

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 552**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2007 E 07766817 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **08.04.2009 EP 2043678**

54 Título: **Caspasa-8 e inflamación, infección y curación de heridas**

30 Prioridad:

28.06.2006 IL 17660506

31.01.2007 IL 18109407

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

13.02.2013

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LIMITED (50.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL y
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND
DEVELOPMENT LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WALLACH, DAVID;
ABRAMOVITCH, RINAT;
GALUN, EITAN;
BEN MOSHE, TEHILA y
BARASH, HILA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 395 552 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Caspasa-8 e inflamación, infección y curación de heridas.

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere al papel regulador de la caspasa-8 en la infección por patógeno intracelular, inflamación y curación de heridas.

Antecedentes de la Invención

10 La familia de la caspasa de las cisteína proteasas principalmente se conoce por su papel crucial en la inducción de la apoptosis en células animales (Shi et al., 2002). Algunas de las caspasas, caracterizadas por una región "prodominio" localizada en dirección 5' ("upstream") del resto proteolítico, cumplen un papel de iniciación en la apoptosis. Llegan a estar activas tras la unión de sus prodominios a los receptores que inducen la muerte o a proteínas adaptadoras asociadas con tales receptores, y una vez activadas escinden otros miembros de la familia de la caspasa, de ese modo activándolos. La caspasa-8 (previamente conocida como MACH/FLICE/Mch4) es una caspasa iniciadora activada dentro de los complejos de señalización de los receptores de la familia TNF/NGF, a la cual es reclutada mediante la unión de su prodominio a una proteína adaptadora denominada dominio de muerte asociado a Fas (FADD, del Inglés "Fas-Associated Death Domain"; también denominada MORT1)(Boldin et al., 15 1996, Muzio et al., 1996, y Wallach et al., 1999). La activación de la caspasa-8 constituye un evento de iniciación crucial en el mecanismo de muerte apoptótica inducido por estos receptores (la ruta de muerte celular extrínseca) (Varfolomeev et al., 1998). Tanto la caspasa-8 como la FADD también contribuyen, mediante mecanismos hasta ahora desconocidos, a diversos procesos celulares no apoptóticos (por ejemplo, véase Varfolomeev et al., 1998, Zhag et al., 1998, Walsh et al., 1998, Newton et al., 1998, Alam et al., 1999, Kennedy et al., 1999, Chun et al., 2002, Sakamaki et al., 2002, Salmena et al., 2003, Kang et al., 2004, Su et al., 2005 y Beisner et al., 2005)

Aunque el funcionamiento *in vivo* de la caspasa-8 ha sido explorado usando un número de modelos de ratón transgénico (Varfolomeev et al., 1998, Salmena et al., 2003, Kang et al., 2004, y Beisner et al., 2005), aún se conoce muy poco sobre la significancia fisiológica o patofisiológica de la enzima.

25 En un aspecto, la invención se refiere al uso de al menos un agente seleccionado entre: (i) caspasa-8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal de los mismos; (ii) un agente capaz de regular por aumento el nivel y/o la actividad de caspasa-8; y (iii) un inhibidor de un inhibidor natural del nivel y/o la actividad de caspasa-8, en la producción de un medicamento para prevenir y/o tratar la inflamación del hígado de acuerdo con las reivindicaciones.

30 La inflamación se desarrolló después del daño del hígado, lo cual puede estar causada por resección de dicho tejido u órgano.

En otra realización adicional el nivel y/o la actividad de caspasa-8 se regula/regulan por disminución en hepatocitos.

35 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de al menos un agente seleccionado entre: (i) caspasa-8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal de los mismos; (ii) un agente capaz de regular por aumento el nivel y/o la actividad de caspasa-8; y (iii) un inhibidor de un inhibidor natural del nivel y/o la actividad de caspasa-8, en la producción de un medicamento para tratar una infección causada por un patógeno intracelular tal como lo reivindicado.

El patógeno intracelular se selecciona entre: *Mycobacteria*, *Listeria*, *Leishmania*, *Legionella* y *Salmonella*.

40 En una realización adicional de la invención la infección se desarrolla en el hígado que comprende células en las cuales el nivel y/o la actividad de caspasa-8 están regulados por disminución.

La infección se desarrolla en el hígado.

En una realización aún más adicional de la invención las células en las cuales el nivel y/o la actividad de caspasa-8 son hepatocitos están reguladas por disminución.

45 En una realización aún más adicional de la invención la infección está causada por *Listeria*, por ejemplo, por *Listeria monocytogenes*.

En ciertas realizaciones de la invención, el inhibidor de caspasa-8 incluye, pero no se limita a, un ARNm antisentido, ARN de interferencia pequeño, un anticuerpo específico a caspasa-8 y una molécula pequeña inhibidora.

En una realización adicional de la invención, la molécula inhibidora es una pequeña molécula que tiene un peso molecular de 100 a 5.000 daltons, tal como Z-IETD-FMK.

En una realización de la invención, el daño se desarrolla después de la resección del hígado.

En una realización adicional de la invención, se sometió a resección 1/3 del hígado.

En otra realización adicional de la invención, se sometió a resección 2/3 del hígado.

5 En otra realización adicional de la invención, el inhibidor de caspasa-8 se selecciona entre un ARNm antisentido específico a caspasa-8, ARN de interferencia pequeño específico a caspasa-8, anticuerpo anti caspasa-8 y una molécula pequeña inhibidora de caspasa-8.

En otra realización adicional de la invención, la molécula pequeña inhibidora tiene un peso molecular de 100 a 5.000 daltons.

En otra realización adicional de la invención, la molécula pequeña inhibidora es Z-IETD-FMK.

10 En otra realización adicional de la invención, el inhibidor de la inflamación es un agente capaz de inhibir células inmunes, tales como macrófagos, por ejemplo, células de Kupffer.

En otra realización adicional de la invención, el inhibidor de la inflamación se administra después del inhibidor de caspasa-8.

15 En otra realización adicional de la invención, el inhibidor de la inflamación se administra en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 días después de la resección del hígado.

En otra realización adicional de la invención, el inhibidor de la inflamación comprende cloruro de gadolinio.

Breve descripción de las figuras

20 **Figs. 1A-1I** muestran el efecto de la deficiencia de caspasa-8 en hepatocitos sobre la infección con *Listeria monocytogenes*. En todas las figuras, las barras negras representan ratones *Casp8^{F/+}: Alb-Cre* (con hepatocitos normales) y las barras vacías representan ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* (con hepatocitos deficientes en caspasa-8). (A-C) Organismos de *Listeria* viables recuperados a partir de bazo e hígados después de la infección subletal a 24 horas (A), 6 días (B) y 14 días (C) después de la infección. Cada grupo de ratones F/+ o F/- a cada punto de tiempo comprendió al menos cinco ratones. (D-I) Análisis histológico de secciones de hígado de ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* y *Casp8^{F/+}: Alb-Cre* 6 y 14 días después de la infección con *Listeria*. (D,E) Tinción con H&E de hígados 6 días después de la infección, demostrando la acumulación de leucocitos en los hígados de ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* (flechas). (F, G) A 14 días después de la infección los hígados de ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* (G) presentan grandes lesiones necróticas, mientras que los hígados control parecen normales. (F) Aumento (x200) de D a G. (H, I) Inmuntinción con anti-Ki67 de hígados 14 días después de la infección, demostrando grandes números de proliferación de hepatocitos en hígados de *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* pero no en *Casp8^{F/+}: Alb-Cre* (I; núcleos teñidos de marrón). Aumento: x100.

35 **Figs. 2A-2E** muestran el efecto de la deficiencia de caspasa-8 en hepatocitos sobre la recuperación de PHx: un descenso en la repuesta de crecimiento temprana. (A) Inmuntinción con anti-Ki67 (núcleos teñidos de marrón) del hígado en fases tempranas (día 2) y tardías (día 14) después de PHx. Aumento: x100. (B, C) Proliferación de hepatocito en diversos puntos de tiempo después de 1/3 (B) y 2/3 de PHx (C), cuantificada al determinar el número de hepatocitos teñidos con anticuerpos frente a Ki67 (o BrdU; recuadro), tal como se muestra en A, contado en 10 campos de gran aumento. *P<0,05, **P<0,01. Al menos se ensayaron ocho ratones a cada punto de tiempo en cuatro experimentos independientes. (D) Cantidades de diversas proteínas asociadas a la transición G1/S (ciclina A, ciclina E, proteína de retinoblastoma fosforilada) en el hígado a diferentes puntos de tiempo después de 1/3 de PHx (panel izquierdo), 2/3 de PHx (panel derecho). Se muestran los resultados representativos de los ensayos llevados a cabo en al menos cuatro ratones a cada punto de tiempo. (E) Panel superior, inmuntinción con anticiclina D1 2 días después de 1/3 de PHx. Aumento: x400. Panel inferior, cuantificación del incremento en ciclina D1, 2 y 4 días después de 1/3 de PHx, determinado mediante el recuento de hepatocitos teñidos (tal como se muestra en el panel superior) con anticuerpo anti ciclina D1 en 15 campos de gran aumento.

