

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 342 705**

21 Número de solicitud: 200803218

51 Int. Cl.:
A61K 38/22 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **11.11.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
12.07.2010

71 Solicitante/s: **Universidad Autónoma de Madrid
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
c/ Einstein, nº 3
28049 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Olazábal Olarreaga, Isabel María;
García Ruiz, Josefa Predestinación y
Delgado Baeza, Emilio**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Uso de prolactina como hepatoprotector y/o regenerador de células hepáticas en mamíferos.**

57 Resumen:

Uso de prolactina como hepatoprotector y/o regenerador de células hepáticas en mamíferos.
La presente invención se refiere al uso de prolactina (PRL) para preservar la función de las células hepáticas así como favorecer la regeneración de las mismas en mamíferos. La función hepatoprotectora se debe a la inducción de factores de transcripción tales como C/EBP α , HNF-1, -3, -4, VEGF y HIF-1 α y la función regeneradora, al aumento de la actividad de los factores de transcripción AP-1 y STAT-3. La inducción de todos estos factores implicados se debe a la acción de la prolactina administrada en una sola dosis que evita los efectos secundarios que se dan con mayores dosis o con la administración de otros fármacos que tienen el mismo uso.

ES 2 342 705 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de prolactina como hepatoprotector y/o regenerador de células hepáticas en mamíferos.

5 La presente invención se refiere al uso de prolactina (PRL) para preservar la función de las células hepáticas así como favorecer la regeneración de las mismas en mamíferos. La función hepatoprotectora se debe a la inducción de factores de transcripción tales como C/EBP α , HNF-1, -3, -4, VEGF y HIF-1 α y la función regeneradora, al aumento de la actividad de los factores de transcripción AP-1 y STAT-3. La inducción de todos estos factores implicados se debe a la acción de la prolactina administrada en una sola dosis que evita los efectos secundarios que se dan con mayores
10 dosis o con la administración de otros fármacos que tienen el mismo uso.

Estado de la técnica anterior

El hígado posee la capacidad de alterar su tamaño en respuesta a alteraciones del cuerpo intrínsecas o extrínsecas. Éste órgano, compuesto mayoritariamente por hepatocitos, juega un papel central en la homeostasis metabólica y en la síntesis de proteínas séricas, actuando también como un detoxificador a través de la síntesis biliar (Jungermann and Katz (1969) *Physiol. Rev.* 69:708-764). La regeneración hepática después de un hepatectomía parcial (PHx) es un proceso complejo. La regeneración es iniciada por cambios hemodinámicos producidos después de la PHx, que triplican la contribución vía porta por unidad de tejido (Marubashi *et al.* (2004) *Surgery.* 136:1028-1037). Esto dispara una serie de eventos tempranos que conllevan la inducción rápida de más de 100 genes en el hígado. A continuación, factores de crecimiento y citoquinas orquestan una ola de mitosis de hepatocitos en 24 horas coincidiendo con la activación de factores de transcripción inmediatos que median la transición de la fase G1, incluyendo: c-Jun, c-Fos, c-Myc, NF-kB, STAT-3 y C/EBP β (Fausto, N. (2000) *J Hepatol* 32:19-31; Wang *et al.* (1995). *Science* 269:1108-1112; Lee *et al.* (1997). *Mol. Cell. Biol.* 17:6014-6022; Croniger *et al.* (1997). *J. Biol. Chem.* 272:26306-26312). Después, factores como FoxM1B, miembro de la familia HNF, regulan la progresión a la fase S y mitosis (M). Por tanto, el conjunto de estos factores de transcripción modulan la conexión entre ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) e inhibidores de ciclinas (Taub (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5:836-847; Albrecht *et al.* (1993) *Am. J. Physiol.* 265:G857-864; Albrecht *et al.* (1997) *Hepatology* 25:557-563; Loyer *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:2491-2500; Ehrenfried *et al.* (1997) *Surgery* 122:927-935). Otras células de hígado como colangiocitos, células de Kupffer y células endoteliales entran posteriormente, de forma progresiva, en el ciclo celular (Michalopoulos *et al.* (1997) *Science* 276:60-66; Taffetani *et al.* (2007) *BMC Physiol.* 7:6).

Entre los factores implicados en el crecimiento compensatorio hay miembros de la gran familia de las citoquinas, como, hormona de crecimiento (GH) y eritropoietina (Epo). Es interesante el hecho de que la GH ha sido administrada a niños con fallo hepático crónico mejorando la recuperación del hígado, y se ha demostrado que el tratamiento con Epo protege diversos tejidos, incluyendo el hígado, de daño hipóxico y promoviendo la reparación del tejido (Schmeding *et al.* (2007) *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23:1125-1131; Fuqua (2006) *Semin. Pediatr. Surg.* 15:162-169). Sin embargo, el efecto de la PRL, miembro de la misma familia de citoquinas que Epo y GH, en la regeneración de tejido ha recibido menos atención.

La prolactina es una hormona segregada por la adenohipófisis, conocida por la estimulación de la producción de leche en las glándulas mamarias y la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo. Sin embargo la PRL ejerce otras funciones: se han constatado más de 150 acciones diferentes de la PRL. Es una hormona proteínica con un peso molecular aproximado de 23 kDa. Además de ser segregada por la adenohipófisis, parece ser producida de forma ectópica en una gran variedad de órganos, células y tejidos.

En el hígado de rata, el sistema PRL- receptor de PRL (PRLR) está controlado por la expresión predominante de la isoforma corta del RPRL, que silencia el efecto de la isoforma larga (Berlanga *et al.* (2007) *Mol. Endocrinol.* 11: 1449-1457; Olazabal *et al.* (2000) *Mol. Endocrinol.* 14:564-575; Kelly *et al.* (1991) *Endocr. Rev.* 12:235-251). Sin embargo, el aumento de los niveles de PRL induce la expresión de la isoforma larga del RPRL hasta niveles que justifican la acción de la PRL en el hígado (Ogueta *et al.* (2002) *Mol. Cell. Endocrinol.* 190:51-63; Bogorad *et al.* (2006) *J. Endocrinol.* 188:345-354). El sistema PRL-PRLR dispara la proliferación/diferenciación celular regulando muchas funciones importantes en los sistemas inmunológico, esquelético y reproductivo, así como en la composición y síntesis biliar en el hígado (Taffetani *et al.* (2007). *BMC Physiol.* 7:6; Cao *et al.* (2001) *Hepatology* 33:140-147; Clevenguer *et al.* (2004) *Am. J. Pathol.* 165:1449-1460). La PRL es un mitógeno hepático que estimula el ciclo celular y sus niveles en suero aumentan significativamente 5-15 minutos después de la PHx (Buckley *et al.* (1991) *Dig. Dis. Sci.* 36:1313-1319; Buckley *et al.* (1991) *Life Sci.* 48:237-243). Además, la PRL puede compensar a Epo y a leptina. Por ello, en ratones EpoR^{-/-}, la PRL es la que regula la producción de eritrocitos en el hígado fetal (Socolovsky *et al.* (1998) *Blood* 92:1491-1496), y la homeostasis energética que regula el metabolismo de la glucosa y lipídico (Ben-Jonathan *et al.* (2006) *Trends Endocrinol. Metab.* 17:110-116).

Explicación de la invención

En la presente invención se muestra que la administración de prolactina (PRL) en ratas causa un aumento en la capacidad regenerativa del hígado. Se ha ensayado el efecto de la PRL en la regeneración hepática *in vivo*, en ratas. La administración de PRL acelera la regeneración hepática, a través de la estimulación de los principales factores de transcripción implicados en el proceso. Los datos mostrados en la presente invención muestran el efecto agudo

ES 2 342 705 A1

hepatoprotector de la administración de PRL para iniciar el proceso de regeneración después de un insulto. Estos efectos no tienen nada en común con los descritos en el caso de acción sostenida de esta hormona (prolactinomas o producción en tumores de mama). Los otros miembros de la familia, GH y Epo, tienen también activaciones no deseadas en administraciones sostenidas.

