-beta para el tratamiento de diversas fibrosis.

La patente US nº 5.895.759 reivindica un vector específico de tejido (hígado) para terapia génica que puede utilizarse para transportar genes a un hígado dañado. Estos vectores se acoplan químicamente o mediante enzimas a un promotor y también pueden acoplarse a un anticuerpo empaquetado en una envuelta polipeptídica. Además, el vector o el virus que va a someterse a ensayo es el virus de la hepatitis B. Por tanto, el transporte de genes hacia los hígados dañados descritos en esta patente utiliza un sistema completamente diferente del de esta invención, y no existe relación con el proceso de fibrosis o cirrosis que va a tratarse. La patente US nº 5.559.099 describe un vector recombinante adenoviral que contiene una proteína química del adenovirus denominada pentona, que incluye una secuencia distinta a pentona y un gen terapéutico para desarrollar un procedimiento de terapia génica que implica la utilización de tales adenovirus, vectores adenovirales de transferencia para la recombinación de tales vectores adenovirales que contienen un gen terapéutico. Además, la patente US nº 5.885.808 reivindica también la utilización de adenovirus con moléculas de unión de adenovirus para diferentes células, moléculas de los cuales se han modificado, como en las patentes U.S. nº 5.846.782 y 5.712.136, en las que se utilizan vectores adenovirales, que se han modificado para que contengan diferentes dominios peptídicos.

Finalmente, la patente US nº 5.670.488 se refiere a vectores para terapia génica, que son especialmente útiles para la fibrosis quística y también menciona el desarrollo de procedimientos para la utilización de estos vectores. La

posible relación de la presente invención con el estado de la técnica mencionado se refiere a la utilización de vectores adenovirales, que pueden modificarse, así como a la utilización de promotores inducibles que conducen la expresión de genes que van a insertarse en estos vectores adenovirales. Sin embargo, las características técnicas de la presente invención se centran en la utilización específica de genes terapéuticos para tratar diferentes tipos de fibrosis tales como fibrosis de hígado, de riñón, de pulmón, de páncreas, de corazón, queloides, así como cicatrices hipertróficas.

La importancia de la presente invención, a diferencia del estado de la técnica descrito en los documentos mencionados anteriormente, se basa en las características técnicas de la propia invención, así como en las ventajas adicionales derivadas de la misma, que se describen con mayor detalle a continuación.

Vectores adenovirales

En la presente invención se ha decidido utilizar vectores adenovirales, aunque es importante enfatizar que los vectores virales utilizados para implementar esta tecnología pueden ser, no de manera restrictiva, vectores adenovirales de primera, segunda, tercera y/o cuarta generación, vectores adenovirales “gutless”, vectores retrovirales, vectores adenoasociados. Los vectores no virales pueden estar constituidos por plásmidos, componentes fosfolipídicos, liposomas (catiónicos y aniónicos) de diferentes estructuras y combinados con diferentes ligandos para receptores específicos. Los vectores sintéticos se preparan por medio de la construcción y el acoplamiento de ADNc de huPA y el receptor truncado de tipo II de TGF-beta con plásmidos de diferente origen y con promotores regulables y/o inducibles.

Los vectores adenovirales se seleccionaron inicialmente basándose en varias consideraciones: 1) estos vectores pueden generarse para títulos muy altos de partículas infecciosas por ml.: (10^9 - 10^{10}); 2) infectan a una gran variedad de células, sin embargo, cuando se administran por vía i.v., la mayor parte de ellos se sitúan en el órgano hepático; 3) transfieren genes de manera eficaz a células que no están dividiéndose, y 4) se integran pocas veces en el genoma huésped, lo que evita el riesgo de transformación celular mediante mutagénesis insercional (Douglas J.T., y Curiel D.T. Adenoviruses as vectors for Gene Therapy. Science and Medicine, marzo/abril de 1997, 44-53 y Zern AM, y Kresina TF. Hepatic Drug delivery and Gene Therapy (Hepatology 1997, vol. 25, nº 2, 484-491).

Los adenovirus son probablemente los vectores o vehículos más prometedores para el suministro de genes en los protocolos de terapia génica en seres humanos, puesto que poseen un atributo único que les proporciona gran estabilidad cuando se administran al torrente sanguíneo. Esta característica específica permite que se utilicen de manera eficaz en ensayos clínicos con una administración por vía i.v. confortable para el paciente. (Douglas J.T., y Curiel D.T. Adenoviruses as vectors for Gene Therapy. Science and Medicine, marzo/abril de 1997, 44-53).

Los adenovirus son virus de ADN bicatenario. Presentan una estructura icosaédrica, infectan a una gran variedad de tipos de célula de mamífero y soportan la expresión ubicua de un receptor específico en la superficie celular aún no identificado. Su unión a células se produce por medio del componente proteico de la cápside del adenovirus y el virus entra en la célula mediante endocitosis mediada por receptor.

Se han identificado más de 40 serotipos humanos diferentes de adenovirus, de los cuales se han estudiado de manera más extensa el tipo 2 (Ad2) y 5 (Ad5) y, por tanto, se han utilizado más ampliamente como vectores para terapia génica. Una característica muy importante de estos dos serotipos Ad es que nunca se han asociado con procesos malignos humanos.

La estrategia para la creación de adenovirus recombinante se basa en la organización del genoma adenoviral. La expresión de los genes adenovirales se produce en dos fases, temprana y tardía, que se definen por el tiempo de replicación del genoma adenoviral. Los genes tempranos codifican por sí mismos en 4 unidades transcripcionales distintas. E1, E2 y E4 codifican para proteínas reguladoras esenciales que inducen la replicación del ADN adenoviral. El gen E3 es un gen no esencial. Los productos de los genes tardíos incluyen las principales proteínas de la cápside, que se transcriben a partir de un promotor único. (Graham F.L., y Van Der Eb A.J. A New Technique for the Assay of infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. Virology 1973, 52:456-467).

Los adenovirus recombinantes se generan mediante la introducción del gen exógeno o secuencia de ADN de interés en sustitución de las regiones del genoma adenoviral requeridas para la replicación del virus. Los vectores adenovirales recombinantes presentan delecciones en las regiones del genoma E1 y E3. La generación del adenovirus recombinante se lleva a cabo tanto por medio de la sustitución de las regiones E1 o E3 como por medio de la inserción del gen exógeno entre la región E4 y la parte derecha de extremo del genoma adenoviral. Los vectores basados en la inserción del gen exógeno en la parte derecha de extremo del genoma adenoviral o mediante la sustitución de la región E3 mantienen su capacidad de replicación. Por el contrario, la sustitución de la región temprana E1 produce un vector que es defectuoso con respecto a su capacidad de replicación, que puede extenderse sólo en una línea celular que suministra en “trans” las funciones ausentes de la región adenoviral sustituida, o en presencia de un virus colaborador. Entre ellos, los más utilizados comúnmente como vectores de transferencia de genes son los adenovirus deficientes para la replicación (Douglas J.T., y Curiel D.T. Adenoviruses as Vectors for Gene Therapy. Science and Medicine, marzo/abril de 1997, 44-53).

La creación de vectores adenovirales, así como su aplicación para el tratamiento de la fibrosis, se muestran en los ejemplos descritos a continuación en la presente memoria.

Objetivos de la invención

A continuación en la presente memoria, se presentan los objetivos y las ventajas derivados de la presente invención.

- 5 Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento para preparar vectores adenovirales recombinantes AdΔhuPA, por medio de la clonación de ADNc modificado de huPA en vectores adenovirales apropiados; además, la clonación de huPA en vectores adenoasociados, “gutless” y la formación de complejos de liposoma y componentes de fosfolípido.
- 10 Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar vectores adenovirales recombinantes (todos los mencionados anteriormente en la presente invención), con un gen exógeno o una secuencia de ADN de interés que codifica para proteínas terapéuticas útiles en el tratamiento de la fibrosis generalizada en órganos diana propensos a padecer la misma. Tal gen es un gen de huPA modificado y/o natural.
- 15 Además, en la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas (u otras composiciones) que contienen los vectores plasmídicos, no virales, virales recombinantes en cantidades terapéuticamente eficaces de partículas virales para el tratamiento de la fibrosis generalizada; así como procedimientos de tratamiento terapéutico, sus utilizaciones y aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de la fibrosis.
- 20 Una ventaja de mayor importancia en el tratamiento de la fibrosis generalizada, particularmente de la cirrosis hepática, es que el suministro de gen(es) terapéutico(s) se lleva a cabo por medio del reconocimiento específico de tejido mediante la vía de administración utilizada y mediante el tropismo natural al hígado con cirrosis de los vectores recombinantes utilizados.
- 25 Otra ventaja de las utilizaciones terapéuticas de la invención, que se refiere inicialmente al tratamiento de la cirrosis hepática, es el tratamiento de la fibrosis generalizada en otros órganos diana propensos a padecer la misma, incluyendo, de manera no limitativa, el tratamiento de la fibrosis de hígado, de pulmón, de corazón, de la piel, del riñón, del páncreas, entre otros, en animales mamíferos, incluyendo seres humanos.
- 30 Otro objetivo es el diseño de una tecnología para suministrar genes de manera eficaz en primer lugar a hígados de animales con cirrosis afectados por cirrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄) y la obstrucción biliar común. Este tipo de modelos de cirrosis experimental es muy similar a los dos tipos de cirrosis hepática que normalmente afectan a seres humanos en México y en el resto del mundo (cirrosis alcohólica, infección crónica producida por el virus de la hepatitis C y cirrosis biliar secundaria).
- 35 Otra ventaja resultante del tratamiento de la fibrosis es que el adenovirus recombinante utilizado (y ninguno de los vectores adenovirales propuestos) no induce toxicidad letal en los animales a los que se les inyectan los vectores.
- Otro objetivo de la invención permite concluir que la fibrosis hepática desaparece totalmente y que la proliferación de las células hepáticas se estimula drásticamente, obteniendo de ese modo el reestablecimiento de la función hepática en animales con cirrosis.
- 40 Otra ventaja del diseño de esta tecnología es el hecho de que es posible detectar la expresión del gen terapéutico de uPA humano suministrado a animales con cirrosis por medio de la expresión de la correspondiente proteína humana por medio de ensayos ELISA y por medio de inmunohistoquímica. Por tanto, puede distinguirse entre la proteína de rata endógena y la producción de proteína inducida terapéuticamente. Por tanto, esto permite comprobar la transducción *in vivo* de los diferentes órganos de la rata para observar si la administración del vector era adecuada y si la expresión permanece sólo en el órgano diana.
- 50 Finalmente, todas estas evidencias permiten sugerir que el sistema comprende un vehículo eficaz y adecuado para suministrar genes terapéuticos tales como huPA modificado y/o natural que degradan el colágeno en exceso y/o previenen su deposición; y que producen proteína que estimula la regeneración del hígado, a hígados de rata con cirrosis con el fin de reestablecer las funciones normales del hígado u otros órganos afectados por la misma patología.
- 55 Por tanto, en la presente invención se proporciona un procedimiento de preparación para vectores adenovirales recombinantes y otros vectores mencionados anteriormente no virales y virales, compuestos farmacéuticos, procedimientos de tratamiento terapéutico, utilizaciones y aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de la fibrosis, especialmente para el tratamiento de la cirrosis hepática.