45 **Figs. 3A-3E** muestran el efecto de la deficiencia de caspasa-8 en los hepatocitos sobre la recuperación de PHx: efectos diferenciales sobre la recuperación de volumen en el sitio de la lesión y en el resto del tejido del hígado, tal como se evaluó mediante el escaneado por MRI secuencial y análisis histológicos. (A, B) Imágenes de eco de espín potenciado en T1 axiales representativas de hígados, adquiridas en el día 4 post-PHx. (A) Imagen representativa del hígado de un ratón *Casp8^{F/+}: Alb-Cre*. La línea discontinua traza el área isquémica. (B) Imagen representativa de hígado de un ratón *Casp8^{F/-}: Alb-Cre*. Las flechas en el punto A y B al material de sutura. (C) Volumen del área isquémica expresado como porcentaje del volumen de hígado pre-PHx a diferentes tiempos después de PHx, demostrando un descenso más rápido en el tamaño del sitio de la lesión en los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* que en los controles. Al menos se examinaron ocho ratones en cada grupo a cada punto de tiempo. (D) Volumen de hígado post-PHx expresado como porcentaje (media±SD) del pre-PHx en los ratones *Casp8^{F/+}: Alb-Cre* (■) y *Casp8^{F/-}: Alb-*

Cre (O), valorado por escáneres MRI coronales y axiales, demostrando un incremento de tamaño más rápido y tamaño anormalmente grande del hígado en los ratones deficientes en caspasa-8. *P<0,05, **P<0,01. Al menos se examinaron ocho ratones por grupo en los puntos de tiempo más tempranos (días 1-4) y al menos cuatro ratones por grupo en los puntos de tiempo más tardíos. (E) Muestra los análisis histológicos del área isquémica de un hígado de ratón 2 días después de PHx. Panel superior-sección teñida con H&E del área isquémica del hígado de ratón *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* 2 días después de PHx. En el área de la cirugía hay un gran foco de células fantasmas y necrosis [N] del parénquima hepático. El material de sutura [S] se ve dentro del área necrótica. El parénquima necrótico está rodeado por un borde de leucocitos de infiltración [I]. Panel inferior, izquierdo-tinción TUNEL del área mostrada en el recuadro a partir del panel superior, demostrando la apoptosis masiva encontrada en esta área (tinción). Por encima de esta región son células muertas y fantasmas (no tinción), mientras que por debajo hay células vivas (con núcleos teñidos con DAPI). Panel inferior, derecho- inmunotinción con anti caspasa-3 activa de hepatocitos localizados en el borde del parénquima hepático herido. Tanto el citoplasma como los núcleos están teñidos. Aumento: panel superior x20; panel inferior, izquierdo x100; panel inferior, derecho x400.

Figs. 4A-4B muestran el efecto de la deficiencia de caspasa-8 en hepatocitos sobre la recuperación de PHx: perfusión temprana y cambios hemodinámicos. Los cambios hemodinámicos en el hígado durante la regeneración se valoraron mediante MRI funcional. Los escáneres de MRI se adquirieron después de PHx y 4 días más tarde (n=4 por grupo a cada punto de tiempo). (A) Imágenes de MRI representativas, mapas ΔSo_2 y ΔScO_2 . Filas superiores, pre-PHx; filas inferiores, 4 días post-PHx. Columna inferior, imágenes de eco de espín potenciado en T1 (SE); columna del medio, mapas ΔSo_2 ; columna derecha, mapas ΔScO_2 . Barra=1 cm. Los valores son como los indicados en la barra de color. (B) Valores medios \pm SD de ΔSo_2 y ΔScO_2 en ratones *Casp8^{F/+}: Alb-Cre* (barras negras) y en *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* (barras vacías) *P<0,02.

Figs. 5A-5C muestran el efecto de la deficiencia de caspasa-8 en hepatocitos sobre la recuperación de PHx: inflamación persistente y crecimiento de hepatocito. (A) Inmunotinción F4/80 de hígados 4 días y 6 días post-PHx. Aumento: x400. (B) Tinción con H&E e inmunotinción con anticuerpos anti-Ki67 y anti-F4/80 14 días después de PHx de un hígado normal (F/+, superior), un hígado deficiente en caspasa-8 (F/-, del medio, mostrando diferentes regiones en el mismo hígado), y un hígado deficiente en caspasa-8 en un ratón tratado con cloruro de gadolinio (GdCl, inferior), tal como se describe en "Materiales y Métodos". Aumento de la tinción con H&E, x400; de la inmunotinción con anticuerpo anti-Ki67, x200; y de la inmunotinción con anticuerpo anti-F4/80, x100. (C) Panel superior, análisis de transferencia tipo Western de fosforilación de STAT-3 en el hígado 14 días después de PHx. Panel inferior, inmunotinción p-STAT 3 del hígado en los tiempos indicados después de PHx. Aumento: en los paneles principales, x200; en los recuadros, x400. Flechas negras, macrófagos, flechas blancas, hepatocitos.

Figs. 6A-6B muestran que el incremento en la proliferación de los hepatocitos deficientes en caspasa-8 en una fase tardía post-PHx es secundario a la inflamación. (A) El efecto del tratamiento con cloruro de gadolinio sobre el volumen de los hígados en el 14º día después de PHx, valorados por los escáneres de MRI, y (B) sobre la proliferación de hepatocito en ese tiempo, valorados por tinción con anticuerpos anti Ki67 y recontando los núcleos teñidos en 10 campos de gran aumento. Al menos se ensayaron cuatro ratones en cada grupo. *P<0,05; **P<0,01.

Descripción detallada de las realizaciones

Se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que la caspasa-8 tiene un papel regulador en la infección del hígado por patógeno intracelular, la inflamación y la curación. Por lo tanto, la presente invención se refiere a la regulación del nivel y/o la actividad de caspasa-8 para tratar la infección causada por un patógeno intracelular, tratar la inflamación y facilitar la curación de las heridas.

La invención está basada en los descubrimientos obtenidos en la presente memoria mientras explora el efecto de la delección de la caspasa-8 en hepatocitos sobre las funciones del hígado. Se encontró de acuerdo con la invención que: la delección de la caspasa-8 en hepatocitos compromete la resistencia de los ratones a la infección por el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*; que la hepatectomía parcial (PHx) está acompañada por el inicio de un estado inflamatorio crónico en ausencia de caspasa-8 en hepatocitos; y que la ausencia de la caspasa-8 en los hepatocitos promueve la rápida curación de una lesión en el hígado.

El comportamiento del hígado humano dañado se podría imitar mediante un modelo animal experimental relevante, que consiste en hepatectomía parcial (PHx) de ratones mediante extirpación del lóbulo medio del hígado (30% de PHx) o mediante escisión de los lóbulos superiores medio, izquierdo y derecho (70% de PHx), tal como se describe en la sección "Ejemplos". Se ha encontrado de acuerdo con la invención, usando el modelo de PHx que la ausencia de caspasa-8 en los hepatocitos afectaba, de varias formas, a la regeneración del hígado después del daño del hígado. Por ejemplo, la curación de la lesión en PHx se dio más rápidamente en ausencia de caspasa-8. El mejoramiento en la curación de la lesión se observa poco después de la inducción del daño, aproximadamente dos y cuatro días después de PHx. En vista de estos descubrimientos, un aspecto de esta revelación se refiere a la inhibición de la actividad y/o el nivel de la caspasa-8 para promover o facilitar la curación de una lesión, daño o herida de un órgano o tejido. En una realización, la revelación se refiere al mejoramiento de la recuperación de las lesiones isquémicas mediante la inhibición de la actividad y/o el nivel de caspasa-8. En particular, la relevación se refiere al uso de un inhibidor del nivel y/o la actividad de la caspasa-8 para facilitar o acelerar la curación un tejido u

órgano herido o dañado. La herida o daño puede estar causada por un trauma físico incluyendo pero no limitado a una operación quirúrgica, bocado, accidente deportivo, accidente, resección de tejido u órgano y amputación.

5 El inhibidor de caspasa-8 se puede usar en métodos quirúrgicos antes, durante o después de la resección del órgano o tejido. La inhibición post-operativa del tratamiento con caspasa-8 puede tener un efecto beneficioso sobre la curación de las lesiones post-operativas en el hígado.

La revelación contempla el uso de un inhibidor de caspasa-8 antes, durante y/o después de la resección del tejido para acelerar y/o facilitar la curación. En una realización de la revelación la inhibición de caspasa-8 se lleva a cabo antes de la resección del tejido.

10 De acuerdo con la presente revelación, un efecto beneficioso de la inhibición de la caspasa-8 sobre la curación de la herida se detectó pronto, unos pocos días después del daño causado por hepatectomía parcial, antes del inicio de la inflamación (Fig. 3D). Por lo tanto, se puede administrar de manera ventajosa un inhibidor de caspasa-8 durante un corto periodo de tiempo antes, durante o después de la resección del daño y/u órgano. Por ejemplo, un inhibidor de caspasa-8 se puede aplicar durante varias horas a aproximadamente 1, 2, 3 días y no más de 4 días para facilitar la curación de la herida. El inhibidor de caspasa-8 se puede usar durante 10 a 60 minutos, no menos de 10, 20, 30 ó
15 45 minutos, o durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó hasta 24 horas para incrementar la curación de la herida.

20 Se ha encontrado de acuerdo con la presente revelación que la inyección de cloruro de gadolinio (GdCl), el cual interfiere con la función de las células de Kupffer e induce su eliminación, dio como resultado la detención de la proliferación de hepatocito retrasada y la prevención de la hematomegalia que se da en ausencia prologada de caspasa-8 en hepatocitos. Esta detención de la proliferación de hepatocito retrasada es particularmente sorprendente en vista del hecho de que la proliferación de hepatocito facilitada poco después de PHx no desciende, más bien se aumenta mediante el tratamiento con GdCl. Por tanto, para tratamiento más prolongado de tejido dañado con inhibidores de caspasa-8, puede ser beneficioso usar la combinación del inhibidor de caspasa-8 en
25 combinación con un agente anti inflamatorio o un agente capaz de eliminar la acumulación de células inflamatorias. Por ejemplo, el inhibidor de caspasa-8 se puede administrar conjuntamente con un agente anti-inflamatorio tal como cloruro de gadolinio durante hasta 4 días o más, por ejemplo, durante hasta 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 días y hasta 1 mes para facilitar la curación de heridas, la recuperación de tejido del daño, y/o la regeneración de tejido.