5 La PRL regula factores de transcripción implicados en proliferación metabolismo función específica del hígado. Los resultados de la presente invención muestran que la administración de una sola dosis de PRL antes de la hepatectomía acelera el inicio de la maquinaria regenerativa del hígado y como consecuencia tiene un papel hepatoprotector. Esta invención sugiere la administración de PRL para nuevas estrategias de tratamiento clínico en regeneración hepática.

10 La administración de PRL aumenta la actividad de los principales factores de transcripción implicados en la proliferación de los hepatocitos, como AP-1 y STAT-3, así como aquellos factores de transcripción implicados en el metabolismo energético, como C/EBP α , HNF-1, -3, -4. Estos datos demuestran que la administración de PRL favorece el inicio de la regeneración de las células del hígado. Por tanto, la administración de PRL contribuye a la regulación de la masa celular hepática a través de AP-1 y STAT-3 mientras que preserva la función del resto del hígado a través de C/EBP α , HNF-1, -3 y -4.

15 En este sentido, los resultados mostrados en la presente invención demuestran que la PRL acelera la entrada de los hepatocitos en la fase S y en mitosis a través de HNF-3, además de AP-1 y STAT-3, primando la regeneración del hígado.

20 VEGF y HIF-1 α son marcadores de angiogénesis y supervivencia celular que preservan y protegen a las células en condiciones de estrés. Los niveles de ambas proteínas aumentan después de la PHx, favoreciendo la regeneración hepática. Los ejemplos reflejan que la administración de PRL induce significativamente la expresión de VEGF y HIF-1 α tan solo después de 5h de la PHx, corroborando el papel de la PRL en la aceleración de la función hepatoprotectora.

25 Debido a una intrincada red reguladora de genes que soporta la regulación de los órganos y debido a la redundancia disparada por diferentes señales, es difícil atribuir *in vivo* los efectos a una sustancia específica. A pesar de esto, los resultados demuestran que la PRL dispara un efecto agudo en la regeneración del hígado, siendo consistente con el efecto de la GH o Epo con los que desarrolla funciones solapantes pero, con la administración de PRL en una sola dosis intraperitoneal (i.p.) de entre 1 y 3 mg/Kg de peso corporal pueden ser evitados los efectos secundarios descritos con niveles altos mantenidos de PRL, o de GH o Epo.

30 Por tanto, estos resultados recalcan las aplicaciones clínicas del tratamiento con PRL en pacientes con daño hepático o en pacientes que reciben trasplantes de hígado.

35 En este sentido, el principal aspecto de la presente invención es el uso de una composición que comprende prolactina (PRL) para la elaboración de un medicamento hepatoprotector y/o regenerador de células hepáticas, en los trasplantes de hígado, en mamíferos.

40 El término "hepatoprotector" tal como se entiende en la presente invención se refiere al efecto conseguido en las células hepáticas que consiste en el adelanto en el inicio de la maquinaria regenerativa del hígado. Concretamente este efecto tiene lugar por medio de la inducción de factores de transcripción tales como VEGF y HIF-1 α . Además el término "hepatoprotector" se refiere al efecto conseguido en las células hepáticas que consiste en el mantenimiento de la actividad metabólica del hígado a pesar del daño hepático. Concretamente este efecto tiene lugar por medio de la inducción de factores de transcripción tales como HNF-1 y -4. Estos efectos se pueden conseguir administrando PRL antes de un daño hepático previsible o en cualquier otra situación en la que se requiera una preparación de la maquinaria regenerativa.

45 50 El término "regenerador de células hepáticas" se refiere a la capacidad de inducir la síntesis de nuevas células hepáticas por medio de una aceleración en la entrada de los hepatocitos en fase S del ciclo celular. La mayor parte de las células eucarióticas se dividen por medio de un ciclo celular continuo. En la fase S de este ciclo celular se replica el ADN y se completa poco antes de que comience la mitosis duplicándose así la dotación genética (4n) como preparación para la división celular. Los hepatocitos son células proliferantes facultativas que llevan a cabo la división celular cuando surge la necesidad, por ejemplo, después de un daño hepático. La administración de PRL acelera la inducción de la expresión de AP-1 y STAT-3, que son los factores de transcripción que favorecen la división celular o lo que es lo mismo, la regeneración hepática.

55 60 El medicamento elaborado a partir de un compuesto que comprende PRL tiene las dos funciones mencionadas, hepatoprotectora y regeneradora de células hepáticas en mamíferos. La administración de este medicamento tras un daño celular hepático causado como consecuencia de un trasplante parcial o total de un hígado producirá un efecto regenerador acelerado con respecto a células que no sean tratadas con PRL. La administración del medicamento previa a la generación del daño hepático descrito, prepara a las células hepáticas para una posterior etapa de regeneración o división celular más eficiente.

65 Los ejemplos que se presentan en la presente invención se llevan a cabo *in vivo* en ratas. El comportamiento de los hepatocitos del mamífero rata puede extrapolarse al resto de mamíferos ya que los mecanismos de inducción de

ES 2 342 705 A1

factores de transcripción, mencionados anteriormente, así como la implicación de los mismos en la hepatoprotección y regeneración de células hepáticas, se conservan en todos los mamíferos. Preferiblemente el mamífero es un humano. No obstante, este medicamento se podría aplicar en el campo de la veterinaria para tratar animales con daños hepáticos.

5 El término “daño hepático” tal como se usa en la presente invención hace referencia a una lesión en el tejido hepático que da lugar a la desaparición de tejido hepático (células hepáticas), preferentemente hepatocitos, y, por tanto, la consecuencia es la generación de insuficiencia de la función del hígado.

10 El medicamento descrito en el principal aspecto de la presente invención puede usarse para evitar que el hígado trasplantado tarde menos en aceptar las señales regeneradoras que le proporciona el resto de su propio organismo.

Según una realización preferida del aspecto anterior la dosis intraperitoneal es de entre 1 y 3 mg de PRL por Kg de peso corporal.

15 Tal como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, la administración de PRL dispara un efecto agudo en la regeneración del hígado y en su protección cuando la dosis de PRL es de entre 1 y 3 mg de PRL por Kg de peso corporal. Esta concentración de PRL se suministra en una sola dosis. Los efectos producidos por esta concentración intraperitoneal equivalen a un rango de 0,13 y 0,4 mg de rhPRL (*recombinant human prolactin*) por Kg de peso corporal cuando se suministra por vía intravenosa. La concentración fisiológica conseguida por medio de esta administración, es la adecuada para evitar los efectos secundarios derivados de una administración continuada por varios días de concentraciones más elevadas de PRL, GH o Epo. Estos efectos secundarios pueden ser alteraciones en los niveles hormonales que tienen diferentes efectos en hombres y mujeres. En hombres, un aumento de los niveles de prolactina en sangre por encima de los valores normales puede provocar impotencia y en las mujeres, amenorrea. Asimismo, también podrían causar desórdenes autoinmunes: artritis reumatoide, lupus eritematoso, etc.

Según otra realización preferida el medicamento incluye excipientes farmacológicamente aceptables.

30 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la sustancia activa (en la presente invención, PRL), estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio di-básico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

40 El término excipiente “farmacológicamente aceptable” hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Además, el excipiente debe ser farmacológicamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo, en este caso, la PRL.

45 Preferiblemente el excipiente es PBS con alguna proteína no inmunogénica 0,05% para evitar la pérdida de la PRL por adherirse a componentes plásticos.

En otra realización preferida la composición comprende opcionalmente otra sustancia activa. Esta sustancia activa debe permitir la actividad de la PRL, es decir, debe ser compatible.