Breve descripción de los dibujos

Otras particularidades y ventajas de esta invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente de los objetivos y formas de realización preferidos, a partir de las reivindicaciones adjuntas y a partir de los dibujos o las figuras adjuntas, en los que:

- 65 la figura 1 muestra la fisiopatología celular de la cirrosis hepática (A); y la prueba de concepto con respecto a cómo funciona la terapia génica para revertir el proceso de fibrosis, así como la cascada de acontecimientos inducida por el ADNc de huPA que conduce a la reversión de la fibrosis y a la regeneración de las células hepáticas (B);

la figura 2 muestra el esquema del mapa de vector adenoviral que contiene el gen indicador LacZ (A) utilizado para determinar la relación dosis-respuesta, seguridad, toxicidad y biodistribución de un gen exógeno en varios órganos de rata de laboratorio normales y con cirrosis (B-I);

la figura 3 es una representación esquemática que muestra la modificación genética de ADNc de uPA humano y la formación de vectores adenovirales correspondientes Ad- Δ NAC-huPA (terapéuticos), la administración por medio de la vena ilíaca (A-D). También se muestra la determinación de niveles de expresión de proteína terapéutica de huPA humano en ratas con cirrosis por medio de los correspondientes ensayos ELISA e inmunohistoquímica (EG);

la figura 4 muestra cortes histológicos de hígado de ratas tratadas con CCl₄ durante 6 semanas obtenidos en diferentes días tras la inyección de Ad-GFP (A), vector irrelevante, y Ad- Δ NAC-huPA (B), vector terapéutico, la determinación cuantitativa por medio de análisis morfométrico del grado de fibrosis, en cada caso, y también se muestra la inducción concomitante de la actividad metaloproteasa 2 (MMP-2) (C y C'). La expresión del producto proteico del gen verde fluorescente también se muestra como control adecuado de la transducción *in vivo*,

la figura 5 muestra el análisis semicuantitativo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR) del ARN mensajero para los tipos de colágeno I, III, y IV de los hígados de ratas con cirrosis tratadas con el vector adenoviral Ad- Δ NAC-huPA, Ad-GFP o sólo con solución salina, en los que se muestran los productos de PCR amplificados correspondientes a dichos genes (A), y su determinación densitométrica correspondiente en comparación con la expresión de un gen de expresión constitutiva (B);

la figura 6 muestra la tinción inmunohistoquímica de hígados de rata con cirrosis con anticuerpo anti- α -SMA (acción del músculo liso) tras el suministro del vector terapéutico Ad- Δ NAC-huPA (A), así como el cálculo cuantitativo por medio de un análisis morfométrico asistido por ordenador del porcentaje de células positivas para α -SMA (B);

la figura 7 muestra la tinción inmunohistoquímica de cortes de hígado de rata con cirrosis con anticuerpo anti-PCNA (antígeno celular de proliferación) para evaluar la proliferación de hepatocitos tras la administración del vector adenoviral Ad- Δ NAC-huPA, Ad-GFP o solución salina sólo (A); (B) y (C) muestran el porcentaje de células inmunoteñidas en la región peritoneal y lobulillar, respectivamente, por medio de un analizador de imágenes automatizado. (D) muestra la determinación por RT-PCR semicuantitativa del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), c-met y huPA tras la administración de diferentes vectores en los que se muestran los productos de PCR amplificados correspondientes a estos genes; y

la figura 8, (A) muestra los tiempos de protrombina de ratas sacrificadas en diferentes días tras la administración del vector Ad- Δ NAC-huPA o tratadas solamente con solución salina. Además (B) muestra la evaluación de la razón peso del hígado/peso corporal x 100 para detectar una posible hiperplasia y/o hipertrofia hepática en estos hígados.

Descripción detallada de la invención

Existen muchos informes que muestran que por medio de la administración sistémica de vectores adenovirales recombinantes (AdR) en animales de experimentación sanos, se observa un retorno específico y un tropismo que resulta muy preferido de estos vectores al hígado. Los inventores de la presente invención han demostrado que el hígado con cirrosis es también una diana favorita de vectores adenovirales, incluso si la arquitectura lobulillar del órgano resulta alterada debido a la fibrosis establecida en la totalidad del parénquima del hígado, principalmente alrededor de las venas central y porta.

Por tanto, en la presente invención se ha establecido la hipótesis según la cual, utilizando un ADNc modificado de activador del gen del plasminógeno derivado de urocinasa humano (huPA), podría ser posible promover, en hígados dañados, la degradación *in situ* de los componentes de colágeno en exceso de la matriz extracelular por medio de la activación de MMP latente, y restablecer el intercambio libre de macromoléculas entre el sinusoides y los hepatocitos, así como la funcionalidad de los hepatocitos afectados tras inducir su proliferación y de este modo, repoblar el parénquima del hígado y obtener la regeneración y curar el hígado dañado.

Con el desarrollo de la invención reivindicada en la presente memoria, se inicia una línea de investigación para realizar terapia génica como alternativa para el tratamiento de enfermedades degenerativas crónicas, específicamente cirrosis hepática en seres humanos, tras el establecimiento de un vehículo eficaz para transportar genes al hígado, produciendo dichos genes proteínas terapéuticas que ayudan a restablecer las funciones normales del hígado (véanse las figuras 1 y 4), en las que se muestra cómo suministrar de manera eficaz y de un modo adecuado el gen de huPA para obtener la degradación de los colágenos en exceso depositados a través de la sobreexpresión de proteína de huPA.

En el panel izquierdo de la figura 2B, se muestran cortes congelados que se tiñen con X-gal. En el panel izquierdo de la figura 2B se muestran tejidos de los mismos hígados sobre los que realizó una determinación de X-gal, pero dichos tejidos se empaparon en parafina antes de cortarse y se tiñeron con rojo sirio con el fin de visualizar el grado de fibrosis. El grado de transducción era de aproximadamente el 40% en ratas con cirrosis, en comparación con el 84% en ratas normales (figura 2C). Debido a que el ensayo de respuesta a la dosis establece una dosis de 3×10^{11} partículas virales totales (figura 2D, E, y F), en la figura 2H se muestra la biodistribución del vector adenoviral y en la gráfica puede observarse que el principal órgano diana es el hígado, tanto en ratas sanas así como en ratas que reciben una administración crónica de CCL₄. El bazo y el riñón presentaban un grado de transducción inferior al 1%. Se corroboró

la biodistribución del vector adenoviral mediante PCR, la utilización de cebadores amplifica una región de adenovirus y una región de gen indicador Lac-Z y las bandas obtenidas (figura 2-I) en los diferentes órganos corresponden a la distribución encontrada con la reacción con X-gal. Finalmente, utilizando la dosis de 3×10^{12} partículas virales, se encontró que aproximadamente el 50% de los animales murieron por coagulopatía intravascular difusa.

El huPA modificado producido está situado de manera intracelular

Tomando en consideración la función de uPA bien conocida como uno de los principales cebadores de la proteólisis de la matriz extracelular (ECM), y como activador del plásmido y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Kim, T. H., Mars, W. M., Stolz, D.B., Peterson, B.E., y Michalopoulos, G. K. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 1997;26:896-904; Mars, W.M. Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am. J. pathol.* 1993;143:949-958. (35); y Roselli, HT., Su, M., Washington, K., Kerins, D.M., Vaughan, D. E. y Russel W. E. Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 1998;275:G1472-G1479), se decidió utilizar uPA humano para inducir actividad enzimática específicamente en hígados con cirrosis y para someter a prueba su efecto en la reversión de la fibrosis. Sin embargo, para evitar el riesgo de sangrado como consecuencia de la secreción de huPA, se utilizó una forma de huPA no secretada con una modificación en los extremos amino terminal y carboxilo terminal para impedir hasta el mayor grado posible su secreción en la circulación sanguínea (figura 3A y 3B).