30 Un inhibidor de caspasa-8 solo, o junto con y un agente anti inflamatorio o un agente capaz de eliminar la acumulación de células inflamatorias, se puede usar para facilitar la curación de hígado dañado, la recuperación de hígado a partir del daño, y/o la regeneración de hígado, por ejemplo, en casos en los cuales un tumor maligno, metástasis o área cirrótica se extrae o se somete a resección del hígado.

35 La donación de hígado entre un donante vivo y paciente presenta problemas debido a que o bien el injerto o el hígado remanente es demasiado pequeño para soportar la vida del donante y/o receptor. Generalmente, una relación injerto y peso corporal más grande de 0,8 parece ser segura (Lee et al., 2004). La Inhibición de caspasa-8 sola, o junto con y un agente anti inflamatorio o un agente capaz de eliminar la acumulación de células inflamatorias, puede permitir extender más las resecciones de hígado a una masa de hígado por debajo del margen de seguridad actual en el hígado de un donante.

40 La revelación contempla el uso de un inhibidor de caspasa-8 administrado o bien sistémicamente y/o localmente, en el sitio de la herida.

45 El término "inhibidor de caspasa-8" dentro del contexto de esta invención se refiere a cualquier molécula que module la producción y/o acción de caspasa-8 de tal manera que la producción y/o acción de caspasa-8 sea atenuada, reducida o parcialmente, sustancialmente o completamente prevenida o bloqueada. El término "inhibidor de caspasa-8" quiere decir que abarca inhibidores de la producción de caspasa-8 así como de inhibidores de la acción de caspasa-8. El inhibidor de caspasa-8 puede ser guiado, por ejemplo, a hepatocitos (véase a continuación).

50 Un inhibidor de la producción puede ser cualquier molécula que afecte negativamente a la síntesis, procesamiento o maduración de caspasa-8. Los inhibidores considerados de acuerdo con la invención pueden ser, por ejemplo, supresores de la expresión del gen de la caspasa-8, ARNms antisentidos o ARN de doble cadena como ARN de interferencia pequeño (Hunter et al., 1975) para reducir o prevenir la transcripción del ARNm de la caspasa-8 o conducir a la degradación del ARNm, proteínas que dañan la correcta doblez de la caspasa-8, proteasas que degradan la caspasa-8, una vez se haya sintetizado, e inhibidores de escisión de procaspasa-8 para generar caspasa-8 activa.

55 Un inhibidor de la acción de la caspasa-8 puede ser un antagonista de la caspasa-8. Los antagonistas pueden estar o bien unidos a o aislados de la propia molécula de caspasa-8 con afinidad y especificidad suficiente para neutralizar parcialmente o sustancialmente la caspasa-8.

Los inhibidores de la acción de la caspasa-8 pueden ser anticuerpos específicos a caspasa-8, tales como anticuerpos policlonales o monoclonales, o cualquier otro agente o molécula que prevenga la unión de la caspasa-8 a sus dianas, disminuyendo así o previniendo el desencadenante de las reacciones mediadas por la caspasa-8.

5 El término "inhibidor de una proteína" dentro del contexto de esta invención se refiere a cualquier agente tal como una proteína (por ejemplo, un anticuerpo), polinucleótido (por ejemplo, ARNs antisentidos y de Interferencia Pequeños) y molécula inhibidora pequeña capaz de regular por disminución la producción y/o la reacción de una proteína de tal modo que dicha producción y/o acción de proteína sea atenuada, reducida o parcialmente, sustancialmente o completamente prevenida o bloqueada.

10 Una molécula inhibidora pequeña puede ser un compuesto orgánico (que contiene carbono) o compuesto inorgánico con un peso molecular de aproximadamente 100 a 5.000; 200 a 5.000; 200 a 2.000; o 200 a 1.000 daltons. Las moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, metabolitos, análogos metabólicos, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos heteroorgánicos y organometálicos. Por ejemplo, las moléculas pequeñas inhibidoras de caspasa-8 pueden estar constituidas por péptidos que compiten con éxito para unirse a caspasa. Péptidos WEHD, VDVAD y DEVD son ejemplos de péptidos que se unen a caspasas. Es posible generar inhibidores reversibles o irreversibles de la activación de la caspasa mediante el acoplamiento caspasa-péptidos específicos a cierto aldehído, compuestos de nitrito o cetona. Péptidos derivatizados de fluorometil cetona (FMK, del Inglés "Fluoromethyl Ketone"), tal como Z-IETD-FMK, actúan como inhibidores irreversibles eficaces. Los inhibidores sintetizados con un grupo de benciloxicarbonilo (también conocido como BOC o Z) en el terminal N y las cadenas laterales de O-metilo presentan permeabilidad celular aumentada facilitando así su uso in vivo.

20 Ejemplos de inhibidores de caspasa-8 incluyen, pero no se limitan a, (i) cFLIP corto (CASH beta) (ii) cFLIP largo (CASH alfa). (iii) Las proteínas RING asociadas a caspasas-8 y -10 (CARPs, McDonald ER 3^o, El-Deiry WS, Proc. Natl. Acad. Sci USA. 20 de Abril de 2004; 101(16):6170-5), y un inhibidor químico de caspasa-8 tal como IETD-FMK (R&D Systems N^o Cat FMK007).

25 El término "anticuerpo" quiere decir que incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (MAbs, del Inglés "Monoclonal Antibodies"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) a anticuerpos que se pueden marcar en forma soluble o unido, y anticuerpos humanizados así como fragmentos de los mismos proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como, pero no limitada a escisión enzimática, síntesis de péptido o técnicas recombinantes.

30 Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos a antígenos, dichas poblaciones contienen sitios de unión a epítopo sustancialmente similares. Los Mabs se pueden obtener por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, 256:495-497 (1975); documento de patente U.S. N^o 4.376.110; Ausubel et al., eds., Harlow y Lane "ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL", Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan et al., eds., "Current Protocols in Immunology", Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y. (1992-1996). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluyen IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de los mismos. Un hibridoma que produce un MAb de la presente invención se puede cultivar in vitro, in situ o in vivo. La producción de altos títulos ("titers") de MAbs in vivo o in situ hace de esto el método de producción actualmente preferido.

40 Los anticuerpos quiméricos son moléculas de las cuales se derivan diferentes porciones a partir de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen la región variable derivada de un MAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos son principalmente usados para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para incrementar los rendimientos en producción, por ejemplo, cuando los MAbs murinos tienen rendimientos mayores a partir de hibridomas pero inmunogenicidad mayor en humanos, de modo que los Mabs quiméricos humanos/murinos se usan. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312:643-646 (1984); Cabilly et al., Solicitud de Patente Europea 125023 (publicada el 14 de Noviembre, 1984); Neuberger et al., Nature 314:268-270 (1985); Taniguchi et al., Solicitud de Patente Europea 171496 (publicada el 19 de Febrero, 1985); Morrison et al., Solicitud de Patente Europea 173494 (publicada 5 de Marzo, 1986); Neuberger et al., Solicitud PCT WO 8601533, (publicada 13 de Marzo, 1986); Kudo et al., Solicitud de Patente Europea 184187 (publicada 11 de Junio, 1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137:1066-1074(1986); Robinson et al., Solicitud de Patente Internacional N^o WO8702671 (publicada 7 de Mayo, 1987); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:214-218 (1987); Better et al., Science 240:1041-1043 (1988); Riechmann et al., Nature 332:323-327 y Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, supra.

55 "Anticuerpos completamente humanizados" son moléculas que contienen tanto la región variable como constante de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos completamente humanizados pueden ser potencialmente usados para el uso terapéutico, donde se requieren los tratamientos repetidos para las enfermedades crónicas y con recaída tales como las enfermedades autoinmunes. Un método para la preparación de los anticuerpos completamente humanos consisten en "humanización" del sistema inmune humoral de ratón, es decir, la producción de cepas de

ratón capaces de producir Ig humano ("Xenomice"), mediante la introducción de los loci de la inmunoglobulina humana (Ig) dentro de los ratones en los cuales los genes de Ig endógenos han sido inactivados. Los loci de Ig son extremadamente complejos en términos de tanto su estructura física como de la reordenación del gen como de los procesos de expresión requeridos para producir por último una amplia respuesta inmune. La diversidad de anticuerpo está principalmente generada por la reordenación por combinación entre genes V, D y J diferentes presentes en los loci de Ig. Estos loci también contienen los elementos reguladores intercalados, los cuales controlan la expresión del anticuerpo, la exclusión alélica, el cambio de clase y la maduración de afinidad. La introducción de transgenes de Ig humanos no reordenado dentro de los ratones ha demostrado que la maquinaria de recombinación de ratón es compatible con genes humanos. Además, los hibridomas que secretan Mabs humanos específicos a antígeno de diversos isotipos se pueden obtener mediante la inmunización de Xenomice con antígeno.

Los anticuerpos completamente humanizados y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997); Buggemann et al., Eur. J. Immunol. 21:1323-1326 (1991); Tomizuka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727 (2000) documento de Patente WO 98/24893.

Se dice que un anticuerpo monoclonal es "capaz de unirse" a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para de ese modo unir la molécula al anticuerpo. El término "epítipo" quiere decir que se refiere a esa porción de cualquier molécula capaz de estar unida por un anticuerpo, la cual también puede ser reconocida por ese anticuerpo. Los epítipos o "determinantes antigénicos" normalmente consisten en agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activos tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específica.