50 Otra realización preferida es el uso según el aspecto principal y cualquiera de las realizaciones anteriores donde las células hepáticas proceden de un hígado trasplantado, de un hígado donante o de un hígado dañado. La PRL ayuda al donante de un lóbulo hepático a regenerar la masa hepática así como también ayuda al enfermo trasplantado acelerando la respuesta de aceptación y el estado del lóbulo trasplantado. Un hígado dañado es aquel que ha experimentado la muerte de células hepáticas o una eliminación de las mismas, de tal forma, que supone una disminución del número de células hepáticas efectivas que tiene como consecuencia una disfunción del hígado de cualquier grado que desencadena patologías que afectan a la salud del afectado/a.

60 El trasplante de hígado sería el caso más extremo de un hígado dañado. En este proceso se remueve todo el hígado (hepatectomía total) y se reemplaza con un hígado donado sano.

65 En los casos anteriores el tratamiento con el medicamento de la presente invención ayuda a regenerar células hepáticas y, por tanto, la recuperación de un paciente sometido a un trasplante de hígado, de un paciente donante de una porción de hígado, preferentemente un lóbulo hepático, o de un paciente con daño hepático, se produce de manera más rápida, lo que puede suponer un mayor número de casos de éxito en las citadas intervenciones quirúrgicas y una reducción del periodo de convalecencia del paciente.

En una realización más preferida, el hígado es dañado mediante una hepatectomía parcial.

El término “hepatectomía parcial” hace referencia a la extirpación de una parte del hígado. La extirpación puede deberse a la necesidad de eliminar una parte de tejido, un lóbulo completo, o una sección más grande del hígado, conjuntamente con parte del tejido sano como consecuencia de alguna afección.

5 La administración del medicamento puede realizarse antes de llevar a cabo una intervención quirúrgica dirigida a extirpar parte del hígado. El medicamento se administra, por ejemplo, 45 minutos antes de la extirpación (sin limitarse a este tiempo), puesto que la capacidad de inducción de los citados factores de transcripción implicados en hepato-
protección y regeneración hepática es mayor que cuando la PRL se suministra después de la hepatectomía parcial, aunque, en este último caso, también se obtienen inducciones superiores a los casos en los que no se administra PRL.

10 En otra realización preferida, la PRL según el principal aspecto o cualquiera de de las realizaciones de la presente invención es prolactina de ovino (oPRL). Es decir, la oPRL pertenece al género *Ovis* y más preferiblemente a la especie *Ovis aries*.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

Descripción de las figuras

25 Fig 1. Muestra cómo la actividad de unión de AP-1 y su constituyente c-Jun aumentan por la administración de PRL durante la regeneración hepática.

30 Ensayos de Retardo en gel de proteínas nucleares de ratas operadas “Sham” (S), regenerantes (R) o regenerantes con PRL (R+) se obtuvieron a distintos tiempos. A y C) Los complejos AP-1 retardados y superretardados por el anticuerpo de c-Jun, están indicados con flechas. B-D) La figura muestra la cuantificación de cinco experimentos diferentes ($p < 0.05$) y se representa como la media \pm SEM. Los datos de R y R+ fueron normalizados por los datos de S. E) Competición de concentraciones crecientes de sonda fría (no marcada) hasta excesos molares de 50 veces para la detección específica de AP-1.

35 Fig 2. Muestra cómo la actividad de unión de STAT-3 y su ARNm (ARN mensajero) aumentan por la administración de PRL durante la regeneración hepática.

40 A-B) Ensayos de Retardo en gel de proteínas nucleares como se muestra en la Fig. 1, utilizando los sitios de unión a STAT-3 y a STAT-5 conservados como oligonucleótidos, respectivamente. A y D) Los complejos de STAT-3 y de STAT-5 retardados están indicados con flechas. C) Fracciones de tejido de hígados de S, R o R+ fueron procesados para la extracción de RNA y se realizaron ensayos RT-PCR para STAT-3 normalizados por 28S. B-C) Los datos fueron cuantificados de cuatro experimentos diferentes, normalizados por datos de S y representados como la media \pm SEM ($p < 0.05$). D) Nota: STAT-5 no se induce por PRL en hígado regenerante.

45 Fig 3. Muestra cómo la actividad de unión de C/EBP- α tiende a aumentar por la administración de PRL durante la regeneración hepática.

50 Ensayos de Retardo en gel de proteínas nucleares como se muestra en la Fig. 1, utilizando un sitio de unión a C/EBP conservado como oligonucleótido. A, C-D) Los complejos C/EBP retardados y superretardados por los anticuerpos de C/EBP- α y C/EBP β , están indicados con flechas. B) Los datos fueron cuantificados de cuatro experimentos diferentes, normalizados por los datos de S y representados como la media \pm SEM. Se puede observar una tendencia hacia una mayor activación en R+ con respecto a R. C y D) C/EBP y C/EBP β : No aumentan con PRL en hígado regenerante.

55 Fig 4. Muestra cómo las actividades de unión de HNF-1, -4 y -3 se recuperan por la administración de PRL durante la regeneración hepática.

60 Ensayos de Retardo en gel de proteínas nucleares como se muestra en la Fig. 1, utilizando oligonucleótidos con sitios conservados de unión a HNF-1, -4 y -3, respectivamente. A, C, E y G). Los complejos retardados HNF-1, -4 y -3 están indicados con flechas. B, D, F y H). Los datos fueron cuantificados de cuatro experimentos diferentes, normalizados por los datos de S y representados como la media \pm SEM ($p < 0.05$). Los datos en A-D y G-H fueron obtenidos 5 h después de PHx, mientras que los datos en E-F fueron obtenidos 48 h después de la PHx.

Fig 5. Muestra cómo la administración de PRL durante la regeneración hepática acelera la proliferación de los hepatocitos.

65 A) Secciones de tejido de hígados de ratas S, R o R+ fueron teñidas para la detección inmunohistoquímica de MRP2 (localizado en la membrana canalicular del hepatocito) y se contratiñeron con hematoxilina. Magnificaciones originales X400. B) Las secciones hepáticas fueron teñidas para Ki-67 y contrateñidas con hematoxilina-eosina (células positivas: núcleos marrones). Nota: las células Ki-67 positivas en B corresponden a hepatocitos en A. C) Contaje

ES 2 342 705 A1

de hepatocitos positivos para Ki-67. En cada experimento se contaron 10 campos de aproximadamente 500 células por campo. Los datos se expresaron como el porcentaje de células positivas, se cuantificaron de cuatro experimentos diferentes y se representaron como la media \pm SEM ($p < 0.05$).

5 Fig 6. *Muestra cómo la administración de PRL induce la transcripción temprana de VEGF y HIF-1 α durante la regeneración hepática.*

Fracciones de tejido de hígados de S, R o R+ fueron procesados para la extracción de RNA, se realizaron ensayos de RT-PCR semi-cuantitativa y se normalizaron por 28S. Los niveles de ARNm de VEGF y HIF-1 α fueron normalizados por los datos del grupo de animales S.

Ejemplos

15 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen el uso de prolactina para la hepatoprotección y regeneración de células hepáticas.

Ejemplo 1

20 *Hepatectomía Parcial y administración de PRL*

Los experimentos fueron llevados a cabo mediante ratas hembras Wistar de 180-200 g. Estos animales fueron reproducidos y cuidados en el Gabinete Veterinario del CBMSO en condiciones estándar y de esterilidad. La cirugía se realizó en condiciones asépticas. La anestesia general se indujo y se mantuvo por inhalación con Isoflurane (Forane[®]) en un sistema semi-cerrado y calibrado. Cuando se finalizaron los experimentos, las ratas fueron sacrificadas en una cámara de CO₂. Toda la manipulación de los animales fue realizada según las recomendaciones de la UE para el cuidado y utilización de animales de experimentación (Directiva 86/609/EEC).

La resección parcial (PHx del inglés *Parcial Hepatoctomy*) de hígados de rata se realizó utilizando el método clásico descrito por Higgins y Anderson (Higgins *et al.*, (1931) Arch Pathol 12:186-202). Este implica la extracción simultánea de los lóbulos medio y lateral izquierdo sin dañar el resto de los lóbulos, que corresponde a dos terceras partes del órgano. A éstos animales se les denominó “regenerantes” (R), mientras que los animales control o “Sham” (S) fueron objeto de una laparotomía con exposición del hígado pero sin dañarlo. Al final del tiempo correspondiente de regeneración hepática los animales fueron sacrificados y sus hígados se extrajeron y procesaron para examinar las proteínas nucleares.