Para inducir cirrosis, las ratas recibieron CCl_4 , por vía intraperitoneal, 3 veces por semana durante de seis a ocho semanas (figura 3D). Tras una administración de seis semanas de CCl_4 , se analizaron diversas secciones de hígado de animales con cirrosis a los que se les inyectó pAd-GFP y solución salina utilizados como control, y se observaron nódulos de diversos tamaños similares a los de la cirrosis humana. Se observaron bandas de fibrosis gruesas y finas alrededor de los nódulos con colapso del parénquima obvio y el patrón de puente de colágeno típico que une los espacios porta y las venas centrales. Hepatocitos necróticos e hinchados se asociaban frecuentemente con las bandas de fibrosis (figura 4A). Por tanto, se utilizó el pAd.PGK- $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -huPA para tratar los animales y revertir la fibrosis grave así como estimular la regeneración de los hepatocitos. Basándose en la observación anterior (García-Bañuelos J, Siller López, F, Aguilar-Córdova, E y Amendáriz-Borunda J. Adenovirus-Mediated gene delivery to cirrhotic rat livers: potential tool for gene therapy. *Gene Ther. And Mol. Biol.* Accepted 2000), se estableció la dosis de 6×10^{11} partículas virales/kg de vector adenoviral pAd.PGK- $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -huPA, se administró a través de la vena ilíaca en una dosis al final de la sexta semana de intoxicación crónica con CCl_4 (Armendáriz-Borunda, J. Katai H., Jones, C.M., Seyer J.M., Kang J.M. y Ragliow R. Transforming growth factor β is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration following CCl_4 treatment. *Lab Invest.* 1993;69:283-294). Es importante observar que el daño por CCl_4 continuaba en las ratas sacrificadas dos días tras la administración de vector adenoviral (figura 3D). En otras palabras, las ratas sacrificadas en los días 8 y 10 recibieron tres inyecciones adicionales de agente hepatotóxico en comparación con el resto de los animales. Tras solamente una inyección de pAd.PGK- $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -huPA, se realizó un ensayo ELISA para determinar la presencia de proteína de huPA en homogeneizado de hígado y suero (figura 3G). Los resultados mostraban que se detectaba una gran cantidad de proteína de huPA modificado en el extracto de tejido, en comparación con la concentración detectada en los sueros, lo que puede explicarse por el hecho de que la proteína producida abandona los hepatocitos dañados. De manera importante, los niveles de huPA producidos en dichos experimentos eran muy altos (~ 5 ng/ml) [100 veces más alta en comparación con otros sistemas de inducción de proteínas en modelos experimentales similares (Schirmacher, P., Geerts, A., Jung, W., Pietrangelo, A., Rogler, C. E., Dienes, H. P. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *EXS* 1993;65:285-299). (43)]. Los niveles de huPA aumentaron antes del día 2, disminuyendo después pero mostrando niveles detectables, en comparación con la falta de expresión en los animales control animales a los que se les inyectó adenovirus irrelevante, pAd-GFP (figura 3G). Además, existen evidencias de que el huPA modificado estaba situado de manera intracelular cuando se realizaba la detección mediante inmunohistoquímica de huPA con anticuerpos específicos, mostrando y confirmando la inducción de dicha proteína en hígados con cirrosis (figura 3E y F). Los tejidos de hígado de rata normal y con cirrosis utilizados como controles muestran ocasionalmente hepatocitos teñidos con anticuerpo frente a huPA ($\sim 3,5\%$). Contrastando con este hallazgo, los animales tratados con pAd.PGK- $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -huPA mostraron antes del día 2 un aumento significativo de hepatocitos inmunoteñidos con huPA (46%) (figura 3E y F), alcanzando un pico tras el día 6 en el que más del 80% de las células eran positivas. Además, las células de Kupffer y las células de epitelio biliar mostraban también inmunorreactividad.

Incluso si la aplicación del vector inducía una aparición histológica de hepatocitos degenerados y había un importante aumento en transaminasa sérica en los primeros días tras el tratamiento con pAd- $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -huPA (tabla 1), dicho aumento era transitorio y ninguno de los animales murió a causa de insuficiencia hepática como consecuencia de una hepatitis adenoviral subyacente. En comparación con los animales control con cirrosis que recibieron solución salina ($n=5$) y una preparación de adenovirus irrelevante (pAd-GFP) ($n=5$), los animales a los que se les inyectó pAd.PGK- $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -huPA mostraban una mejora notable en las pruebas de función del hígado (tabla 1). De manera global, las ratas sacrificadas en los últimos días mostraron tiempos de protrombina (PT) de 14 segundos (muy similares a los valores normales) 8 y 10 días tras la administración del adenovirus en comparación con 24 segundos en los días 2, 4 y 6 (figura 8A). De manera importante, no se observó anemia, sino que pudo observarse una pequeña disminución transitoria de plaquetas (tabla 2) en los animales que recibieron pAd.PGK- $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -huPA. Con respecto a este punto, se ha notificado anteriormente que la inyección de vectores adenovirales en animales normales induce una disminución de plaquetas transitoria (Brann, T., Kayda, D., Lyons, R.M., Shirley, P., Ruy, S., Kaleko, M., y Smith, T. Adenoviral vector-mediated expression of physiologic levels of human factor VIII nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 1999;10:2999-3011).

ES 2 226 597 T3

TABLA 1

Resumen de promedios de grupos de los resultados de las pruebas de función del hígado

		<u>D Í A S</u>				
GRUPO		2	4	6	8	10
ALT (IU/l)	Normal	73,6±10,9				
	pAd-ΔNΔC -huPA	1563±948,8	443,75±308	345±60	68,51±24,7	684±50
	pAd-CFP	890±260,2	337,5±54,4	426±48	410±45	715±60
AST (IU/l)	Normal	162,3±30,9				
	pAd-ΔNΔC -huPA	1590±957,09	676,5±576,3	395±70	137±39,7	599±30
	pAd-GFP	737±156,98	627,5±389,6	2100±114	2250±55,6	2315±115,1
Fosfatasa alcalina (IU/l)	Normal	159,7±34,7				
	pAd-ΔNΔC -huPA	525,7±11,3	385,2±211,7	336±40	205±54,5	310±8,5
	pAd-CFP	382,5±40,3	715±181	577±63,4	454±46,5	485±45,3
Bilirrubina total (mg/dl)	Normal	0,55±0,07				
	pAd-ΔNΔC -huPA	0,97±0,6	0,825±0,43	0,6±0,2	0,94±0,3	0,7±0,3
	pAd-GFP	0,35±0,07	0,75±0,6	2,3±0,4	1,4±0,3	1,2±0,2

TABLA 2

Resumen de los promedios por grupos de resultados de hematología

		<u>D Í A S</u>		
GRUPO		2	4	6
Hemoglobina (g/dl)	Normal	13,5±0,64		
	pAd-ΔNΔC-huPA	13,5±1,77	15,5±0,8	16,5±0,14
	pAd-GFP	14,9±1,13	14±1,12	14,1±0,99
Hematocrito (%)	Normal	40,6±0,85		
	pAd-ΔNΔC-huPA	40,1±5,87	46,5±0,7	49,5±0,25
	pAd-GFP	40,3±0,07	41,9±2,3	42,6±2,83
Eritrocitos (10 ³ /mm ²)	Normal	6,95±0,226		
	pAd-ΔNΔC-huPA	7,1±1,2	6,99±0,56	7,5±0,7
	pAd-CFP	7,14±0,226	7,7±0,93	7,3±0,51
Leucocitos [10 ³ /mm ³]	Normal	2,47±1,79		
	pAd-ΔNΔC-huPA	5,6±2,08	4,96±2,9	8,9±2,2
	pAd-GFP	6,8±0,99	9,43±1,2	11,3±6,7
Linfocitos (%)	Normal	45,5±12,6		
	pAd-ΔNΔC-huPA	41,7±0,99	55,4±1,3	49,8±2,8
	pAd-GFP	44,9±1,01	61,7±4,5	50,7±27,08
Neutrófilos (%)	Normal	46,2±7,99		
	pAd-ΔNΔC-huPA	53,9±3,18	41,4±2,5	49,2±3,2
	pAd-GFP	49,8±2,5	37±3,5	47,1±27
Monocitos (% + -)	Normal	1,5±1,75		
	pAd-ΔNΔC-huPA	3,1±4,23	1,33±1,22	0,2±0,02
	pAd-GFP	3,9±5,24	0,24±2,3	0,3±0,35
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	Normal	1050±45,6		
	pAd-ΔNΔC-huPA	959,5±78,5	859±52,3	1020,5±38,9
	pAd-GFP	896±80,6	961±79	693±127

La sobreexpresión de huPA en el hígado induce reversión de la fibrosis

Además de su papel de activación del plasminógeno, el huPA se considera uno de los principales cebadores que conducen a la activación de la cascada de metaloproteasas asociada a la degradación de la matriz extracelular (Kim, T.H., Mars, W.M., Stole, D.B., Petersen, B. E., y Michalopoulos, G.K. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 1997: 26:896-904). Tras activar el plasminógeno en plasmina, el uPA activa también procollagenasas y posibilita otras metaloproteasas (MMP) convirtiéndolas en la forma activa en fases tempranas (Steler-Stevenson, W.G. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am. J. Pathol.* 1996:148: 1345-1350. (33)). Por tanto, se determinó en primer lugar el grado de fibrosis en hígados con cirrosis teñidos con Masson. El análisis morfométrico asistido por ordenador de múltiples campos mostró que las ratas tratadas con pAd.PGK- Δ NAC-huPA presentaban una reducción drástica en la fibrosis antes del día diez (85%) (figuras 4B y B'), en comparación con los niveles de fibrosis al comienzo del tratamiento así como en comparación con los animales con cirrosis que recibían pAd.GFP (figura 4A y A') y solamente solución salina. Dichos hallazgos concuerdan con los datos representados en las figuras 4C y C' en las que se determinó cuantitativamente la actividad metaloproteasa-2 (MMP-2) en homogeneizados de hígado por medio de un ensayo ELISA específico. Dicho ensayo detecta niveles de MMP-2 activa (Verheijen, JH, Nieuwenbroek, NM, Beekman B, Hanemaier, R, Verspaget HW, Ronday HK, Bakker AH. Modified proenzymes as artificial substrates for proteolytic enzymes: colorimetric assay of bacterial collagenase and matrix metalloproteinase activity using modified pro-urokinase. *Biochem J.* 1997:323 (Pt3): 603-609), que degrada específicamente el colágeno de tipo IV y, en un menor grado, otros colágenos (Corcoran, ML, Hewitt, RE, Kleiner, DE Jr., Stetler-Stevenson, WG. MMP-2: expression, activation and inhibition, *Enzyme protein* 1996:49 (1-3):7-19; Nogase, H., Ogata, Y, Suzuki, K, Enghild, JJ, Salvensen G. Substrate specific and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem. Soc. Trans.* 1991 (3)715-8). Se encontró un aumento de MMP-2 de seis veces (por encima de 11,5 ng/ml) cuatro días tras la administración de huPA en comparación con las ratas normales y se observó un aumento de tres veces en comparación con los animales con cirrosis control. Por otro lado, e independientemente de la inducción de colágenos de huPA específicos y la importancia fisiológica de la actividad de degradación de colágeno, se evaluó la expresión de genes de colágeno endógeno de tipo I, II y IV por medio de RT-PCR semicuantitativa, lo que permitió detectar cambios específicos en los niveles iniciales de dichos genes. La expresión del gen de colágeno de tipo IV presentaba una disminución de 5 veces antes del día seis y la expresión del gen de colágeno de tipo I presentaba una disminución de cuatro veces antes del día 10 en ratas que recibieron pAd.PGK- Δ NAC-huPA en comparación con las ratas que recibieron un adenovirus irrelevante, pAd-GFP. La expresión de colágeno de tipo III disminuyó 2 veces en el día 10 de inyección de vector adenoviral de huPA en comparación con pAd-GFP (figuras 5A y B). Dichos datos sugieren fuertemente que la sobreexpresión de huPA humano induce la desactivación de dichos genes que codifican para proteínas de ECM. En hígados con cirrosis con fibrosis grave, las células estrelladas hepáticas (HSC, principales células productoras de colágeno) se aumentan en zonas fibróticas, y la mayoría de ellas cambian su fenotipo a HSC activadas que expresan específicamente actina alfa del músculo liso (α -SMA) (Nyberg-Hoffman, C., Shabram, P., Li, W., Giroux, D. y Aguilar-Cordova, E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nature Med.* 1997:3(7) 808-11). Se examinó la expresión de α -SMA en hígados de rata a través de la inmunohistoquímica y se descubrió que se correlaciona con la distribución de ECM en exceso depositada a lo largo del parénquima del hígado, resultados que concuerdan con el % de tejido fibrótico. Existe una reducción significativa en el número de células positivas para α -SMA (8,9% en el día diez en comparación con el 43,2% en el día 2 tras el tratamiento) (figuras 6 A y B). Además, se amplía una zona de fibrosis representativa, en la que las HSC son claramente visibles (figura 6C).