Se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que la hepatectomía del hígado con los hepatocitos deficientes en caspasa-8 eventualmente desencadena la inflamación, y por lo tanto, que el papel de la caspasa-8 está asociado con la supresión de la inflamación. Este nuevo papel de la caspasa-8 en la inflamación no se podría predecir a partir de la bibliografía publicada ya que mientras se informaba de que la caspasa-12 (Saleh et al., 2006) suprime los mediadores inflamatorios, se informaba de que otras caspasas de mamíferos tales como las caspasas 1, 4, 5, 11 (Martinon et al., 2004) catalizan la generación de los mediadores inflamatorios IL-1 y IL-8. Aunque se observó menos proliferación celular en los ratones deficientes en caspasa-8 en comparación con los compañeros de camada control que no carecían de caspasa-8 pocos días antes de la resección del hígado, más tarde, el efecto de la deficiencia de caspasa-8 se invirtió, y los hepatocitos deficientes en caspasa-8 mantuvieron la proliferación. La excesiva proliferación dio como resultado un hígado anormalmente agrandado. Nuestros descubrimientos indicaron que la proliferación de hepatocito mantenida era una consecuencia de la inflamación. En vista de estos descubrimientos, la invención también se refiere a la inducción o aumento de la actividad/nivel de caspasa-8 para prevenir o reducir la inflamación en el hígado. El uso de caspasa-8 como agente antiinflamatorio es ventajoso, pero no se limita a un tejido u órgano que tiene células en las cuales el nivel o la actividad de caspasa-8 es regulada por disminución. Por tanto, al menos un agente seleccionado entre: (i) caspasa-8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal de los mismos; (ii) un agente capaz de regular por aumento el nivel y/o la actividad de caspasa-8; y (iii) un inhibidor de un inhibidor natural del nivel y/o la actividad de caspasa-8 se puede usar para tratar una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria. Ejemplos de enfermedad, trastorno o afección inflamatoria incluyen pero no se limitan a, hepatitis, enfermedades inflamatorias del intestino, vasculitis, inflamación de articulación, sinusitis, escleritis, periodontitis, cervicitis, uveítis, vulvovaginitis, conjuntivitis, alveolitis, esofagitis, glomerulonefritis aguda, nefritis, bronquitis aguda, colecistitis aguda e infección del oído.

La contribución de la función de la caspasa-8 a la respuesta inmune en los hepatocitos, se valoró mediante la comparación de la recuperación de la infección a diferentes puntos de tiempo después de la inoculación intravenosa de una dosis subletal de *Listeria monocytogenes* en ratones con hepatocitos deficientes en caspasa-8 (*Casp8^{F/+}: Alb-Cre*) con la de sus miembros de la camada control (*Casp8^{F/+}: Alb-Cre*). Se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que la deficiencia de caspasa-8 en hepatocitos atenuó la resistencia de los ratones al patógeno intracelular, *Listeria monocytogenes*.

El hígado es el sitio principal de eliminación de *Listeria* desde la circulación y es también un sitio muy importante de persistencia de la infección con *Listeria*. La detención de la infección es en gran parte dependiente de la capacidad de las células del sistema inmune de matar los hepatocitos infectados. Mientras que en las fases tempranas después de la infección la ausencia de caspasa-8 en los hepatocitos parecía tener no efecto sobre el rendimiento de *Listeria*, en fases más tardías de la infección, los ratones con hepatocitos deficientes en caspasa-8 muestran infección de hígado incrementada y persistente. Sin estar sujetos a cualquier teoría en cuanto al mecanismo operativo o modo de acción de la caspasa-8, nuestros descubrimientos indican que la caspasa-8 puede ayudar a combatir la infección al aumentar la destrucción de las células infectadas. Sin embargo, una contribución de la caspasa-8 a otros mecanismos de defensa no puede ser sin embargo excluida. Los resultados mostrados en la presente memoria junto con un informe reciente que muestra que la delección de caspasa-8 en hepatocitos dota a estas células con resistencia al efecto citotóxico del receptor Fas (Kang et al., 2004) alza la posibilidad de que la infección incrementada y persistente del patógeno intracelular en los hepatocitos deficientes en caspasa-8 es debida al fracaso de los linfocitos T para eliminar los hepatocitos infectados a través de Fas.

5 En general, usando un sistema de modelo animal ampliamente empleado para explorar la defensa inmune frente a patógenos intracelulares, se ha encontrado de acuerdo con la invención que el nivel y/o la actividad de caspasa-8 está implicado en la defensa frente a patógenos intracelulares en el hígado y que incrementar el nivel y/o la actividad de la caspasa-8 se puede aprovechar para erradicar los patógenos intracelulares. En una realización, incrementar el nivel y/o la actividad de la caspasa-8 se puede usar para erradicar los patógenos intracelulares de los hepatocitos en humanos.

10 Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a aumentar o inducir la actividad y/o el nivel de la caspasa-8 en un mamífero para reducir la infección causada por un patógeno intracelular el cual es *Mycobacterium*, *Listeria*, *Leishmania*, *Legionella* o *Salmonella* (Steinert et al., 2002, y Gruenheid and Gros 2002). Ejemplo de infección micobacteriana incluye, pero no se limita a, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium lepraemurium*.

15 Aumentar o inducir la actividad y/o el nivel de caspasa-8 puede estar afectado por el uso de un agente seleccionado entre: (i) caspasa-8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o sal de los mismos; (ii) un agente capaz de regular por aumento el nivel y/o la actividad de caspasa-8; y (iii) un inhibidor de un inhibidor natural del nivel y/o la actividad de caspasa-8 se puede usar para tratar una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria.

La caspasa-8, muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado se puede administrar usando un vector de expresión que codifica y es capaz de expresar la caspasa-8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado.

20 El término "agente capaz de regular por aumento una proteína" o "activador de una proteína" dentro del contexto de esta invención se refiere a cualquier agente o activador, tal como una proteína, nucleótido, polinucleótido y pequeña molécula, capaz de regular por aumento dicho nivel y/o acción de la proteína.

25 Ejemplos de activadores de caspasa-8 incluyen, pero no se limitan a, FADD, caspasas que pueden escindir la caspasa-8 como caspasa-6 y caspasa-3 e, indirectamente, los diversos receptores de muerte de la familia de TNF/NGF. Dependiendo del conjunto celular exacto, cFLIP largo también puede servir como activador de la caspasa-8.

30 Tal como se usa en la presente memoria el término "muteínas" se refiere a análogos de una caspasa-8, en los cuales uno o más de los residuos de aminoácidos de los componentes que se dan de forma natural de la caspasa-8 están reemplazados por diferentes residuos de aminoácidos, o se someten a delección, o uno o más residuos de aminoácidos se añaden a la secuencia original de una caspasa-8, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la caspasa-8 original. Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocida y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigida a sitio, o cualquier otra técnica conocida adecuada para lo mismo.

35 Las muteínas usadas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, el cual hibrida con ADN o ARN, el cual codifica una caspasa-8, de acuerdo con la presente invención, bajo condiciones estrictas. El término "condiciones estrictas" se refiere a condiciones de hibridación y posterior lavado, a lo cual los expertos en la técnica convencionalmente se refieren como "estrictas". Véase Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", supra, Interscience, N.Y., §§6,3 y 6,4 (1987, 1992), y Sambrook et al. (Sambrook, J.C., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

45 Sin limitación, ejemplos de condiciones estrictas incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido bajo estudio en, por ejemplo, 2xSSC y SDS al 0,5% durante 5 minutos, 2xSSC y SDS al 0,1% durante 15 minutos; 0,1xSSC y SDS al 0,5% a 37° durante 30-60 minutos y a continuación, un 0,1xSSC y SDS al 0,5% a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos en esta técnica entienden que las condiciones de severidad también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, sondas de oligonucleótidos (tales como 10-40 bases) o sondas de oligonucleótidos mezclados. Si se usan las sondas mezcladas, es preferible usar cloruro de tetrametil amonio (TMAC, del Inglés "Tetramethyl ammonium chloride") en lugar de SSC. Véase Ausubel, supra.

Cualquiera de dicha muteína preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de una caspasa-8, tal para tener sustancialmente similar, o incluso mejor, actividad a caspasa-8.

50 Una actividad característica de la caspasa-8 es su actividad proteolítica en sitios de sustrato específicos. Por tanto, se puede determinar si cualquier muteína dada tiene al menos sustancialmente la misma actividad que la caspasa-8 por medio de experimentación de rutina. Siempre que el mutante tenga actividad proteolítica se puede considerar que tiene actividad sustancialmente similar a caspasa-8.

Por tanto, se puede determinar si cualquier mutante dado tiene al menos sustancialmente la misma actividad que la caspasa-8 por medio de experimentación de rutina que comprende someter dicho mutante, por ejemplo, a un sustrato como el descrito en el ejemplo 3 del documento de Patente US 6.399.327.

5 En una realización preferida, cualquiera de dicha muteina tiene al menos 40% de identidad u homología con la secuencia de la caspasa-8. Más preferiblemente, tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, lo más preferiblemente, al menos 90% de identidad u homología a ésta.

10 La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada al comparar las secuencias. En general, la identidad se refiere a un nucleótido exacto a nucleótido o correspondencia aminoácido a aminoácido de los dos polinucleótidos o dos secuencias de polipéptido, respectivamente, sobre la longitud de las secuencias a comparar.

15 Para secuencias donde no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un “% de identidad”. En general, las dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de “gaps” en o bien una o ambas secuencias, para aumentar el grado de alineamiento. Se puede determinar un % de identidad sobre la longitud completa de cada una de las secuencias a comparar (denominado así alineamiento global), esto es particularmente adecuado para secuencias de la misma o longitud o muy similar, o casi más corto, longitudes o sobre longitudes más cortas definidas (así denominado alineamiento local), esto es más adecuado para secuencias de longitud desigual.