El proceso de regeneración de hígado y reparación se analizó a distintos tiempos entre la hepatectomía parcial y la extracción del órgano. Fueron considerados períodos de tiempo cortos (5-12 h) y largos (24-48 h). En cada ensayo un animal “Sham” y dos “regenerantes” se estudiaron con PRL ovina (oPRL). A todos los animales se les administró una solución salina oPRL intra peritoneal (i.p.) al mismo tiempo y cada ensayo se realizó al menos tres veces. El tratamiento con PRL i.p. 45 minutos antes de la cirugía a una concentración de 2 mg/kg de peso corporal (p.c.), resultó ser más eficiente que 1 h después de la cirugía. De hecho, aunque la oPRL es menos potente que la PRL de rata en la propia rata, su mayor estabilidad explica su amplio uso experimental. En otros estudios se administró oPRL i.p. a 2 mg/kg p.c./día durante 7 días (Taffetani *et al.*, (2007). *BMC Physiol* 7:6), intravenosa a 3 mg/kg p.c./día durante 7 días, o subcutánea de 0.7-3 mg/kg p.c. durante 4 días (Luquita *et al.*, (1999) *Drug Metab Dispos* 27:122-124), que resultó en niveles de plasma (750 ng/ml oPRL) situados en un rango fisiológico de PRL (200 a 700 ng/ml).

Ejemplo 2

50 *Extracción de proteínas nucleares de hígado*

El tejido hepático fue homogenizado a 4°C en 5 volúmenes de buffer I (0.3 M sacarosa [Merck]; 10 mM Tris HCl pH 7.5; 5 mM MgCl₂; 5 mM DTT; y 0.1% Tritón X-100 [Sigma]). El tejido procesado fue filtrado y centrifugado a 2.500 rpm durante 5 min a 4°C. Cada precipitado fue resuspendido en 10 ml de buffer I sin Tritón X-100, y se mezcló en un homogeneizador con 20 ml de buffer II (2.3 mM sacarosa, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 2 mM MgCl₂). El tejido procesado se decantó cuidadosamente sobre una capa de buffer II para generar un gradiente mediante centrifugación a 25,000 rpm durante 90 min. El precipitado nuclear fue resuspendido en 1 ml de buffer I sin X-100 y se centrifugó en un tubo eppendorf durante 2 min para determinar el volumen empaquetado nuclear (PNV). Los núcleos se resuspendieron en 1/4 de PNV de buffer bajo en sal (20 mM Hepes pH 7.9, 25% glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM KCl). A continuación, se añadió 1/4 del volumen PNV de buffer alto en sal (20 mM Hepes pH 7.9, 25% glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 M KCl), se mezcló durante 30 min a 4°C, y se centrifugó durante 15 min. Las proteínas nucleares se obtuvieron del sobrenadante y sus concentraciones se midieron por el método Bradford (Bio-Rad) y se conservaron a -70°C antes de su utilización.

65

Ejemplo 3

Unión de proteínas nucleares al ADN consenso

5 La unión de factores de transcripción a sus secuencias consenso de ADN se realizaron en un volumen final de 20 μ l de buffer de reacción: 10 mM Hepes pH 7.9, 30 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 4% glicerol, 0.1 mM PMSF y 0.5% Nonidet P-40, 0.1 μ g de Poly dl-dC (Boehringer Mannheim), 0.1 μ g ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ADN dss de las siglas en inglés *denatured salmon sperm*) y 10 μ g BSA. En cada reacción, fueron incubados 5 μ g de proteínas de extracto nuclear (NPE) con 0.15 ng de sonda de oligonucleótidos de doble cadena (en la tabla describen las secuencias). Estas secuencias están representadas por la cadena simple 5' a 3' (ADN molde) pero la sonda incluye también la cadena de ADN complementaria) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La sonda de ADN fue marcada durante 1 h a 37°C con γ ATP (con fosfato radioactivo) utilizando 1U de polinucleótido quinasa (Promega). Para probar la especificidad de cada sonda de ADN antes de los ensayos de unión, se realizaron ensayos de competición con el mismo NPE. El oligonucleótido compitió por la unión con concentraciones crecientes de oligonucleótido no-marcado hasta excesos molares de 100. La secuencia consenso mutada en tres pares de bases (MUT) que no une factores de transcripción específicos, se usó como control con el mismo NPE para probar la especificidad de la sonda de STAT-3. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 1.

TABLA 1

20 *Oligonucleótidos usados para geles de retardo (ver ejemplo siguiente). TTR: transtiretina*

25	AP-1	SEQ ID NO: 1	Santa Cruz® N° 2501
	C/EBP	SEQ ID NO: 2	SIDI
	HNF1	SEQ ID NO: 3	SIDI
30	HNF3	SEQ ID NO: 4	SIDI
	Sitio de unión al promotor TTR		
35	HNF4	SEQ ID NO: 5	SIDI
	STAT3 (Mutado)	SEQ ID NO: 6	Santa Cruz® N° 2535
40	STAT3 (SIE)	SEQ ID NO: 7	Santa Cruz® N° 2536
	STAT5	SEQ ID NO: 8	Santa Cruz® N° 2565
45	STAT5 (Mutado)	SEQ ID NO: 9	Santa Cruz® N° 2566

50 Las secuencias de los oligonucleótidos de la tabla anterior están constituidas por sitios consenso de los factores de transcripción donde hibridan.

Ejemplo 4

Ensayos de retardo en gel (EMSA)

60 Los complejos ADN-proteína fueron resueltos en geles de acrilamida 4% en buffer Tris-glicina. La unión específica de un factor de transcripción del NPE con su oligonucleótido marcado con ³²P[γ ATP] “retarda” la migración del complejo en los geles. Los anticuerpos específicos utilizados fueron los siguientes: anti c-Jun (H-79, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-STAT-3, C/EBP α y C/EBP β (sc61X y sc-150X Santa Cruz Biotechnology, Inc.), conejo anti-ratón (RAM; de las siglas en inglés *Rabbit Anti-Mouse*, IgG + IgM H+L: Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). Estos anticuerpos se utilizaron en las reacciones de unión, obteniendo el “superretardo” en la movilidad del oligonucleótido marcado. Los geles se secaron y se expusieron en películas autorradiográficas X-Omat (Eastman Kodak Co.) y se escanearon con un scanner *Molecular Dynamics* (Sunnyvale, CA). Los análisis densitométricos de los complejos retardados y superretardados se realizaron utilizando el programa *Image Gauge*.

ES 2 342 705 A1

Ejemplo 5

Ensayos Inmunohistoquímicos y de proliferación

5 Los tejidos de hígado fueron perfundidos y fijados con paraformaldehído al 4% y embebidos en parafina. Cortes de 5 μm fueron tratados con 0.3% de peróxido de hidrógeno durante 30 minutos y fueron sometidos a desmascaramiento de antígeno mediante autoclave en buffer 0.1 M citrato (pH 6.0) a 121°C durante 3 minutos. Los cortes fueron incubados 16 h con los distintos anticuerpos. Los hepatocitos fueron determinados con un marcador de la membrana canalicular hepática, MRP-2 (*Multidrug Resistance Protein-2*), utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-MRP-2 (clon M2III-6; *Chemicon International*, Temecula, CA, USA) a una dilución 1:20. El anticuerpo secundario fue peroxidasa de rábano (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). La reacción enzimática se desarrolló con 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (*Zymed Laboratories*, San Francisco, CA, USA). La proliferación se analizó con el marcador de proliferación Ki-67 usando el anticuerpo monoclonal SO (NeoMarkers) a una dilución 1/350. Las células Ki-67 positivas fueron contadas en 10 campos de aproximadamente 500 células por campo. La contraindicación se realizó con hematoxilina-eosina (Ki-67) o con hematoxilina sola (MRP-2).