45 *HuPA incluye una regeneración celular de hígado con cirrosis vigorosa*

Habiendo solucionado la primera mitad del procedimiento, se procedió a determinar el nivel de regeneración del hígado "necesario para rellenar los espacios vacíos" tras realizar la degradación de la matriz extracelular (ECM). La figura 7 representa la cinética de la mitosis en los hígados, probablemente estimulada por la activación de HGF *in situ* (Locaputo, S., Carrick, T.L y Bezerra, J.A. Zona Regulation of gene expression during liver regeneration of urokinase transgenic mice. *Hepatology* 1999:29:1106-1113). Se midió la proliferación de hepatocitos como el porcentaje de células teñidas con un anticuerpo específico frente a antígeno nuclear celular de proliferación (PCNA). El número de hepatocitos positivos para PCNA era drásticamente más alto (10 veces) en los hígados de ratas tratadas con pAd.PGK- Δ NAC-huPA en comparación con los hígados de ratas tratadas con pAd-GFP e hígados normales (figura 7A). El índice de marcado mostró que aproximadamente el 55% de los hepatocitos estaban teñidos positivamente con anticuerpos anti-PCNA tanto en zonas periporta (figura 7B) como en zonas centrilobulillares (figura 7C) (Hattori, N., Sisson, T.H., Xu, Y., y Simon R.H. Upregulation of fibrinolysis by adenovirus-mediated transfer of urokinase-type plasminogen activator genes to lung cells *in vitro* and *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* 1999:10:215-222) 2 días tras la inyección de pAd.PGK- Δ NAC-huPA junto con numerosas cifras mitóticas y hepatocitos binucleados (figura 7A). Se detectaron índices de marcado del 40% incluso 8 días tras la administración del vector adenoviral (figuras 7B y C). Las células positivas detectadas antes del día 10 indican un restablecimiento de la masa funcional del hígado, lo que se confirmó a través de la clara tendencia a la normalización (tabla 1 y figura 8A) representada por medio de pruebas de función de los hígados (AST, ALT, bilirrubina y tiempos de protrombina).

65 El HGF es uno de los mitógenos de hepatocitos más potentes (Michalopoulos, G.K. HGF in liver regeneration and tumor promotion. *Prog Clin. Biol. Res.* 1995:391:179-185) y c-met su receptor de tirosina cinasa correspondiente que transduce su señal. La figura 7D muestra una sobreexpresión del gen de HGF en animales tratados con huPA y solamente una expresión menor en animales control con cirrosis y animales tratados con pAd-GFP. Dicha sobreexpresión

de este gen es lo más notable en c-met 2 días tras la administración de huPA, lo que sugiere que la proliferación de células hepáticas se controla a través de este mecanismo.

Finalmente, se midió el peso del hígado en relación con el peso de los animales en el momento en el que se sacrificaron los animales para determinar un posible crecimiento incontrolado (figura 8B). Tal como puede observarse, hubo solamente un aumento muy pequeño en el peso del órgano antes del día 10, lo que sugiere que no está implicado ningún mecanismo de regulación del crecimiento celular “anómalo”.

El modo preferido para aplicar la presente invención es por medio de administración endovenosa de los vectores adenovirales recombinantes (o cualquier vector mencionado anteriormente que contiene los genes terapéuticos) de la presente invención, en la que se administra la cantidad terapéuticamente eficaz con un régimen de dosis unitaria conveniente para un individuo fibrótico. Este régimen puede ajustarse según el grado de afectación. Generalmente se emplean dosis unitarias de aproximadamente 10^7 a 10^{14} partículas virales por individuo.

La preparación de un compuesto farmacéutico que incluye los vectores recombinantes adenovirales de esta invención puede prepararse a través de la utilización de técnicas convencionales muy bien conocidas por los expertos en la materia, en combinación con cualquiera de los vehículos farmacéuticamente aceptables descritos en el estado de la técnica, incluyendo sin restricción, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gel, malta, arroz, harina de trigo, caliza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, polvo de monoestearato de glicerilo, NaCl, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Estos compuestos pueden tomar la forma farmacéutica de disoluciones, suspensiones, píldoras, comprimidos, cápsulas, polvos y fórmulas de liberación lenta, y similares.

La descripción anterior y los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo de las formas de realización de la invención y no limitativo del alcance de esta patente.

Ejemplos

Metodología para demostrar la actividad de huPA sobre la reversión de la fibrosis y la estimulación de la regeneración del hígado

a) Animales de experimentación imitando cirrosis hepática humana

El modelo consistía en animales sometidos a intoxicación crónica con CCl_4 (Armendariz-Borunda, J. Seyes, J. M., Kang, A. H. y Ranghow, R. Regulation of TGF gene expresión in rat liver intoxicated with carbon tetrachloride. FASEBJ. 1990;4:215-221) en los que se estableció cirrosis hepática desde la sexta semana de administración intraperitoneal de CCl_4 (figura 3D) y que se asemeja a la cirrosis hepática humana inducida por el abuso de alcohol o infección por el virus de la hepatitis C crónica. Los animales que pesaban 80 g recibieron 3 dosis semanales por vía intraperitoneal de mezcla de CCl_4 -aceite mineral 1:6 durante la primera semana, 1:5 durante la segunda semana, 1:4 durante la tercera semana y 1:3 durante las semanas cuatro a ocho. Se emparejaron las ratas para utilizarse como control inyectándoles de manera similar solamente el vehículo. Todo el procedimiento experimental se ha descrito anteriormente (García-Bunuelos J., Siller-López, F, Aguilar-Córdova, E. y Armendariz-Borunda J. Adenovirus-mediated gene delivery to cirrhotic rat livers: potential tool for gene therapy. Gene Ther. and Mol. Biol. Accepted 2000), y todas las aplicaciones de adenovirus se realizaron a través de la vena ilíaca (figura 3C).

b) Vectores de expresión que contienen genes indicadores

El vector adenoviral Ad5- β Gal (figura 2A) procede de pAE1sp1B, al que se le insertó el gen de β -galactosidasa (lac-Z) bacteriana. Se obtuvo la visualización de la actividad β -Gal con reactivo X-gal que, en presencia de la enzima β -galactosidasa cambia de incolora a azul. Al mismo tiempo, se administró el mismo lote de Ad5- β Gal a ratas sanas ($n=5$) y ratas con cirrosis ($n=5$), tras 5 y 8 semanas de intoxicación con CCl_4 . Se sacrificaron los animales 72 horas tras Ad5- β Gal. Para el análisis histológico y la determinación de la expresión de la proteína β -galactosidasa (β -gal) codificada por el adenovirus recombinante, se extrajeron diferentes órganos: hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones, cerebro, testículos e íleo. Se congelaron dichos órganos a -30°C y se cortaron con un criostato para obtener cortes de $8\ \mu\text{m}$. Se expusieron los cortes a reactivo X-gal durante 16-18 horas, con contratinción con rojo neutro. Se determinó el porcentaje de células transducidas por medio de análisis de imágenes informatizado en varios campos. También se prepararon cortes de hígado de rata con cirrosis, se empaparon dichos cortes en parafina, se cortaron y se tiñeron con rojo sirio, que tiñe específicamente el colágeno.

c) Vectores adenovirales que contienen el gen terapéutico de huPA

Se construyó un vector adenoviral con la inserción del ADNc que codifica para el activador del plasminógeno de tipo urocinasa humano no secretado totalmente funcional (pAd.PGK- ΔNAC -huPA). Se añadieron señales de conservación a la proteína en el retículo endoplasmático (RE) en el extremo amino terminal y carboxilo terminal con el fin de evitar el riesgo de hemorragia derivado de la secreción de huPA. Generalmente, las proteínas secretadas se translocan en primer lugar a través de la membrana del retículo endoplasmático y entonces se portan en vesículas hasta el aparato de Golgi. En el caso de uPA, la translocación a través de la membrana del retículo endoplasmático se activa mediante una señal característica del extremo amino terminal de la proteína precursora. Dicho péptido señal se corta mediante peptidasas de señal durante la transferencia de polipéptido a través de la membrana. Para inhibir o disminuir

la secreción de uPA en la circulación sistémica, se modificó la proteína de un modo tal que fue necesario evitar que se exportara desde el retículo endoplasmático. Se modificó el ADNc de uPA humano (1.326 pb) clonado en pGEM3 en sitios XbaI/Asp718 (figura 3A) en el extremo carboxilo terminal añadiendo una secuencia que codifica para la señal KDEL (una secuencia altamente conservada característica de proteínas solubles que residen en la luz de PE) además de residuos en el sentido de 5' por medio de la clonación de 75 nucleótidos generados por PCR (figura 3B). Para modificar el extremo amino terminal, se sustituyeron los 25 aminoácidos amino terminales que incluían la señal peptídica de pre-uPA por una señal de conservación del extremo amino terminal (RR) junto con el "anclaje" en la región transmembrana (TM) separada por un separador peptídico (31 a.a.) que procede de la proteína transmembrana II lip33 obtenida por medio de PCR (figura 3B). La secuencia RR está constituida por residuos de arginina MHRRRSR situados próximos a la región de anclaje transmembrana (TM) y están presentes en la proteína transmembrana de tipo II como la proteína de cadena invariable lip33. Se clonó este gen de huPA modificado resultante en el plásmido adenoviral pAd.PGK- Δ N Δ C-huPA, para la posterior producción de vectores adenovirales recombinantes. Se monitorizó la preparación de dicho vector adenoviral para descartar endotoxina en la contaminación de microplasma. El motivo para la utilización de este vector es la ventaja de que, debido a que no secreta huPA, no provoca hipocoagulación o sangrado espontáneo, lo que es la principal desventaja en animales con cirrosis. El vector PAd-GFP utilizado en la presente memoria es un vector adenoviral deleciónado en las regiones E1 y E3 de replicación deficiente descritas anteriormente (Nyberg-Hoffman, C., Shabram, P., Li, W., Giroux, D. y Aguilar-Cordova, E. Sensivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nature Med.* 1997;3(7):808-11). Se produjeron los dos vectores en condiciones de laboratorio estériles implementadas para obtener vectores totalmente caracterizados. Se titularon y caracterizaron los vectores (Nyberg-Hoffman, C., Shabram, P., Li, W., Giroux, D. y Aguilar-Cordova, E. Sensivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nature Med.* 1997;3 (7): 808-11) y se obtuvieron lotes con título de partículas virales (pv) a razón de unidades de infección (IU) ≥ 30 .