20 Métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así por ejemplo, los programas disponibles en “Wisconsin Sequence Analysis Package”, versión 9,1 (Devereux J et al., 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, se pueden usar para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptido. BESTFIT usa el algoritmo de “homología local” de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región sencilla de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias son también conocidos en la técnica, por ejemplo la familia BLAST de los programas (Altschul S.F. et al., 1990, Altschul S.F. et al., 1997, 25 accesible a través de la página principal de la NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W.R., 1990; Pearson 1988).

30 Las muteinas de caspasa-8, las cuales se pueden usar de acuerdo con la presente invención, o ácido nucleico que codifica las mismas, incluyen un grupo finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos de sustitución o polinucleótidos los cuales se pueden obtener de manera rutinaria por uno de los expertos en la técnica, sin experimentación indebida, basado en los descubrimientos y la orientación presentados en la presente memoria.

35 Los cambios preferidos para las muteinas de acuerdo con la presente invención son los que se conocen como sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de caspasa-8 pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares a la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que esas inserciones y deleciones de los aminoácidos pueden también hacerse en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones solamente implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo, bajo treinta, y preferiblemente bajo diez, y no extrae o desplaza aminoácidos que son críticos a una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Proteínas y muteinas producidas por tales deleciones y/o inserciones vienen dentro del alcance de la presente invención.

40 Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla A. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla B; y lo más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla C.

Tabla A

Grupos Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimos
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe

Aminoácido	Grupo Sinónimos
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Tabla B

Grupos más preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Tabla C

Los grupos más preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

- 5 Ejemplos de la producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas los cuales se pueden usar para obtener muteínas de polipéptidos de caspasa-8, para usarse en la presente invención incluyen cualquiera de las etapas del

método conocido, tales como las presentadas en los documentos de patentes US 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, a Mark et al.; 5.116.943 a Koths et al., 4.965,195 a Namen et al.; 4.879.111 a Chong et al.; y 5.017.691 a Lee et al.; y proteínas sustituidas por lisina presentadas en el documento de Patente US N° 4.904.584 (Shaw et al.).

5 El término “proteína fusionada” se refiere a un polipéptido que comprende una caspasa-8, o una muteína o fragmento de la misma, fusionado con otra proteína, la cual, por ejemplo, tiene un tiempo de permanencia extendido en los fluidos corporales. Por tanto, una caspasa-8 puede estar fusionada a por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

10 Los “derivados funcionales” tal como se usan en la presente memoria cubren derivados de la caspasa-8, y sus muteínas y proteínas fusionadas, las cuales pueden prepararse a partir de los grupos funcionales los cuales se dan como cadenas laterales en los residuos o los grupos N- o C- terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención siempre que se mantengan farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína la cual es sustancialmente similar a la actividad de la caspasa-8, y no confiera propiedades tóxicas sobre las composiciones que lo contienen.

15 Estos derivados pueden, por ejemplo, incluir cadenas laterales de polietilenglicol, las cuales pueden enmascarar sitios antigénicos y extender la permanencia de una caspasa-8 en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acil de los grupos amino libre de los residuos de aminoácidos formados con restos acil (por ejemplo, grupos alcanoil o aroil carbocíclico) o derivados O-acil de grupos hidroxilo libres (por ejemplo los de los residuos seril o treonil) formados con restos acil.

20 Una “fracción activa” de acuerdo con la presente invención puede, por ejemplo, ser un fragmento de caspasa-8. El término fragmento se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto que retiene la actividad biológica deseada. Los fragmentos se pueden preparar fácilmente al separar los aminoácidos de cualquier extremo de la molécula de caspasa-8 y ensayando la actividad proteolítica en el fragmento resultante. Las proteasas para extraer un aminoácido de una vez de o bien el N-terminal o el C-terminal de un polipéptido son conocidas, y así
25 los fragmentos decisivos, los cuales retienen la actividad biológica deseada, implican solamente experimentación de rutina.

30 Como las fracciones activas de una caspasa-8, muteínas y proteínas fusionadas de las mismas, la presente invención cubre además cualquier fragmento o precursores de la cadena de polipéptido de la molécula de proteína sola o junto con moléculas asociadas o residuos enlazados a las mismas, por ejemplo, residuos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los propios residuos de azúcar, dicha fracción proporcionada tiene actividad sustancialmente similar a caspasa-8, por ejemplo, actividad proteolítica.

35 El término “sales” en la presente invención se refiere a tanto sales de grupos carboxilo como a las sales adicionales ácidas de los grupos amino de la molécula de caspasa-8 o análogos de las mismas. Las sales del grupo carboxilo pueden estar formadas por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaina y similares. Sales de adición ácida incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido hidrocórico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dichas sales debe conservar la actividad biológica de la caspasa-8, por ejemplo, actividad proteolítica.

40 “Isoformas” de caspasa-8 son proteínas capaces de la actividad proteolítica o fragmento de las mismas, las cuales pueden producirse mediante maduración por corte y empalme (“splicing”) alternativa o lugar de inicio de traducción alternativa.

45 El término “derivados circularmente permutados” tal como se usa en la presente invención se refiere a una molécula lineal en la cual los terminales se han juntado, o bien directamente o a través de un enlace, para producir una molécula circular, y a continuación se abre la molécula circular en otra localización para producir una nueva molécula lineal con terminales diferentes a partir de los terminales en la molécula original. Las permutaciones circulares incluyen aquellas moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que ha sido circularizada y a continuación abierta. Por tanto, una molécula circularmente permutada se puede sintetizar de nuevo como una molécula lineal y nunca va a través de una etapa de circularización y abertura. La preparación de derivados
50 circularmente permutados está descrita en el documento WO95/27732.

55 Algunas sustancias de acuerdo con la invención tales como péptidos, proteínas y oligonucleótidos, necesitan su introducción dentro de las células de un organismo vivo. Con este propósito, se desea mejorar la permeabilidad de membrana de péptidos, proteínas y oligonucleótidos. La derivatización con estructuras lipófilas se puede usar en la creación de péptidos y proteínas con permeabilidad de membrana aumentada. Por ejemplo, la secuencia de un péptido membranotrópico conocido como se ha indicado anteriormente se puede añadir a la secuencia del péptido o proteína. Además, el péptido o proteína se puede someter a derivatización mediante estructuras parcialmente lipófilas tales como las cadenas de hidrocarbano anteriormente indicadas, las cuales están sustituidas con al menos

un grupo polar o cargada. Por ejemplo, derivados de lauroilo de péptidos se han descrito por Muranishi et al., 1991. Modificaciones adicionales de péptidos y proteínas comprenden la oxidación de residuos de metionina para de ese modo crear grupos sulfóxido, tal como se ha descrito por Zacharia et al. 1991. Zacharia y colaboradores también describen el péptido o derivados en los que el péptido relativamente hidrófobo unido está reemplazado por su isoéster de quetometileno (COCH₂). Estas y otras modificaciones conocidas por los expertos en la técnica de la química de la proteína y el péptido aumentan la permeabilidad de membrana.

Otro modo de aumentar la permeabilidad de membrana es el uso de receptores, tales como receptores de virus, sobre superficies celulares para inducir la absorción celular del péptido o proteína. Este mecanismo se usa frecuentemente por virus, los cuales se unen específicamente a ciertas moléculas de superficie celular. Tras la unión, la célula absorbe el virus a su interior. La molécula de superficie celular se denomina receptor de virus. Por ejemplo, las moléculas de integrina CAR y AdV se ha descrito como receptores de virus para Adenovirus, véase Hemmi et al. 1998, y referencias en el mismo. Las moléculas CD4, GPR1, GPR15 y STRL33 se han identificado como receptores/co-receptores para HIV, véase Edinger et al. 1998 y referencias en el mismo.

Por tanto, los péptidos de conjugación, proteínas u oligonucleótidos para moléculas que se sabe que se unen a los receptores de superficie celular aumentarán la permeabilidad de membrana de dichos péptidos, proteínas u oligonucleótidos. Ejemplos para grupos adecuados para formar conjugados son azúcares, vitaminas, hormonas, citoquinas, transferrinas, asialoglicoproteína y moléculas similares. Low et al., el documento de Patente U.S. N° 5.108.921, describe el uso de estas moléculas con el propósito de aumentar la permeabilidad de membrana de péptidos, proteínas y oligonucleótidos, y la preparación de dichos conjugados. Low y colaboradores muestran además que moléculas tales como folato o biotina se pueden usar para guiar el conjugado a una multitud de células en un organismo, debido a la expresión abundante y no específica de los receptores para estas moléculas.

El uso anterior de las proteínas de superficie celular para incrementar la permeabilidad de membrana de un péptido, proteína u oligonucleótido de la invención también se puede usar en guiar dicho péptido, proteína u oligonucleótido de la invención para ciertos tipos celulares o tejidos. Wang et al., 1998, enseña el uso de folato para guiar las células de cáncer, y Zhang et al. 1998, enseña la abundancia relativa de cada uno de los otros antígenos indicados anteriormente en diversos tipos de cáncer y en células normales.

Las proteínas, péptidos y secuencias antisentido de la invención se pueden introducir dentro de las células mediante el uso de un vector viral. El uso de vector vaccinia para este propósito está detallado en el capítulo 16 de los "Current Protocols in Molecular Biology". El uso de vectores de adenovirus se ha descrito por ejemplo por Teoh et al., 1998, Narumi et al., 1998, Pederson et al., 1998, Guang-Lin et al., 1998, y referencias en los mismos, Nishida et al., 1998, Schwarzenberger et al. 1998, y Cao et al., 1998. La transferencia retroviral de secuencias antisentido se ha descrito por Daniel et al. 1998.