Ejemplo 6

Transcripción Reversa y PCR cuantitativa

20 Fueron homogeneizados 200 mg de tejido de hígado en 5 ml del reactivo Ultraspec (Biotecx) y el ARN fue retrotranscrito a ADNc (ADN codificante) (Improm-II *reverse transcriptase*, Promega). Las reacciones de PCR se realizaron con *LC FastStart DNA master SYBR Green I* (Roche Applied Science, Barcelona, Spain) y con el sistema *Light Cycler* (Roche Applied Science). Los datos fueron analizados con el programa *Light Cycler 3.5.28* (Idaho Technology Inc., Utah, USA). Para cada muestra, el número de copias de los genes fue normalizado por la cantidad de ARNm ribosomal 28S. Los cebadores utilizados fueron: SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 (cebador directo y cebador reverso respectivamente) para 28S, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 (cebador directo y cebador reverso respectivamente) para STAT-3, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 (Cebador directo y cebador reverso respectivamente) para HIF-1 α y SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 (cebador directo y cebador reverso respectivamente) para VEGF. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 1 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1min a 56°C y 2 min a 72°C.

35 Los datos fueron analizados utilizando la Prueba-T con una significación estadística de $p < 0.05$ (*).

Ejemplo 7

La actividad de unión de AP-1 y c-Jun aumentó por la administración de PRL

40 En este ejemplo se ha estudiado el efecto de la PRL en la unión de AP-1 durante la regeneración hepática. No se observó ninguna diferencia significativa en la actividad de unión entre las ratas Sham y ratas Sham tratadas con PRL (datos no mostrados), por tanto, en cada experimento, la actividad de unión de cada factor de transcripción se analizó entre tres grupos de animales (Sham, S; Regenerantes; y Regenerantes tratados con PRL, R+), y los animales fueron sacrificados a distintos tiempos después de la PHx (5 h, 12 h, 24 h, 48 h). En los extractos nucleares de animales R+ había un aumento en la actividad de unión 5 h y 12 h después de PHx, cuando fueron comparados con extractos de animales control R y S (Fig 1A). La especificidad de esta actividad de unión AP-1 se demostró por una competición con una sonda no marcada en un exceso molar de 50 veces (Fig 1E). La cuantificación de los datos indicó que las diferencias observadas a 5 h y a 12 h eran significativas (Fig 1B $p < 0.05$), aunque 24 h o 48 h después de llevar a cabo la PHx la PRL no producía ningún efecto significativo en la actividad de unión de AP-1 (Fig 1A y no mostrado). Utilizamos un ensayo de superretardo para determinar si la composición de c-Jun del complejo AP-1 se alteraba. Un aumento de c-Jun fue detectado en respuesta al tratamiento con PRL, sobre el ya aumentado contenido de c-Jun en animales R (Fig 1C-D, $p < 0.05$). Estos resultados indican que la PRL dispara un aumento rápido y significativo en la actividad de unión del factor de transcripción AP-1 sugiriendo que la PRL ejerce una influencia, directa o indirecta, en la proliferación del hígado.

Ejemplo 8

La PRL moduló el complejo de transcripción STAT-3 y su ARNm durante la regeneración hepática

60 Los inventores se plantearon si la PRL modulaba STAT-3 en el hígado en lugar de la vía canónica que provoca la activación de STAT-5, o si la PRL afectaba a ambos. Cuando se analizó la actividad de estos factores de transcripción en los mismos grupos de animales descritos, la PRL aumentaba significativamente la actividad de unión de STAT-3 a corto plazo de tiempo (Fig 2A y B, $p < 0.05$). Al igual que en el caso anterior, la especificidad de la actividad de unión de STAT-3 fue demostrada utilizando una sonda no marcada en un exceso molar de 50 veces (datos no mostrados). Se observó que la administración de PRL causaba un aumento significativo en los niveles de ARNm de STAT-3 después de 5 h desde la PHx (Fig 2C, $p < 0.05$). Contrariamente, cuando el efecto de la PRL se analizó en la actividad de unión

ES 2 342 705 A1

de STAT-5, no se detectó ninguna alteración significativa a los tiempos estudiados (Fig 2D). Por tanto, la PRL potenció la actividad de unión de AP-1 y de STAT-3 a tiempos cortos de regeneración hepática, pero no activó STAT-5.

5 Ejemplo 9

La PRL aumentó la actividad de unión de C/EBP α durante la regeneración del hígado

10 La familia de factores de transcripción C/EBP está implicada en la homeostasis energética del hígado. Cuando el efecto de la PRL fue analizado en la actividad de unión de C/EBP, no se observó ninguna diferencia significativa a los tiempos examinados (Fig 3C). Sin embargo, la PRL regulaba la composición de las subunidades del complejo retardado; C/EBP α tendía a aumentar a corto plazo de regeneración mientras que C/EBP β se mantenía constante (Fig 3A-B, D).

15 Ejemplo 10

La PRL y los factores de transcripción específicos de hígado

20 A continuación se averiguó si la administración de PRL regulaba, directa o indirectamente, genes hepáticos críticos para la función del hígado mediante la determinación de la actividad de unión de HNF-1, -3 y -4. Se observó una disminución en la actividad de unión de HNF-1 y HNF-4, asociados con la regeneración hepática, 5h después de llevar a cabo la PHx, aunque curiosamente, la PRL preservó la actividad de estos factores (Fig 4A-D). Para HNF-3 se observó un patrón similar a tiempos más largos (Fig 4E y F), mientras que a tiempos cortos la PRL solo lo inducía ligeramente (Fig 4G y H). Estos datos indicaron que la administración de PRL jugaba un papel protector manteniendo la función hepática a través de c/EBP α y de los factores HNF, y al mismo tiempo estimulando la proliferación del hígado mediante AP-1 y STAT-3.

30 Ejemplo 11

La PRL aceleró la proliferación de hepatocitos durante la regeneración hepática

35 Para confirmar si la administración de PRL aceleraba la proliferación hepática después de 5 h de haber llevado a cabo la PHx, se analizó la presencia de Ki-67 en secciones de hígado de los tres grupos de animales ya descritos. La PRL producía un aumento significativo de células positivas para Ki-67 (Fig 5B-C). Estas células se correspondían con las teñidas con el marcador de hepatocitos MRP-2, un marcador de la membrana canalicular del hepatocito (Fig 5A). De manera consistente, la tinción con el anticuerpo anti-MRP-2 mostraba una red canalicular más expandida en los animales regenerantes tratados con PRL que en los animales regenerantes. En conjunto, estos datos confirmaron que la PRL es un nuevo miembro de la familia de las citoquinas hematopoiéticas que aceleran la regeneración hepática.

Ejemplo 12

45 *Papel hepatoprotector de la PRL*

Es conocido que la resección hepática induce una respuesta angiogénica y de supervivencia celular en el resto del hígado, a través de un aumento elevado de la expresión de HIF-1 α y de VEGF (Maeno *et al.* (2005). *Liver Int.* 25:1002-1009). Por ello, se analizó si la administración de PRL causaba que la expresión de estos genes aumentara después de 5 h desde la PHx. Como se puede observar (Fig 6), la PRL estimulaba significativamente los niveles de ARNm de VEGF y HIF-1 α en comparación con hígados regenerantes no tratados. Estos datos corroboraron el papel hepatoprotector de la PRL durante la regeneración hepática.