d) *Preparación de homogeneizado de hígado para la detección de la producción de proteína terapéutica de huPA y actividad metaloproteasa*

Se sacrificaron las ratas tal como se indica en la figura 3D y se prepararon homogeneizados de hígado a partir de 150 mg de tejido tal como se describió (Gao, C., Jokers, R., Gondipalli, P., Cai, S. H., Kennedy S. y Ponder K. P. Intramuscular of an hepatic transduction with a retroviral vector in mice. *Hum. Gene Ther.* 1999;10:911-922) y se mantuvieron a -70°C. Al mismo tiempo, se obtuvieron muestras de suero y se mantuvieron a -20°C. En resumen, para huPA y en presencia de inhibidores de proteasa, se obtuvieron 150 mg de hígado y se maceraron en 400 μ l de tampón de homogeneizado (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, HEPES 0,01 M, CaCl₂ 2 mM, Tween 80 al 0,01%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF), pH 8,5). Se centrifugó el homogeneizado a 12.000 x g durante 15 minutos y se determinaron los niveles de huPA por medio de ELISA en el sobrenadante utilizando un kit comercialmente disponible (Biopool, Suecia) que consistía en un inmunoensayo enzimático específico para la determinación cuantitativa de uPA humano. La sensibilidad del ensayo detecta niveles iniciales de antígeno de uPA en el intervalo lineal de 0-5 ng/ml. Se determinaron los niveles de proteína total utilizando la técnica Bradford para la cuantificación de proteínas (Bradford, M.M A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72: 248-54). Para el ensayo de MMP-2 se homogeneizaron las muestras utilizando un homogeneizador (Politron PT 3000, Kinematica AG, Brinkman, Suiza) durante 5 minutos a 8.000 x g en 4 ml de Nad 0,15 M, a 4°C. Tras 3 ciclos de congelación-descongelación se sonicaron dos veces a 21 kilociclos por segundo durante 1 minuto a 4°C y se centrifugaron a 8.000 x g durante 10 minutos a 4°C, se tomaron alícuotas y se mantuvieron a -70°C. Se determinaron los niveles de MMP-2 en dichos sobrenadantes por medio de ELISA utilizando un kit comercial (Biotrak, Amersham).

e) *Evaluación bioquímica de las pruebas funcionales de hígado y sangre*

Se extrajo sangre de los animales en momentos específicos y se realizaron pruebas funcionales de hígado en suero (ALT, AST, fosfatasa alcalina y bilirrubina) en un aparato automatizado (Synchron Cx7). Se analizaron los tiempos de protrombina en plasma con un dispositivo automatizado (ACL-3000) y se realizaron análisis de sangre con otro dispositivo automatizado (Cell-Dyn 3500R).

f) *Evaluación histológica e inmunohistoquímica de cortes de hígado*

Se sacrificaron las ratas en los días 2, 4, 6, 8 y 10 tras la administración de pAd.PGK- Δ N Δ C-huPA (figura 3D). Se utilizaron como grupos control un grupo de animales con cirrosis que recibieron pAd-GFP (adenovirus irrelevante) y un grupo de animales con cirrosis que recibieron una solución salina. Se incluyeron por lo menos cinco ratas en cada grupo. Para el estudio histológico, se fijaron inmediatamente los hígados obtenidos por medio de inmersión en formaldehído al 10% en tampón fosfato (PBS), se deshidrataron en alcohol etílico y se empararon en parafina. Se tiñeron los cortes de 5 μ de espesor con hematoxilina/eosina, rojo sirio y tinción tricrómica de Masson y en este último experimento se determinó el porcentaje de fibrosis en los hígados afectados utilizando un analizador de imágenes informatizado (Qwin Leica) por medio del análisis aleatorio de 10 campos por portaobjetos y calculando la razón de tejido conjuntivo con respecto al área total del hígado. Para la inmunohistoquímica se montaron cortes de hígado sobre portaobjetos silanizados, se retiró la parafina y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ al 0,03% en metanol absoluto. Se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales frente a PCNA (antígeno nuclear celular de proliferación) y actina α del músculo liso (Boehringer Mannheim, Ger) diluida con PBS 1/20 y 1/50, respectivamente, y con anticuerpo policlonal de cabra anti-uPA humano (Chemicon International, USA) diluido en PBS 1/400. Se detectó la reacción con anticuerpos policlonales de cabra o de conejo marcados con

peroxidasa, se desarrolló con diaminobenzidina, y se contratiñó con hematoxilina. Se evaluaron al azar cuatro campos para fines de cuantificación de las zonas intralobulillar y periporta. Se contaron células positivas y negativas con un analizador de imágenes informatizado (Qwin, Leica) y se expresaron los datos como porcentaje de células positivas. Se interpretó el análisis histopatológico por dos patólogos cualificados independientes con un margen de diferencia del 5%.

g) *Extracción de ARN y RT-PCR semicuantitativa*

Se aisló inmediatamente el RNBA total tras obtener los hígados en los tiempos definidos, según el procedimiento de Chomczynski y Sacchi's (Chomczynski, P. y Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanato-phenol chloroform extraction. Anal. Biochem. 1987;162:156-159). Se homogeneizó tejido de hígado por medio de un dispositivo Politrón en presencia de Trizol y entonces se añadió cloroformo obteniendo una fase acuosa y precipitando el ARN con isopropanol. Se determinó la cantidad de ARN por medio de espectrofotometría a 260/280 nm. Se verificó la calidad por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y formaldehído.

Se realizaron análisis de expresión génica de HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), c-met (receptor celular de HGF) y colágenos por medio de RT-PCR semicuantitativa. Se utilizó una metodología desarrollada en el laboratorio y descrita en Delgado-Rizo *et al.* (Delgado-Rizo, V., Salazar, A., Panduro, A., Armenda' riz-Borunda, J. Treatment with anti-transforming growth factor β antibodies, influences an altered pattern of cytokines gene expression in injured rat liver. Biochim. Biophys. Acta 1998: 1442:20-27). En resumen, se trataron los hígados de por lo menos 3 animales en cada grupo. Del mismo modo se realizaron 3 reacciones de RT-PCR diferentes en cada hígado, y se muestran los resultados densitométricos cuantitativos de sus promedios. Los genes amplificados fueron:

GEN	CEBADORES	FRAGMENTO AMPLIFICADO
HGF	(sentido) 5'ATGCTCATTGGACCCTGGT3' (antisentido) 5'GCCTGGCAAGCTTCATTA3'	700 pb
c-met	(sentido) 5'CAGTGATGATCTCAATGGGCAAT3' (antisentido) 5'AATGCCCTCTTCCTATGACTTC3'	726 pb
Colágeno I	(sentido) 5'CAAGAAATGGCGACCGTGGTGA3' (antisentido) 5'GGTGTGACTCGTGCAGCCATC3'	1043 pb
Colágeno III	(sentido) 5'AGATGGATCAAGTGGACATC3 (antisentido) 5'CATGTTTCTCCGGTTTCCAT3'	449 pb

Se sometió el ARN aislado previamente a transcripción inversa por medio de enzima (M-MLV) y se sometieron los ADNc obtenidos a amplificación en un termociclador en las siguientes condiciones: 5 minutos a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1,5 minutos a 72°C durante 30 ciclos. Se normalizaron los niveles de expresión de todos los transcritos con un gen de expresión constitutiva de RPRT.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) presenta actividades multifuncionales incluyendo proliferación, migración y diferenciación celular (Kim, T.H., Mars, W.M., Stolz, D.B., Petersen B.E. y Michalopoulos, G.K. Extracellular matrix remodeling at the early stages of live regeneration in the rat. Hepatology 1997;26:896-904; y Michalopoulos, G.K., DeFrances M.C. liver regeneration. Science 1997;276:60-66). En el hígado normal, el HGF se produce por células estrelladas hepáticas (HSC) (Schirmacher, P., Geerts, A., Jung, W., Pietrangelo, A., Rogler, C.E., Dienes, H.P. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. EXS 1993;65:285-299) y se secuestra en la matriz extracelular (ECM) (Liu, M.L. Mars, W.M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K., Uptake and distribution of hepatocyte growth factor in normal and regenerating adult rat liver. Am. J. Pathol. 1994;144:129-140). Además, HGF se produce también por la placenta, el pulmón y el cerebro (Schirmacher, P., Geerts, A., Jung, W., Pietrangelo, A., Rogler, C.E., Dienes, H.P. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver .EXS1993;65:285-299 y Wolf, H.K., Zarnegar, R. Michalopoulos, G.K. Localization of hepatocyte growth factor in human and rat tissues: an immunohistochemical study. Hepatology 1991;14488-494). Se ha notificado que uPA puede activar FIGS de cadena sencilla (scHGF, forma inactiva), HGF de cadena doble (tcHGF, forma activa) (Schirmacher, P., Geerts, A., Jung, W., Pietrangelo, A., Rogler, C.E., Dienes, H.P. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. EXS 1993;65:285-299 y Wolf, H.K., Zarnegar, R. Michalopoulos, G.K. Localization of hepatocyte growth factor in human and rat tissues: an immunohistochemical study. Hepatology 1991;14488-494). De este modo, en este modelo experimental, la impresionante producción de uPA humano modificada en los hepatocitos funcionales restantes condujo fuertemente a la activación de HGF *in situ* que se une a su receptor de c-met e induce la proliferación celular temprana en el hígado, tanto en las zonas de parénquima total como en zonas de periporta (figuras 7A, B, C y D). Además, se sabe que la aplicación de HGF en hígado de rata normal estimula la proliferación de hepatocitos solamente en los hepatocitos de periporta (Liu, M.L. Mars, W.M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-alpha in adult rat liver. Hepatology 1994;19:1521-152 y Liu, M.L. Mars, W.M., Zarnegar, R., Michalopoulos, O.K., Uptake and distribution of hepatocyte growth factor in normal and regenerating adult rat liver. Am. J. Pathol. 1994;144: 129-140), pero se ha observado un aumento drás-

tico en la síntesis de ADN en hepatocitos de zonas lobulillares, cuando se trataban previamente hígados normales con collagenasas (Liu, M.L. Mars, W.M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-alpha in adult rat liver. Hepatology 1994;19:1521-152). En resumen, las evidencias combinadas presentadas en la presente memoria sugieren que la degradación de ECM activa junto con c-met aumentaban la regulación y la activación sincrónica de HGF y la unión a su receptor correspondiente, activan la proliferación de hepatocitos. La respuesta de proliferación fuerte observada en animales con cirrosis a los que se había inyectado uPA (aproximadamente al 60%) podría reflejar el efecto aditivo de una acción directa de HGF inducible sobre los hepatocitos y el efecto de las MMP sobre la preparación de hepatocitos de tal modo que pueden ofrecer una respuesta más eficaz frente a factores de crecimiento (Kim, T. H., Mars, W. M., Stolz, D.B., Peterson, B.E., y Michalopoulos, G. K. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. Hepatology 1997;26:896-904).