Cuando se usan los virus como vectores, las proteínas de superficie viral generalmente se usan para guiar el virus. Como muchos virus, tales como los adenovirus anteriores, son bastantes inespecíficos en su tropismo celular, puede ser deseable impartir además especificidad para usar un tipo de célula o promotor específico a tejido. Griscelli et al., 1998 enseña el uso del promotor de cadena ligera 2 de miosina cardiaca específica a ventrículo para guía específica a corazón de un gen cuya transferencia está mediada por adenovirus.

Alternativamente, el vector viral se puede producir por ingeniería genética para expresar una proteína adicional sobre su superficie, o la proteína de superficie del vector viral se puede cambiar para incorporar una secuencia de péptido deseada. El vector viral se puede así producir por ingeniería genética para expresar uno o más epítomos adicionales, los cuales se pueden usar para guiar, dicho vector viral. Por ejemplo, epítomos de citoquina, péptidos de unión a MHC clase II, o epítomos derivados de moléculas "homing" se pueden usar para guiar el vector viral de acuerdo con el descubrimiento de la invención.

Esto es ventajoso para guiar las sustancias activas de acuerdo con la invención a hepatocitos. Guiar a hepatocitos permite la liberación específica y eficiente de las sustancias activas a hepatocitos. La guía de sustancias activas a hepatocitos se pueden llevar a cabo mediante la asociación de las sustancias activas a compuestos o ligandos que se unen a y son internalizados por hepatocitos, por ejemplo, ligandos que reaccionan con el receptor de asialoglicoproteína (ASGPr) [Groman et al. 1994; Rogers & Kornfeld 1971; Fiume et al. 1997], [Wu et al. 2002, Wu et al., 2004] y ligando T7 (documento de Patente US 7.071.163)

Los descubrimientos de acuerdo con la presente revelación preparan el camino para diseñar composiciones farmacéuticas que comprenden una sustancia activa capaz de regular el nivel y/o la actividad de caspasa-8 en combinación con al menos un vehículo aceptable para facilitar la curación de heridas, tratar la inflamación y tratar la infección causada mediante un patógeno intracelular.

La presente revelación proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen las sustancias activas de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender en caso de inflamación o infección al menos uno de los siguientes agentes o sustancias de la invención: (i) caspasa-8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente

permutado o una sal de los mismos; (ii) un agente capaz de regular por aumento el nivel y/o la actividad de caspasa-8; y (iii) un inhibidor de un inhibidor natural del nivel y/o la actividad de caspasa-8. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender en caso de la curación de herida los siguientes agentes o sustancias de la invención: un inhibidor del nivel y/o la actividad de caspasa-8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son también adecuadas en el tratamiento de fallo de hígado, consecutivo a la resección de hígado. Por tanto, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede administrar al donante de un trasplante de hígado o a pacientes después una resección de hígado, para prevenir el establecimiento o progreso del fallo de hígado para facilitar y acelerar la curación de la lesión. La composición farmacéutica de acuerdo con la invención, puede comprender un inhibidor de caspasa-8 y un agente inflamatorio, por ejemplo, para tratar el daño del hígado. Sujetos específicos a tratar mediante la composición de la invención incluyen, pero no se limitan a, pacientes en los cuales una porción del hígado dañado se ha sometido a resección parcialmente debido a las enfermedades de hígado tales como hepatitis, cirrosis hepática de caso alcohólico, vírico, de droga o desconocido, o cáncer hepático y donantes saludables en los cuales una porción de hígado se ha sometido parcialmente a resección para procedimientos de trasplante.
- 10
- 15 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención incluye una cantidad suficiente de sustancia(s) de acuerdo con la invención para alcanzar su propósito intencionado. Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares, los cuales facilitan el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente y los cuales pueden estabilizar dichas preparaciones para la administración al paciente en necesidad de las mismas así también conocidos por los expertos en la técnica.
- 20

Las sustancias de acuerdo con la invención se podría administrar a un paciente en necesidad de las mismas en una diversidad de modos. Las rutas de administración incluyen rutas intrahígado, intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal. Además la sustancia se puede administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como tensioactivos, excipientes, vehículos, diluyentes y vehiculizantes farmacéuticamente aceptables.

25

La dosificación administrada, como dosis sencillas o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas de la sustancia, la ruta de administración, las condiciones del paciente y las características (sexo, edad, peso corporal, salud, talla), el alcance de los síntomas, los tratamientos simultáneos, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están también dentro de la capacidad de los expertos.

30

La definición de "farmacéuticamente aceptable" quiere decir que abarca cualquier vehículo, el cual no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el hospedante al cual se administra. Por ejemplo, para la administración parental, la sustancia de acuerdo con la invención se puede formular en una forma de dosificación única para la inyección en vehiculizantes tales como disolución salina, disolución de dextrosa, albúmina de suero y disolución de Ringer.

35

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es tal que cuando se administra, dichas sustancias de la invención inducen un efecto beneficioso en la inflamación, infección de los patógenos intracelulares y la curación de herida. La dosificación administrada, como las dosis sencillas o múltiples, a un individuo puede variar dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo la ruta de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, talla), el alcance de los síntomas, los tratamientos simultáneos, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están también dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

40

Los compuestos que le interesa a la invención se pueden preparar para la administración por cualquier ruta consecuente con sus propiedades farmacocinéticas.

45

La sustancia activa o ingrediente también se puede administrar de manera parenteral en un medio estéril. Dependiendo del vehiculizante y la concentración usada, el fármaco se puede o bien poner en suspensión o disolver en el vehiculizante.

El término "dosificación" se refiere a la determinación y regulación de la frecuencia y número de dosis.

50 La referencia a las etapas de método conocido, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es de ningún modo una admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención está revelada, enseñada o sugerida en la técnica relevante.

Habiendo descrito ahora la invención, se entenderá más fácilmente en referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no intentan ser limitantes de la presente invención.

Algunos de los ejemplos se han incluido solamente con el propósito de referencia y no están bajo el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Materiales y Métodos

5 (i) **Cepas de Ratón.** Las cepas de ratones que llevan un alelo de caspasa-8 eliminado (Casp8^{-/-})(Varfolomeev et al., 1998) o un alelo de caspasa-8 condicional (Casp8^{F/+})(Kang et al., 2004), así como los ratones que expresan Cre bajo control del promotor de albumina específico de hígado (Alb-Cre)(Kellendonk et al., 2000) y su uso para la delección del gen de caspasa-8 específicamente en hepatocitos (Kang et al., 2004), han sido descritos previamente. Los experimentos relacionados con la infección con *Listeria* se llevaron a cabo con ratones de origen C57B1/6 puro, obtenidos mediante 11 entrecruzamientos con ratones de esa cepa. Los experimentos presentados relacionados con la regeneración post-PHx del hígado se realizaron con ratones del origen genético mezclado original y origen C57B1/6 puro, tal como se ha indicado. Todos los ratones se mantuvieron en una instalación libre de patógeno específico. Los ratones se manipularon de acuerdo con los criterios trazados en "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" preparada por "National Academy of Sciences" y publicado por "National Institutes of Health".
10 Todos los experimentos se aprobaron por el comité de cuidado ético animal institucional.

(ii) **Infección y Cuantificación de *Listeria monocytogenes*.** Los ratones se inyectaron intravenosamente con 2×10^3 unidades formadoras de placas de *Listeria monocytogenes* (cepa 10403S) y se sacrificaron a diferentes tiempos más adelante. Sus hígados y bazos se extrajeron y se pesaron. Las porciones de hígados y bazos se pesaron y homogeneizaron por separado en 1% Triton X-100 en disolución salina tamponada con fosfato (PBS, del Inglés "Phosphate Buffered Saline"). Las disoluciones 10 veces seriales de homogenados de órgano se colocaron sobre agar de infusión de corazón y cerebro. Se determinaron los números de unidades formadoras de colonia por órgano después de incubar las placas de agar a 37°C durante 24 horas. Las partes restantes de los bazos e hígados se fijaron en 10% de formalina tamponada neutral durante 24 a 48 horas. A continuación, se recortaron los tejidos, se procesaron de manera rutinaria en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o con anticuerpo anti Ki67 (DakoCytonation, Glostrup, Dinamarca).
20
25

(iii) **Hepatectomía Parcial y Administración de Cloruro de Gadolinio.** Se anestesiaron ligeramente ratones Casp8^{F/-}: Alb-Cre y ratones Casp8^{F/+}: Alb-Cre igualados por edad con 10 mg/g peso corporal de xilazina administrada intraperitonealmente (i.p.)(Chanelle Pharmaceuticals Manufacturing, Loughrea, Galway, Irlanda) y 450 mg/g peso corporal de Ketamina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA). Se realizó "un tercio" (30%) de PHx al extirpar el lóbulo medio del hígado, y "dos tercios" (70%) de PHx al extirpar los lóbulos medio, izquierdo y derecho superior tal como está descrito (Higgins et al., 1931 y Greene et al., 2003). Se tomó una imagen de los ratones antes de PHx y después los días 0-56 (un día sí y otro no durante la primera semana y semanalmente a partir de entonces). Los días 10 y 12 después de PHx los ratones se inyectaron i.p. con cloruro de gadolinio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en disolución salina en una dosificación de 10 mg/kg.
30