55

60

65

ES 2 342 705 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende prolactina para la elaboración de un medicamento hepatoprotector y/o regenerador de células hepáticas, en los trasplantes de hígado, en mamíferos.
2. Uso según la reivindicación 1 que incluye excipientes farmacológicamente aceptables.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde las células hepáticas proceden de un hígado transplantado, de un hígado donante o de un hígado dañado.
4. Uso según la reivindicación 3 donde el hígado es dañado mediante una hepatectomía parcial.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la prolactina es prolactina de ovino (oPRL).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

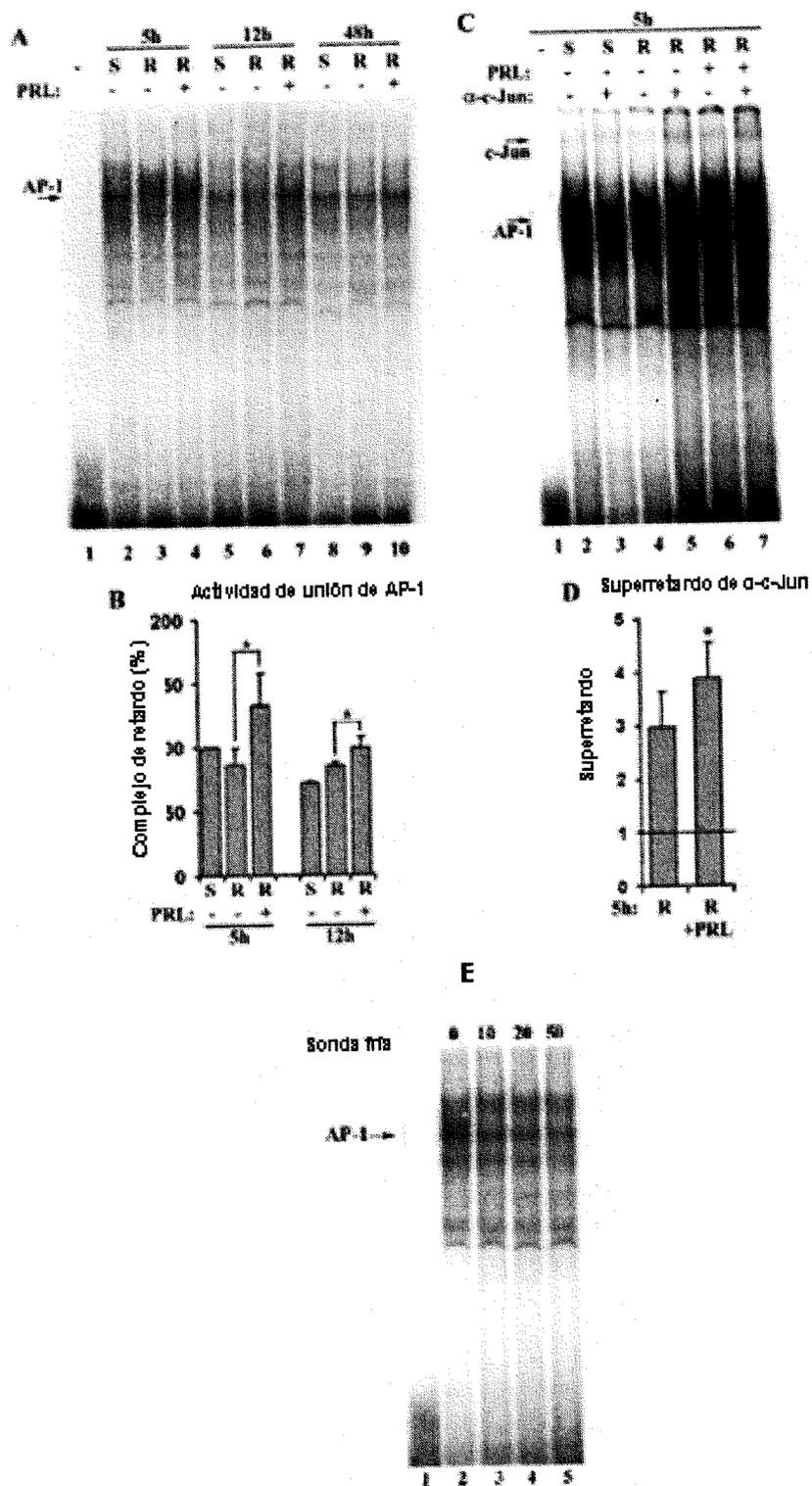


FIG. 1

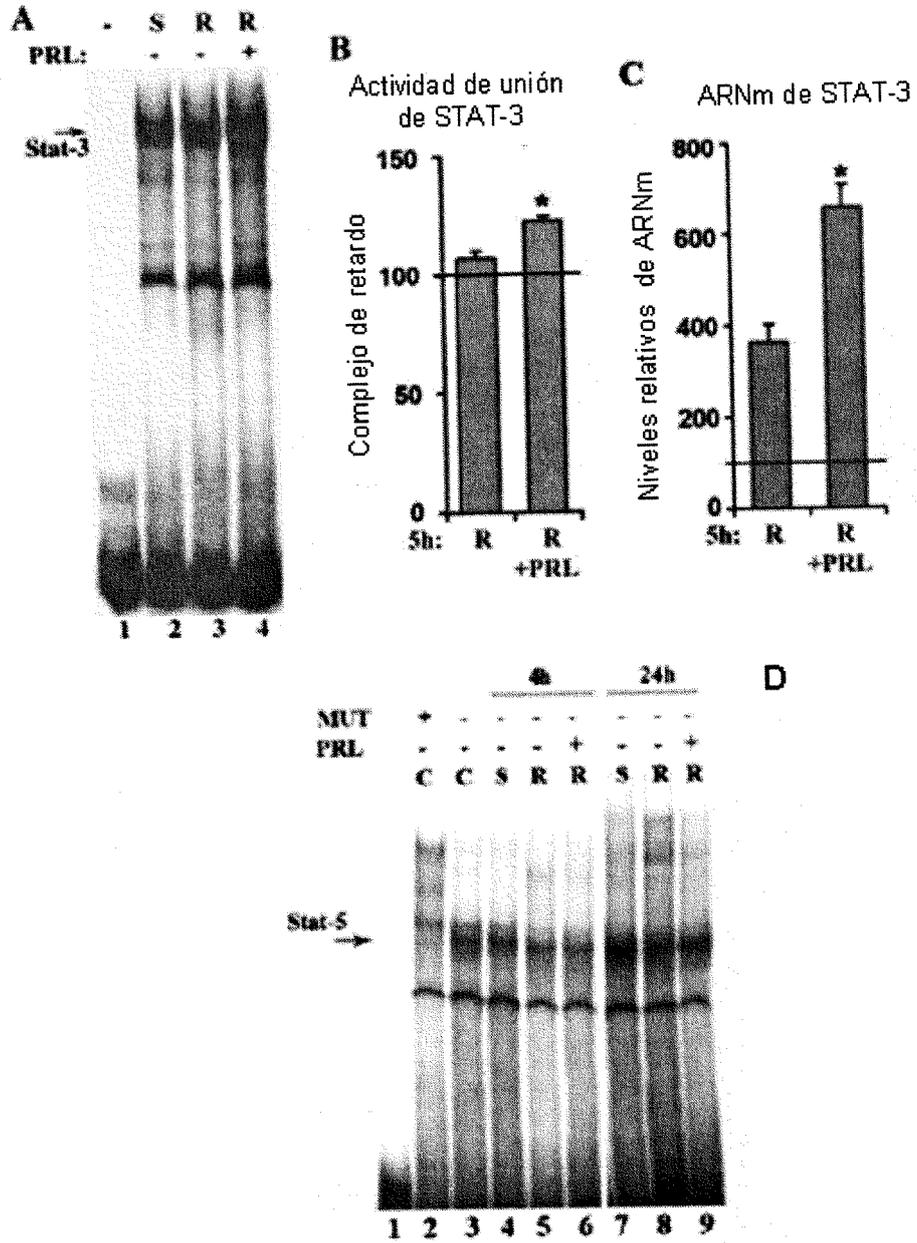


FIG. 2

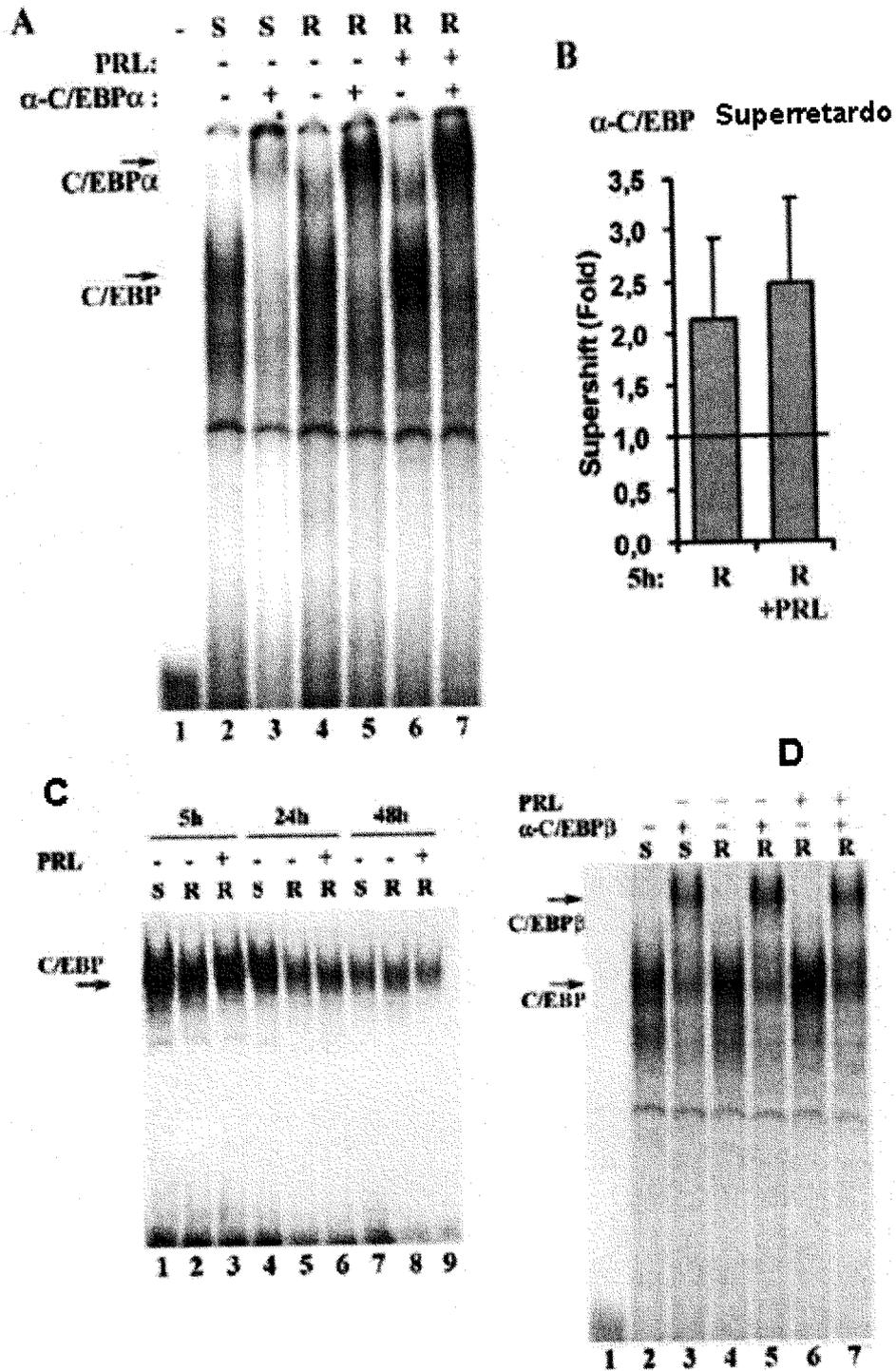


FIG. 3

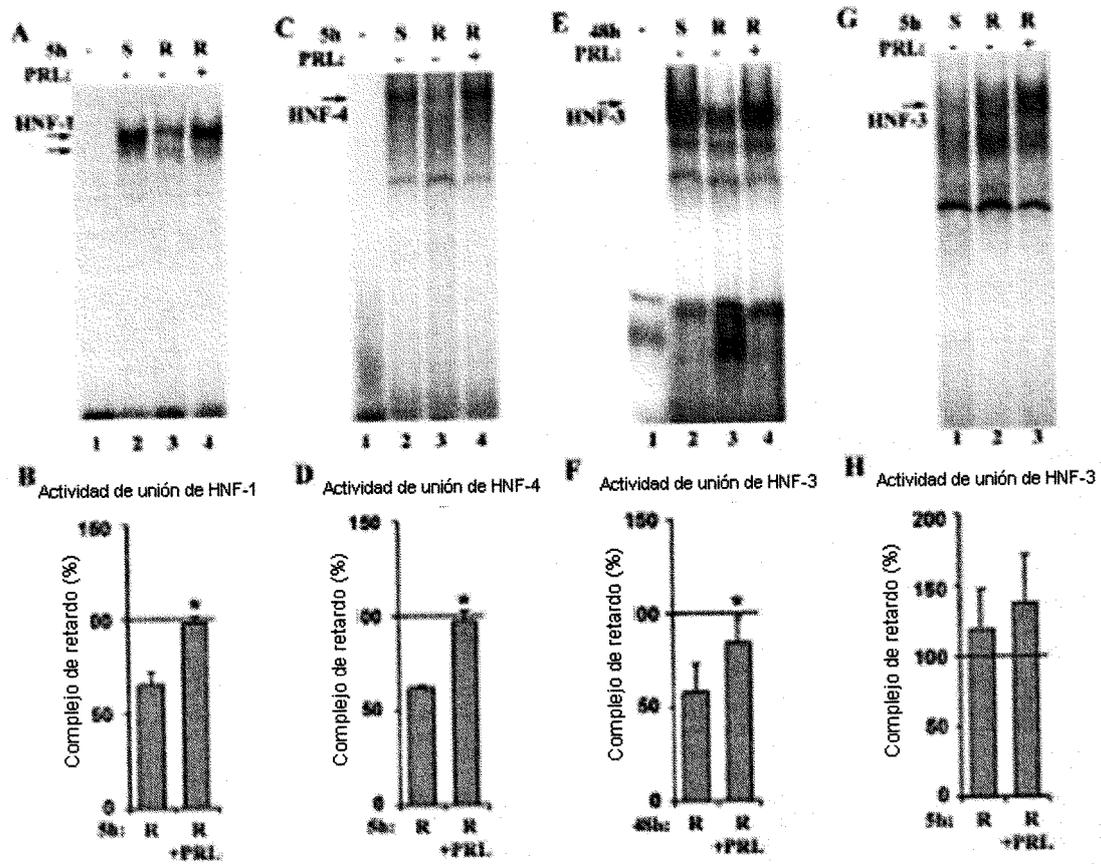


FIG. 4

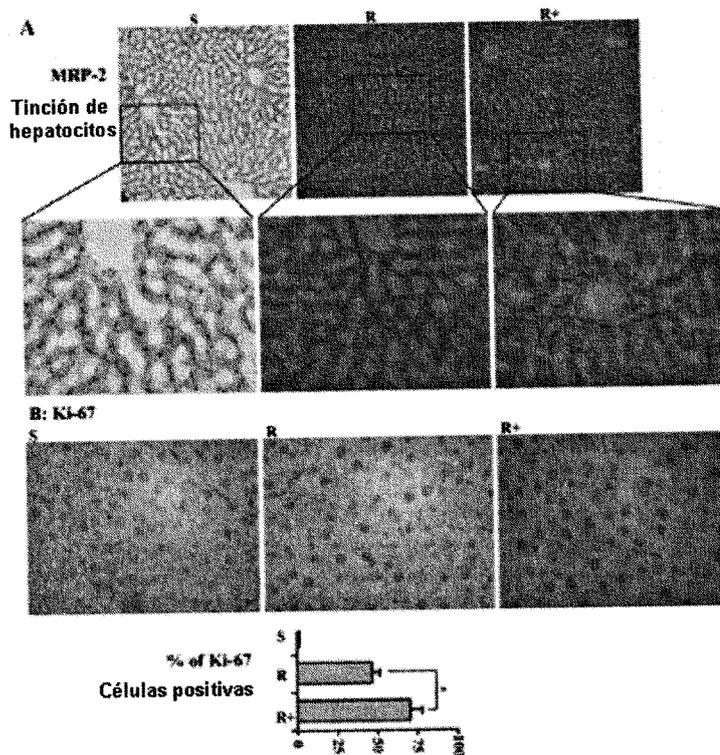


FIG. 5

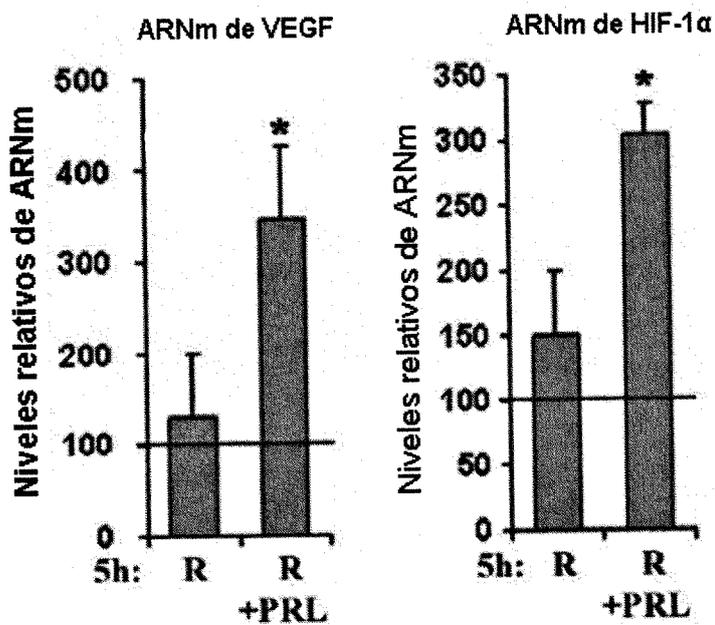


FIG. 6

ES 2 342 705 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad Autónoma de Madrid
- 5 <120> Uso de prolactina como hepatoprotector y/o regenerador de células hepáticas en mamíferos
- <130> 1595.16
- 10 <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> *Mus musculus*
- 20 <400> 1
cgcttgatga ctcagccgga a
21
- 25 <210> 2
<211> 22
<212> DNA
- 30 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 2
- 35 **ggatgattt tgtaatgggg ta**
22
- <210> 3
- 40 <211> 20
<212> DNA
<213> *Rattus norvegicus*
- 45 <400> 3
tgtaggtaat gatctacagt
20
- 50 <210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> *Rattus norvegicus*
- 55 <400> 4
gttgactaag tcaataatca gaatcag
27
- 60 <210> 5
<211> 21
<212> DNA
- 65 <213> *Rattus norvegicus*

ES 2 342 705 A1

<400> 5

gcaggtgacc tttgccagc g
21

5

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

10 <213> *Mus musculus*

<400> 6

gtgcatccac cgtaaacttt gtctaca
27

15

<210> 7

<211> 27

20 <212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 7

25

gtgcatttcc cgtaaacttt gtctaca
27

<210> 8

30

<211> 21

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

35

<400> 8

agatttctag gaattcaatc c
21

40

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

45 <213> *Mus musculus*

<400> 9