Además de su función en la activación del plasminógeno, se considera que uPA es uno de los principales cebadores que conducen a la activación de la cascada de metaloproteasa asociada con la degradación de la matriz (Kim, T. H., Mars, W. M., Stolz, D.B., Peterson, B.E., y Michalopoulos, G. K. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. Hepatology 1997;26:896-904). Tras la activación del plasminógeno en plasmina por medio de uPA, dicha plasmita, a su vez, activa procolagenasas y posiblemente otras metaloproteasas (MMP) para dar su forma activa, en fases tempranas (Kim, T. H., Mars, W. M., Stolz, D.B., Peterson, B.E., y Michalopoulos, G. K. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. Hepatology 1997;26:896-904). La acción *in situ* de dichas enzimas provocó la degradación del componente específico de ECM, remodelando la arquitectura del órgano alterada y el aspecto de vasos sanguíneos recién formados (angiogénesis) (datos no representados). Incluso si está claro que la sobreproducción de uPA modificado activa la rápida reorganización de ECM observada en la presente memoria, esto podría regularse por medio de mecanismos aún no dilucidados, pero la inducción de MMP-2 específica es parte de dicho mecanismo.

Por tanto, además del sistema de uPA/plasmina que inicia la remodelación de la matriz, las metaloproteasas de matriz de tipo membrana (MT-MMP) podrían ser otras proteinasas inducibles que han de identificarse en la remodelación de ECM en este sistema, puesto que se ha notificado que las MT1-MMP podrían iniciar la activación de pro-MMP2. Por tanto, un objetivo colateral del estudio realizado en el laboratorio es dilucidar la función de las MMP en la reversión de la fibrosis hepática inducida por huPA.

Finalmente, se está evaluando la aplicación de este tipo de estrategias para utilizarse en seres humanos con cirrosis antes de la determinación y evaluación en animales superiores a la rata. Nos encontramos en el proceso de integrar el protocolo correspondiente para su evaluación en perros Beagle y/o primates no humanos.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un vector adenoviral recombinante que contiene un genoma adenoviral del cual se han deletado los marcos de lectura abiertos E1 y/o E3, pero que conserva suficiente secuencia para hacer que dicho vector adenoviral recombinante pueda replicarse *in vitro*, en la que dicho vector comprende el ADNc del gen humano que codifica para un activador de plasminógeno derivado de urocinasa natural y/o modificado (huPA) que se sitúa bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV), para preparar un medicamento para tratar la fibrosis hepática.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho vector adenoviral recombinante se selecciona de entre el grupo constituido por vector adenoviral de primera, segunda, tercera o cuarta generación y vector adenoviral "gutless".

3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que dicho ADNc codifica para una forma de huPA no secretada con modificación de las señales de conservación en el retículo endoplasmático (RE) en el extremo amino terminal y en el extremo carboxilo terminal.

4. Utilización según la reivindicación 3, en la que dicho ADNc codifica para huPA modificado en el que los 25 aminoácidos amino terminales que incluyen la señal peptídica de pre-uPA están sustituidos por una señal de conservación amino terminal (RR) próxima al anclaje en la región transmembrana (TM) separada por un péptido espaciador de 31 aminoácidos de la proteína transmembrana II lip33 obtenida mediante PCR.

5. Utilización según la reivindicación 4, en la que la secuencia RR está constituida por residuos de arginina MHRRRSR situado próximo a la región de anclaje de la transmembrana (TM) y están presentes en proteínas transmembranas de tipo II tales como la proteína de cadena invariable lip33.