(iv) **Técnica de Análisis MRI.** Los experimentos de realización de imagen por resonancia magnética (MRI, del Inglés "Magnetic Resonance Imaging") se realizaron usando un espectrómetro 4.7T Biospec horizontal (Bruker Medical, Ettlingen, Alemania) con una bobina de jaula de pájaro de 4,2 cm. Los ratones se anestesiaron (con 30 mg/kg de pentobarbital, i.p.) y se colocaron de cúbito supino con el hígado localizado en el centro de la bobina. El volumen del hígado se determinó a partir de las imágenes de eco de espín potenciado en T1 coronales y axiales multicortes (tiempo de repetición=400 ms; tiempo de eco=18 ms; grosor de corte=1 mm). En resumen, el borde del hígado visualizado en cada corte se trazó usando un programa informático de procesamiento de imagen (NIH Image). Para convertir el número de píxeles del hígado a un área multiplicamos por el factor [(campo de la visión)²/(matriz)²]. Se calculó el volumen de hígado total como el área resumen de todos los cortes, multiplicados por el grosor de corte. Para cada ratón el volumen del hígado se expresó como un porcentaje del volumen del hígado preoperativo.
35
40
45

Se evaluaron la perfusión hepática y la hemodinámicas a partir de imágenes de eco en gradiente potenciado en T2* (tiempo de repetición=100 ms; tiempo de eco=10 ms; campo de visión=3,4 cm; grosor de corte=1,2 mm) adquiridas mientras el ratón estaba respirando aire, aire y CO₂ (aire al 95%, CO₂ al 5%) y carbógeno (O₂ al 95%, CO₂ al 5%), como previamente se ha descrito (Abramovitch et al., 1998 y 1999). Se adquirieron cinco repeticiones para cada mezcla de gas.
50

Se analizaron los datos de hemodinámicas de MRI en un PC usando el programa IDL (Research Systems, Boulder, CO). Los mapas de los valores medios de intensidad de la señal media por cada pixel obtenidos durante la inhalación de diferentes gases (Sair, Sco₂ y So₂) se calcularon a partir de los promedios de cuatro valores por cada gas (valores obtenidos durante se descartaban los cambios de gases). El cambio de porcentaje en la intensidad de la señal MRI inducido por hipercapnia (Δ SCO₂) y por hiperoxia (Δ SO₂) se calculó de acuerdo con las siguientes ecuaciones:
55

$$\Delta S_{CO_2} = \frac{\bar{S}_{CO_2} - \bar{S}_{air}}{\bar{S}_{air}} \times 100 \quad \Delta S_{O_2} = \frac{\bar{S}_{O_2} - \bar{S}_{CO_2}}{\bar{S}_{CO_2}} \times 100$$

Los resultados se expresaron como medias \pm SD. Se calcularon los valores medios a partir de regiones de interés en "n" ratones tal como se ha indicado y a partir de tres cortes por ratón.

5 (v) **Cálculo del Volumen del Área Isquémica.** Alrededor del área diseccionada, una zona anormal que manifiesta una intensidad de señal mayor que la del tejido de hígado sano era detectable por MRI. Esta área se calificó la "zona isquémica" y se determinaron sus bordes y el volumen. El volumen en cada ratón se calculó como la suma de las áreas de alta intensidad de señal en cada corte multiplicado por el grosor de corte. El volumen de la zona isquémica se calculó como un porcentaje del volumen de hígado pre-PHx los días 2 y 4 post-PHx.

10 (vi) **Análisis Estadístico.** Se identificaron las diferencias entre grupos mediante el test de la t de Student no pareado. Un valor P<0,05 se consideró estadísticamente significativa.

15 (vii) **Histología e Inmunotinción.** Los hígados se fijaron en formalina tamponada neutral al 10%, se incrustaron en parafina, se cortaron en secciones de 4 μ m, y se tiñeron con H&E. Para detectar células que expresan caspasa-3 procesada se desparafinaron las secciones, se rehidrataron y se incubaron con anticuerpo anti caspasa-3 escindida de ratón de conejo (Asp 175) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se tiñeron las secciones con anticuerpo anti peroxidasa biotinilada de conejo (DAKO Envision+System, Glostrup, Dinamarca).

20 Para detectar las células que expresan Ki67 se desparafinaron las secciones en parafina del hígado, se rehidrataron y se desnaturalizaron durante 10 minutos en de ácido cítrico 10 mM (pH 6,0) hirviendo. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos y, a continuación, se lavaron tres veces en PBS. Después del tratamiento durante 5 minutos en H₂O₂ al 3% los portaobjetos se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos anti Ki67 ratón de rata diluidos 1:100 en CAS-Block (Zymed Laboratories, San Francisco, CA). A continuación, se lavaron tres veces con PBS, se incubaron durante 1 hora con polímero de inmunoperoxidasa anti rata (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japón), y se desarrollaron con 3,3'-diaminobencidina (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos.

25 Se detectaron de manera similar células que expresan F4/80, usando anticuerpo anti F4/80 de ratón de rata (Serotec Oxford, UK), excepto que para la recuperación de antígeno se trataron las secciones en parafina durante 3 minutos a temperatura ambiente con una disolución que contenía Tris 20 mM (pH 7,5), tripsina al 0,1% y cloruro de calcio al 0,1%. El contenido de macrófago de los hígados se determinó mediante la cuantificación de las áreas F4/80 positivo en los portaobjetos usando el programa ImageJ 1,37r.

30 Se inyectó i.p. bromodeoxiuridina (BrdU) 3 horas antes de que se sacrificaron los ratones, y se detectó con la ayuda de un kit de proliferación celular Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

35 Para la detención inmunohistoquímica del transductor de la fosfo señal y el activador de la proteína 3 de transcripción (p-STAT 3, una proteína de señalización activada durante la inflamación) se desparafinaron las secciones en parafina, se rehidrataron, se incubaron durante 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% para enfriar la peroxidasa endógena, y a continuación se sometieron a recuperación de antígeno hirviendo durante 15 minutos en EDTA 1 mM (pH 8,0). A continuación, se lavaron los portaobjetos tres veces con TBS+Tween 20 al 0,5% (TBST) y se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpo anti p-STAT 3 de ratón de conejo (Tyr705)(Cell Singnaling Technology, 1:500). Después de unas series de enjuagues en TBST se incubaron en anticuerpo secundario anti conejo de cabra biotinilado (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Se detectó el anticuerpo unido usando el "TSA Biotin System" (Perkin Elmer, Boston, MA). Se visualizó la inmunoreactividad después de la incubación durante 5-10 minutos con cromógeno de sustrato de alta sensibilidad a 3-amino-9-etilcarbazola (Dako).

45 (viii) **Análisis tipo Western.** Se extrajo el tejido de hígado a diferentes tiempos después de PHx, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso. Muestras de 0,3 mg del tejido congelado se pesaron y se homogeneizaron en tampón de homogeneización [β -glicerofosfato 50 mM pH 7,3, EGTA 1,5 mM, EDTA 1 mM y ditiotritol 1 mM que contiene 1 cóctel completo de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)], se fraccionaron sobre geles de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio al 10%, se sometió a transferencia a nitrocelulosa, y se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpo anti ciclina A de ratón de conejo, anticuerpo anti fosfo STAT-3 de ratón de conejo (ambos de Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo anti ciclina E de ratón de conejo (Upstate, Chicago, IL), anticuerpo anti fosfo Rb de ratón de conejo (Cell Signaling Technology), anticuerpo monoclonal anti caspasa-8 de ratón de rata (1G12, amablemente donado por los Drs A. Strasser y L.A. O'Reilly, WEHI, Melbourne, Australia), o anticuerpo anti β -actina monoclonal (Sigma). A esto le siguió la incubación con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), diluido 1:5000. Se visualizaron bandas específicas por quimioluminiscencia.

Ejemplo 1. La Delección de Caspasa-8 en Hepatocitos comprende la Resistencia a infección con *Listeria*

El hígado es un sitio muy importante de replicación de *L. monocytogenes*, una bacteria gran positiva que invade el citoplasma de células eucariotas y se multiplica en ella. Por lo tanto, la erradicación de este patógeno del hígado después de la infección experimental de ratones es ampliamente usada como un sistema modelo para estudiar los mecanismos de defensa inmune frente a patógenos intracelulares (Wing et al., 2002). Para examinar la contribución de la función de la caspasa-8 a la respuesta inmune en hepatocitos, la recuperación de la infección se comparó a diferentes puntos de tiempo después de la inoculación intravenosa de una dosis subletal de *L. monocytogenes* en ratones con hepatocitos deficientes en caspasa-8 (*Casp8^{F/-}: Alb-Cre*) con la de sus compañeros de camada control (*Casp8^{F/+}: Alb-Cre*).

Un día después de la infección, las cargas bacterianas en los órganos de los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* eran similares a aquellos en sus compañeros de camada control. En el 6º día, sin embargo, los títulos bacterianos en tanto hígados como bazo de los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* eran 10 a 100 veces superiores a los controles (**Fig. 1A, B**). Por el día 14º se había aclarado totalmente el patógeno de tanto hígados como bazo de los ratones control, mientras que los títulos en los hígados de los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* permanecían altos (**Fig. 1C**). La infección prolongada dio como resultado la inflamación (**Fig. 1D, E**) y el desarrollo de lesiones necróticas en el hígado (**Fig. 1F, G**), así como la proliferación incrementada de los hepatocitos (**Fig. 1H, I**). Por el 6º día después de la infección aproximadamente el 15% de los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre*, pero ninguno de los ratones control, habían muerto.

Ejemplo 2. Efectos de la Deficiencia de Caspasa-8 en Hepatocitos sobre la recuperación de PHx: Atenuación de la Respuesta de Crecimiento Temprana.