agatttagtt taattcaatc c
21

50

<210> 10

<211> 18

55 <212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 10

60

cagtacgaat acagaccg
18

<210> 11

65

<211> 19

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

ES 2 342 705 A1

<400> 11
ggcaacaaca catcatcag
19
5
<210> 12
<211> 17
<212> DNA
10 <213> *Mus musculus*

<400> 12
gccaatgctg gaggaga
15 17
<210> 13
<211> 17
<212> DNA
20 <213> *Mus musculus*

<400> 13
25 accagcaacc tgacttt
17
<210> 14
<211> 22
30 <212> DNA
<213> *Mus musculus*

<400> 14
35 gtttactaaa ggacaagtca cc
22
<210> 15
40 <211> 19
<212> DNA
<213> *Mus musculus*

45 <400> 15
ttctgtttct tgaagggag
19
50
<210> 16
<211> 16
<212> DNA
55 <213> *Mus musculus*

<400> 16
60 tgccaagtgg tcccag
16
<210> 17
<211> 16
65 <212> DNA
<213> *Mus musculus*

ES 2 342 705 A1

<400> 17

gtgaggtcctt gatccg
16

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 705

② Nº de solicitud: 200803218

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.11.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 38/22** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BUCKLEY, A.R. et al., "Prolactin as a hepatotrophic hormone.", TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, 1988, Vol. 20, No. 1, Suppl. 1, páginas 706-709, ISSN 0041-1345, Resultados.	1-5
X	BUCKLEY, A.R. et al., "Prolactin as a mammalian mitogen and tumor promoter.", ADVANCES IN ENZYME REGULATION, 1988, Vol. 27, páginas 371-392, ISSN 0065-2571, Resultados y Discusión.	1-5
X	BUCKLEY, A.R. et al., "Prolactin administration stimulates rat hepatic DNA synthesis.", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1986, Vol. 138, No. 3, páginas 1138-1145, ISSN 0006-291X, Resultados y Discusión.	1-5
A	BUCKLEY, A.R. et al., "Prolactin-provoked alterations of cytosolic, membrane, and nuclear protein kinase C following partial hepatectomy.", DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, 1991, Vol. 36, No. 9, páginas 1313-1319, ISSN 0163-2116, todo el documento.	1-5
A	KAHN, D. et al., "Does hyperprolactinemia affect hepatic regeneration independent of sex steroids?", JOURNAL OF LABORATORY AND CLINICAL MEDICINE, 1988, Vol. 112, No. 5, páginas 644-651, todo el documento.	1-5