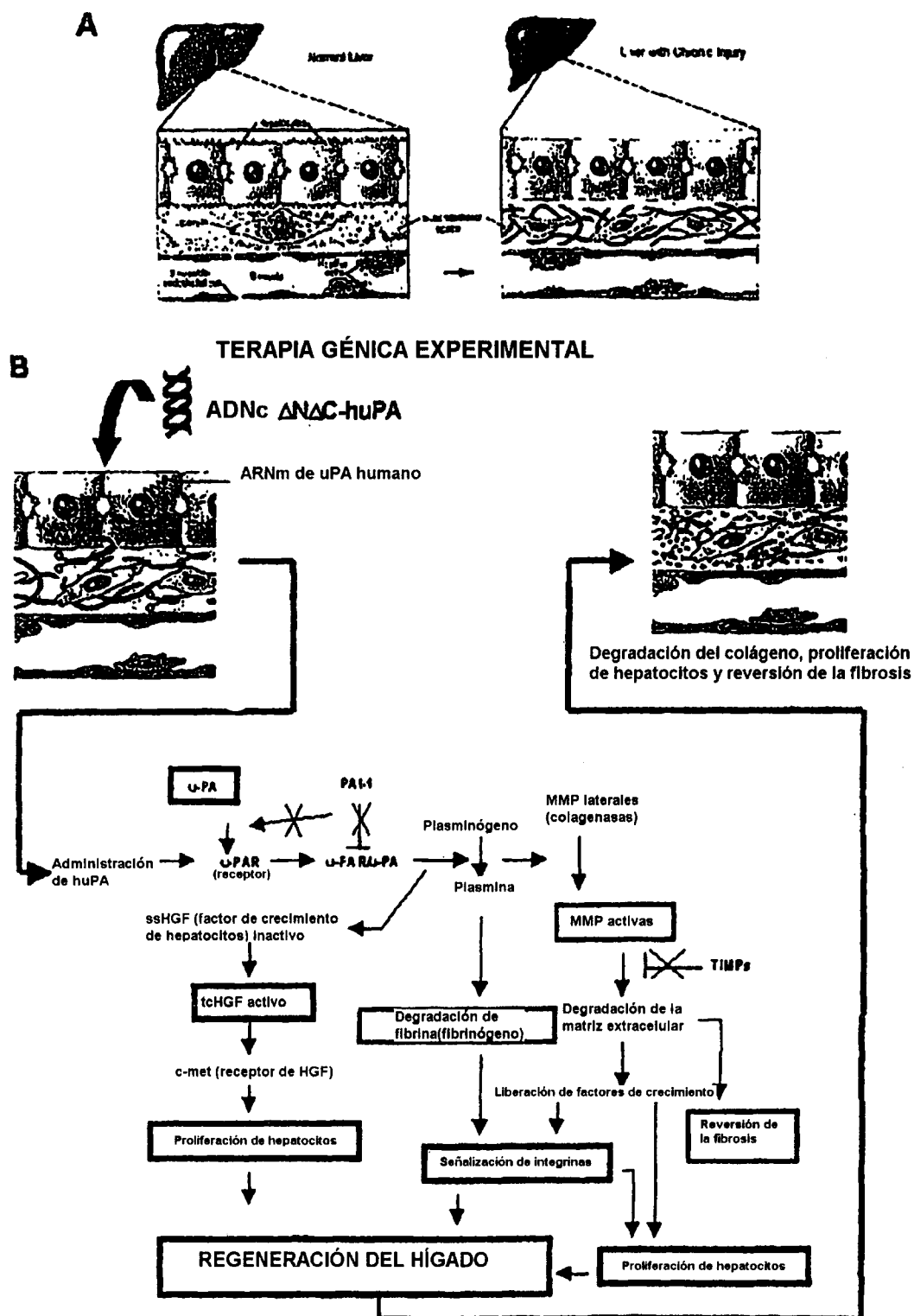


FIGURA 1

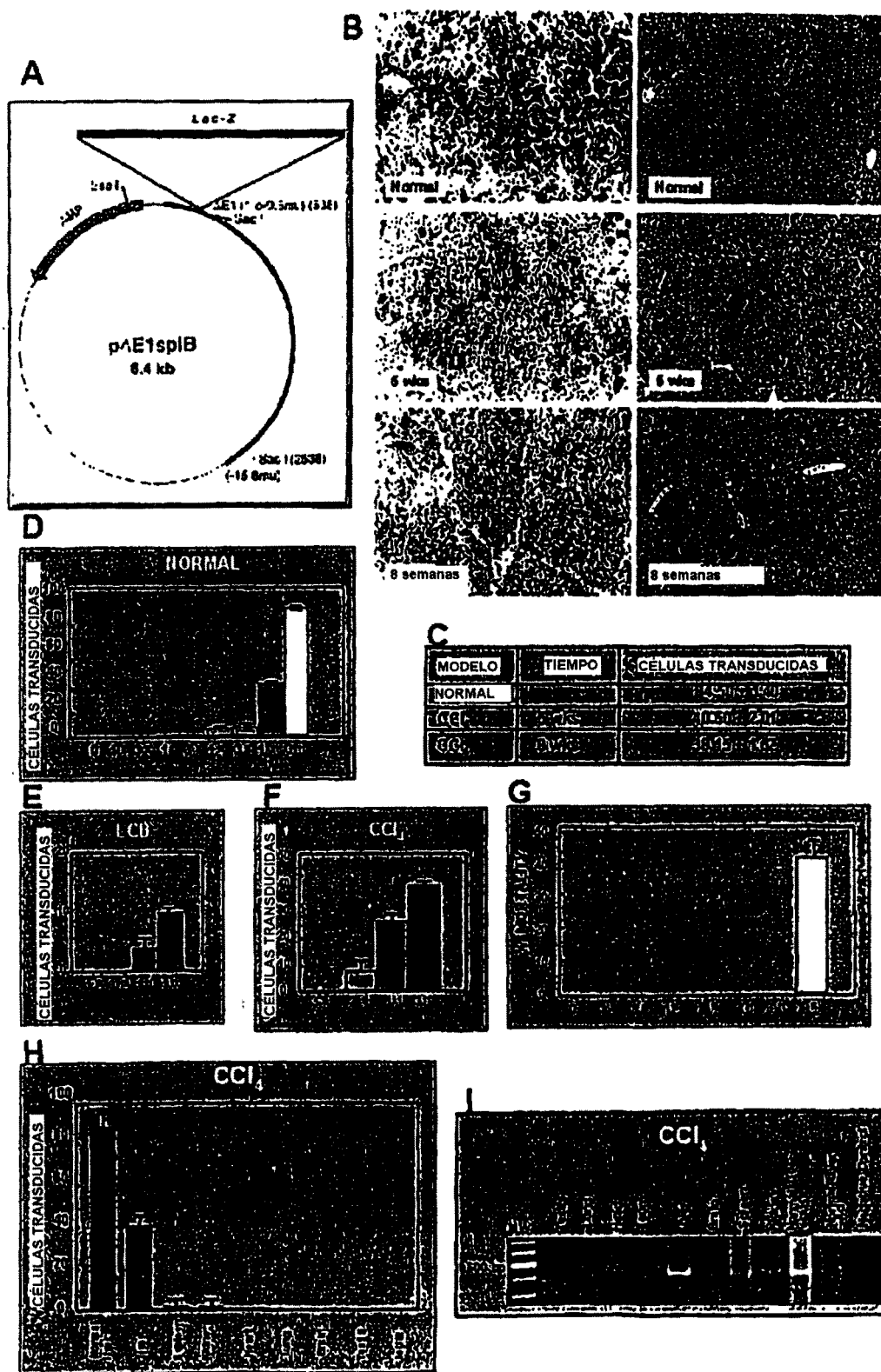


FIGURA 2

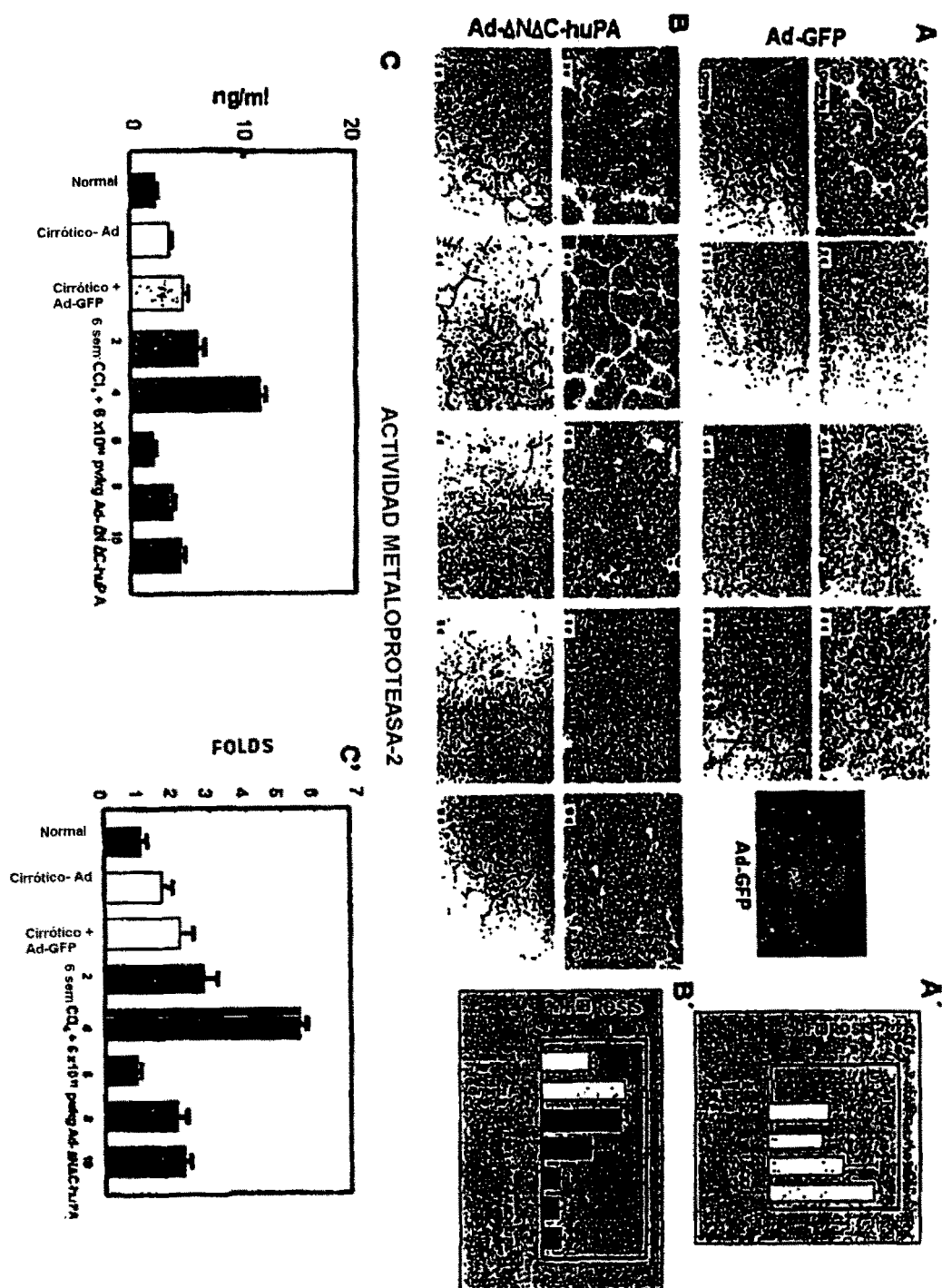


FIGURA 4

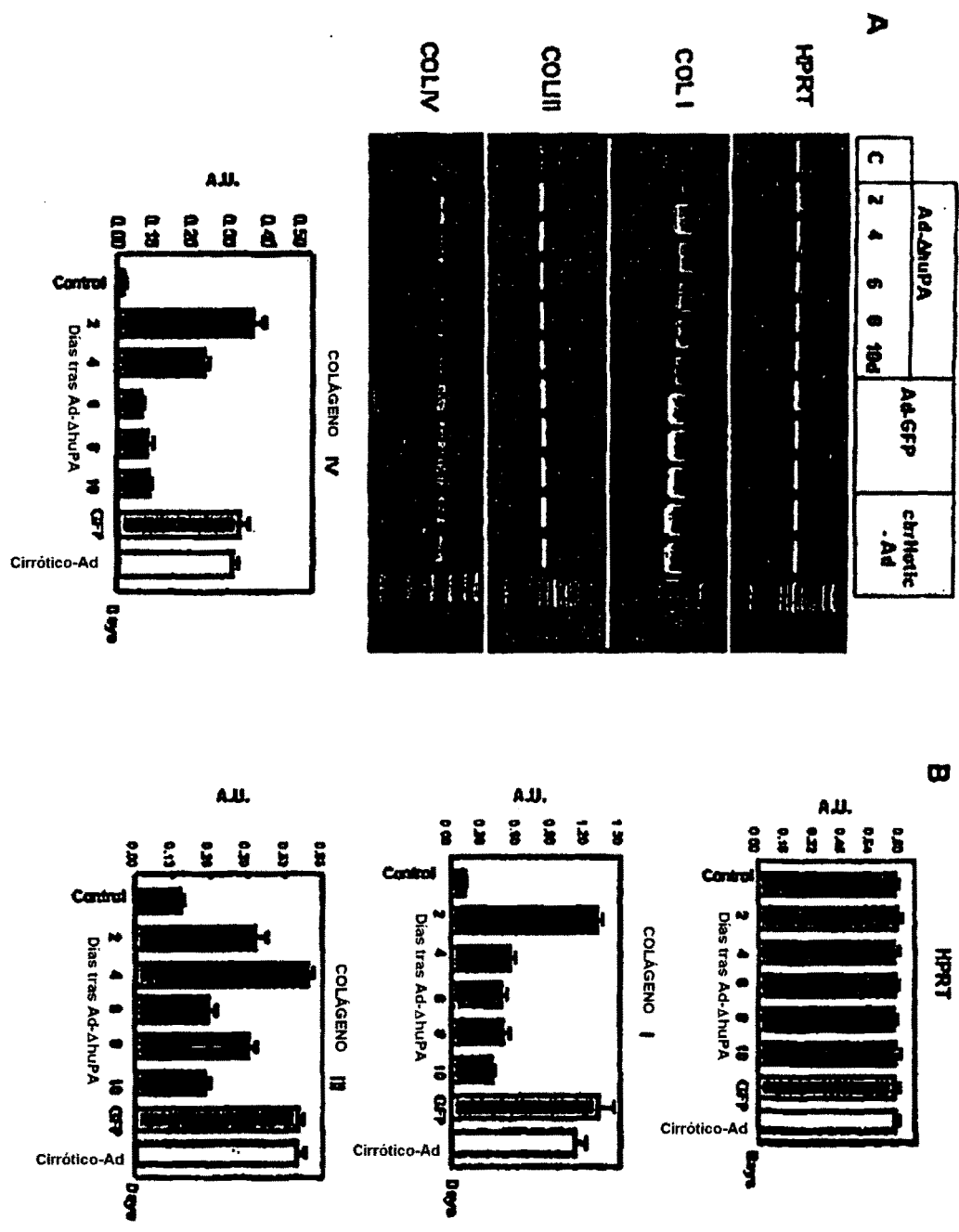


FIGURA 5