A	VAN THIEL, D.H. et al., "Hepatic regeneration. Effects of age, sex hormone status, prolactin, and cyclosporine.", DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, 1991, Vol. 36, No. 9, páginas 1309-1312, ISSN 0163-2116, todo el documento.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 28.06.2010	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/4
---	--	----------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-5	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-5	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Buckley, A.R. et al., Transplant. Proc. (1988), 20(1 Sup.1): 706-9.	1988
D02	Buckley, A.R. et al., Adv. Enzyme Regul., (1988), 27: 371-91.	1988
D03	Buckley, A.R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1986), 138(3): 1138-45.	1986
D04	Buckley, A.R. et al., Dig. Dis. Sci., (1991), 36(9): 1313-9.	1991
D05	Kahn, D. et al., J. Lab. Clin. Med., (1988), 112(5): 644-51.	1988
D06	Van Thiel, D.H. et al., Dig. Dis. Sci., (1991), 36(9): 1309-12.	1991

Observaciones sobre documentos:

D1-D5 se describe la prolactina como una hormona vinculada al proceso de proliferación y regeneración de las células hepáticas en mamíferos.

D4 revisa los factores que inician y regulan la regeneración hepática.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes)..

1.1. Reivindicación 1.

En los documentos D1-D3 se describe la actividad de la hormona prolactina relacionada con la estimulación del proceso de proliferación y regeneración de las células hepáticas en mamíferos. En particular, la administración de prolactina induce la expresión del ADN y de diferentes marcadores bioquímicos relacionados con el ciclo celular de células hepáticas (cf. D1: Resultados. D2: Resultados y Discusión. D3: Resultados).

El objeto de la reivindicación independiente 1 consiste en el uso una composición que comprende prolactina para la elaboración de un medicamento hepatoprotector y/o regenerador de células hepáticas. Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 se considera que no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base de los documentos D1-D3.

Según lo expuesto anteriormente, el objeto de las reivindicaciones dependientes 2-5 también se considera que no es nuevo ni tiene actividad inventiva.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-5 no es nuevo ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes, respectivamente.