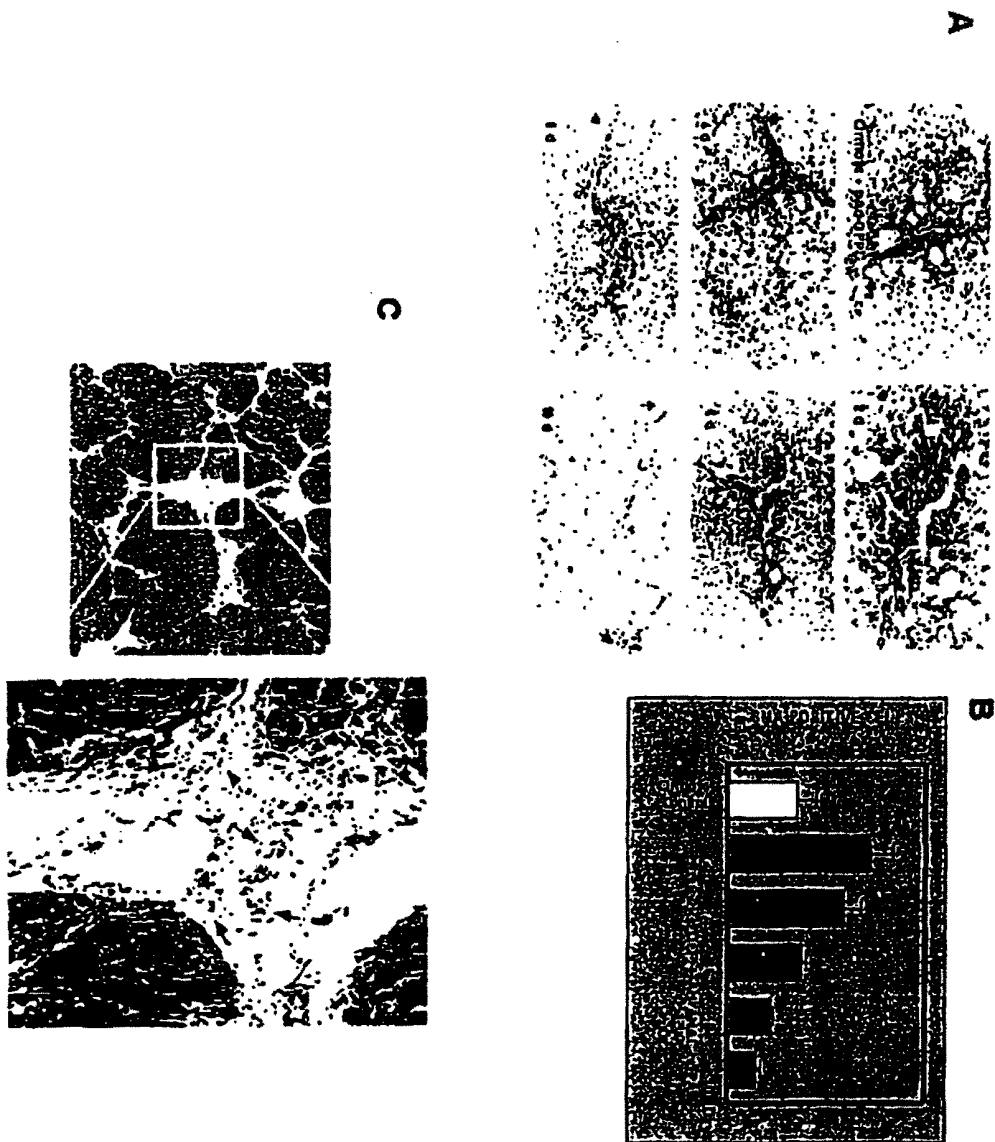


FIGURA 6

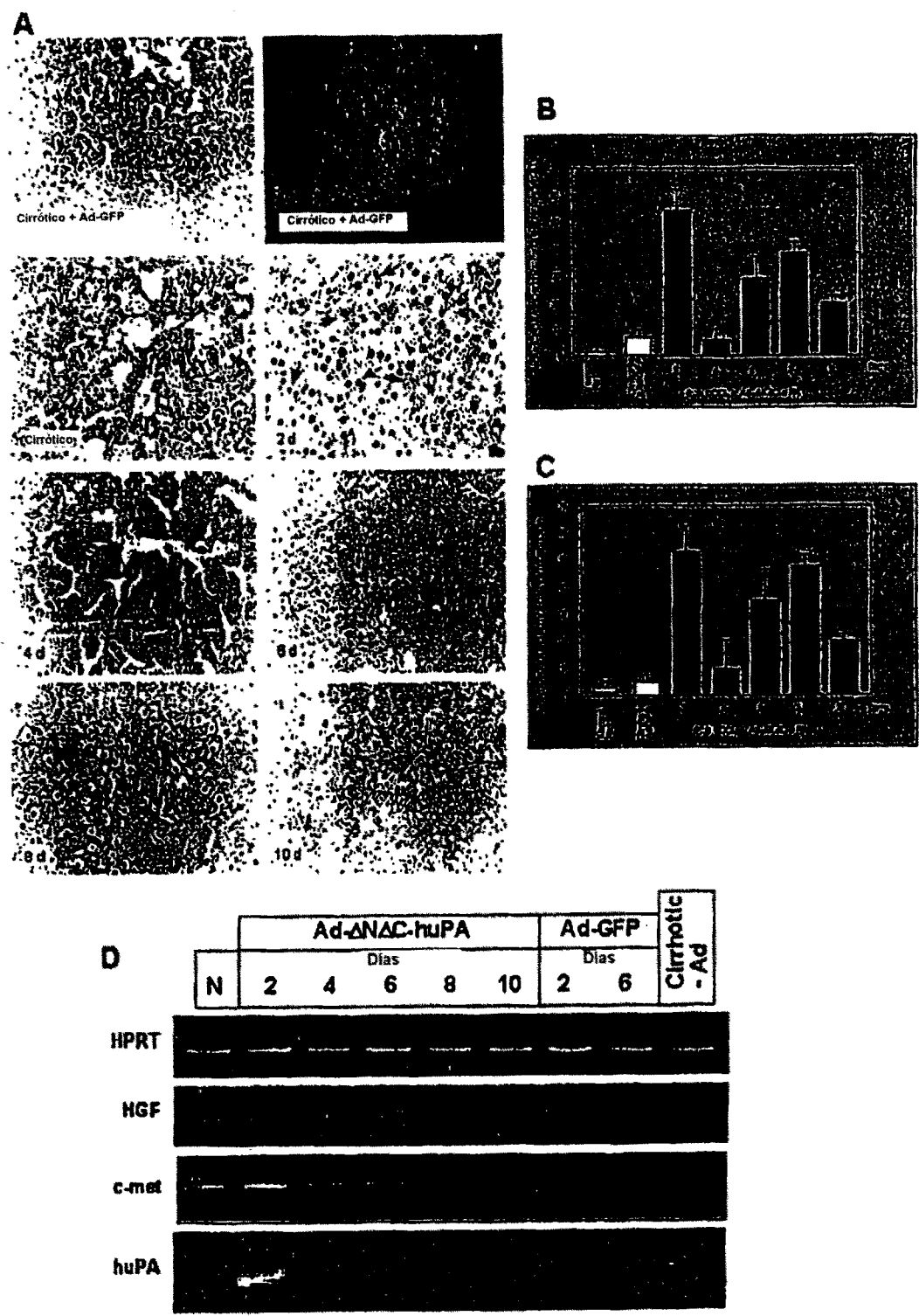
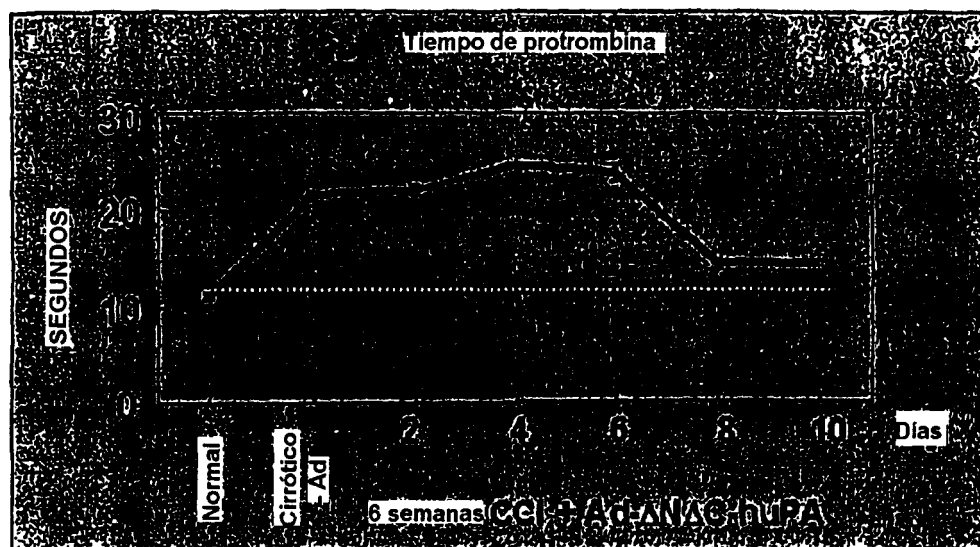


FIGURA 7

A



B

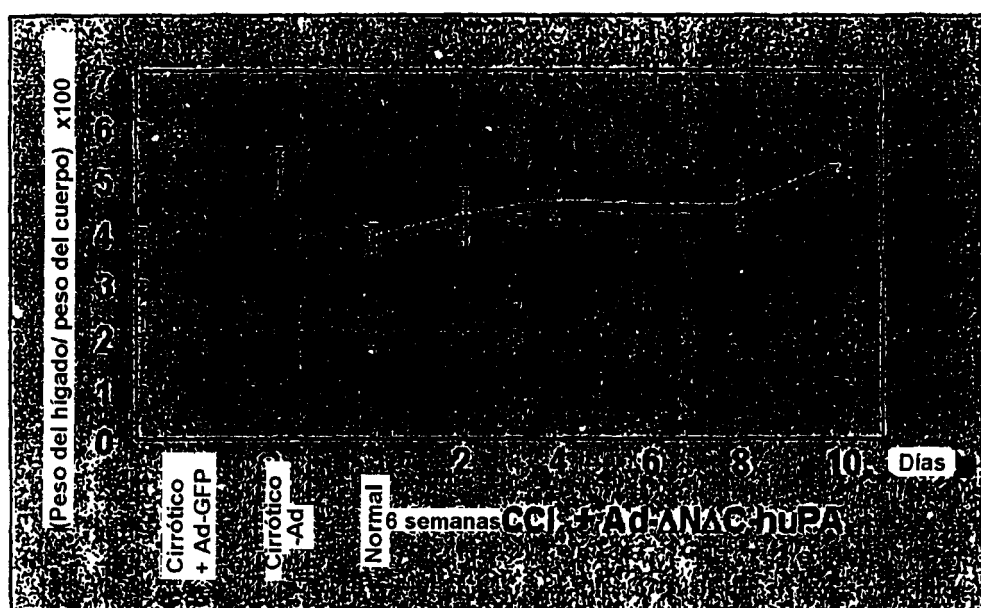


FIGURA 8