Para evaluar la contribución de la caspasa-8 a la recuperación de tejido del daño, se valoró el efecto de la delección de caspasa-8 de los hepatocitos sobre la regeneración del hígado después de PHx. Consecuentemente con los informes anteriores, se encontró que la PHx provoca un explosión de la proliferación de hepatocito (reseñado en Fausto et al., 2006). Sin embargo, en los hígados de ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* la proliferación y también la inducción de varios cambios moleculares asociados con la transición G1/S (expresión incrementada de ciclina A, D y E y fosforilación de la proteína de retinoblastoma) se dio a una extensión significativamente menor que en sus compañeros de camada control (**Fig. 2**). Se observó este descenso después de 1/3 de PHx así como después de 2/3 de PHx, lo cual conduce a síntesis de ADN más robusta y mejor sincronizada y progresión más eficaz a través del ciclo celular (Mitchell et al., 2005 19). Debido a que la mortalidad durante las primeras horas después de la resección era significativamente mayor después de 2/3 de PHx, todos los análisis posteriores del efecto de la deficiencia de la caspasa-8 se restringieron a la recuperación de los ratones a partir de 1/3 de PHx.

Ejemplo 3. Efectos de la Deficiencia de Caspasa-8 en Hepatocitos sobre la Recuperación de PHx: Recuperación Mejorada del Sitio de Lesión Isquémica.

El control estricto del crecimiento celular *in vivo* se manifiesta de modo impresionante mediante la capacidad del hígado de mantener su tamaño normal y la recuperación aguda de su tamaño original después de la disección (Diehl 2000, y Michalopoulos and DeFrances, 1997). Sin embargo, en diversas afecciones patológicas, este control falla, dando como resultado alargamiento anormal (hepatomegalia) (Adachi et al., 1995, Anders et al., 2005 y Zimmers et al., 2003). Para valorar más el efecto de la deficiencia de caspasa-8 sobre la recuperación del hígado después de los cambios de PHx en el volumen de hígado se hizo un seguimiento mediante el uso de MRI. Antes de la hepatectomía, el volumen de hígado promedio en los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* era idéntico al de los ratones *Casp8^{F/+}: Alb-Cre* (datos no mostrados). Sin embargo, después de PHx los dos grupos difirieron significativamente en sus cinéticas del crecimiento del hígado (**Fig. 3C**). Sobre la MRI eco de espín potenciada en T1, dos regiones fueron distinguibles en los hígados sometidos a hepatectomía: el sitio de lesión isquémica que se generó como consecuencia de la disección, y el cual se encontró en los análisis histológicos que contenía el tejido necrótico así como células apoptóticas (**Fig. 3E**), cuyo tamaño gradualmente descendió durante la regeneración; y el resto del hígado, el cual incrementó en tamaño para compensar la pérdida de tejido diseccionado. El descenso en el tamaño del sitio de lesión isquémica en los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* era significativamente más rápido que el de los ratones control (**Fig. 3A-C**), sugiriendo que la ausencia de caspasa-8 en los hepatocitos promueve la curación rápida o adsorción del tejido a ese sitio.

Ejemplo 4. Efectos de la Deficiencia de Caspasa-8 en Hepatocitos sobre la Recuperación de PHx: Proliferación de Hepatocito Tardía Persistente.

Sorprendentemente, aunque la respuesta proliferativa inicial de los hepatocitos deficientes en caspasa-8 fue más suave que la de los hepatocitos normales, el incremento en el tamaño en el resto del hígado en los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* no fue más lento que el de los compañeros de camada control, pero significativamente más rápido. Además, mientras que el hígado en los ratones control paraba el crecimiento una vez alcanzado su tamaño original, el tamaño eventual del hígado en los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* era significativamente mayor que el normal (**Fig. 3D**), alcanzando el 120% del tamaño pre PHx.

Sobre la valoración de la proliferación de hepatocito en una fase más tardía después de la hepatectomía, se encontró que mientras que en los ratones control la proliferación celular en el hígado había remitido después de la explosión inicial, la proliferación de los hepatocitos de los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* persistía durante varias semanas después de la disección; por tanto finalmente, a pesar de su supresión inicial, excedía significativamente al de los ratones normales (**Fig. 2A** paneles inferiores, y **2B**). Se observó un aumento post PHx persistente tardío similar en los niveles de hepatocito de la ciclina A y E (**Fig. 2D**).

Ejemplo 5. Efectos de la Deficiencia de Caspasa-8 en Hepatocitos sobre la Recuperación de PHx: Una Respuesta Inflamatoria Crónica. La presente observación de que los hepatocitos de *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* continuaban proliferando mucho después de PHx parecería concordar con el continuo incremento del tamaño del hígado en estos ratones en la fase tardía después de hepatectomía. Sin embargo, el hecho de que este incremento de volumen más rápido sea ya perceptible unos pocos días después de la hepatectomía (**Fig. 3D**), cuando el índice de proliferación de los hepatocitos deficientes en caspasa-8 era incluso más bajo de lo normal, sugiere que los factores adicionales contribuyen también a esta diferencia.

Un protocolo de MRI funcional combinado con hipercapnia e hiperoxia proporciona una medida sensible de la perfusión y las alteraciones hemodinámicas resultantes a partir de una diversidad de cambios patológicos (Barash et al., 2006). En este estudio, en ratones control se siguió la PHx mediante un descenso en tanto ΔScO_2 como ΔSO_2 , que refleja un descenso en la vascularización del hígado y el contenido de sangre. Por el contrario, en los hígados de ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre*, 4 días después de la PHx se incrementaron ambos parámetros (**Fig. 4**), como resultado del volumen y el flujo de sangre incrementado. Dicho incremento se encontró que se daba en la asociación con un estado inflamatorio (Barash H, datos no publicados). Análisis histológicos revelaron en efecto una acumulación masiva de leucocitos en los hígados de los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* sometidos a hepatectomía, indicativo de inflamación. La tinción con el anticuerpo anti F4/80 indicó que los leucocitos de acumulación son macrófagos (**Fig. 5A, B**). El análisis tipo Western reveló un incremento significativo de STAT-3 fosforilada, una proteína de señalización activada durante la inflamación, en los hígados de los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* (**Fig. 5C**).

Tal como se ha mencionado anteriormente, también se observaron la inflamación y la proliferación de hepatocito aumentada en los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* después de su infección con *L. monocytogenes* (**Fig. 1D, E, H, I**). Nuestros ratones se mantuvieron en una instalación libre de patógeno; no obstante, en vista de este efecto de la infección con *Listeria* se intenta excluir además la posibilidad de que la inflamación y el crecimiento de hígado aumentado observado después de PHx reflejen un efecto de algún patógeno que ha escapado a nuestro conocimiento. Por consiguiente, los experimentos se repitieron con ratones que se volvieron a obtener por cesárea, se colocaron con madres gnotobióticas Foster, y a continuación se mantuvieron en aisladores libres de gérmenes. Se encontró que la hepatectomía parcial de estos ratones reobtenidos inició el mismo estado inflamatorio crónico como el observado antes de la reobtención (datos no mostrados).

Ejemplo 6. Efectos de la Deficiencia de Caspasa-8 en Hepatocitos sobre la Recuperación de Hepatectomía Parcial: la Proliferación de Hepatocito Tardía Persistente se da como Consecuencia de la Respuesta Inflamatoria Crónica. Análisis histológico comparativo de diferentes secciones a partir de los hígados de ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* sometidos a hepatectomía durante el tiempo de la proliferación de hepatocito persistente reveló que la variación entre secciones en la extensión del crecimiento celular se correlacionaba con los números de macrófagos que se acumularon en las correspondientes regiones (**Fig. 5B**), sugiriendo que esa proliferación de hepatocito y el estado inflamatorio del hígado están causalmente relacionados. Para examinar más esta relación los ratones se inyectaron con cloruro de gadolinio, un agente que inducen la reducción de células de Kupffer (Canbay et al., 2003), en los días 10 y 12 después de PHx, el tiempo al cual la inflamación alcanzó su climax. Tal como se muestra en la **Fig. 5B** (panel inferior) y **Fig. 6**, además de descender sustancialmente las células inflamatorias que se habían acumulado en los hígados de *Casp8^{F/-}: Alb-Cre*, este tratamiento también erradica prácticamente el incremento en la proliferación de hepatocito en estos ratones. Además, se redujo el incremento excesivo en el tamaño de sus hígados (probablemente debido en parte a un incremento relacionado con la inflamación en el volumen y flujo de sangre y en los números de célula de Kupffer, y en parte a un incremento en el número de hepatocito que principalmente se da a ese tiempo). Estos descubrimientos indican que el crecimiento consecutivo de los hepatocitos en los ratones *Casp8^{F/-}: Alb-Cre* en una fase tardía después de hepatectomía es una consecuencia de la inflamación persistente que se da en sus hígados.

REFERENCIAS

- Abramovitch R, Frenkiel D., Neeman M. Analysis of subcutaneous angiogenesis by gradient echo magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Med.*; 39:813-824 (1998).
- 5 Abramovitch R., Dafni H., Smouha E., Benjamin LE, Neeman M. In vivo prediction of vascular susceptibility to vascular susceptibility endothelial growth factor withdrawal: magnetic resonance imaging of C6 rat glioma in nude mice. *Cancer Res.* 59:5012-5016 (1999).
- Adachi M., Suematsu S., Kondo T., Ogasawara J., Tanaka T., Yoshida N., Nagata S. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat. Genet.* 11:294-300 (1995).
- 10 Alam A., Cohen LY, Aouad S., Sekaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp. Med.* 190:1879-1890 (1999).
- Anders RA, Subudhi SK, Wang J., Pfeffer K., Fu YX. Contribution of the lymphotoxin beta receptor to liver regeneration. *J. Immunol.* 175:1295-1300 (2005).
- 15 Barash H., Gross E., Matot I., Edrei Y., Tsarfaty G., Spira G., Vlodavsky I., et al. Functional MRI during hypercapnia and hyperoxia: a non-invasive monitoring tool for changes in liver perfusion and hemodynamics in a rat model. *Radiology* (in press) 2006.
- Beisner DR., Ch'en IL, Kolla RV, Hoffmann A., Hedrick SM. Cutting edge: innate immunity conferred by B cells is regulated by caspase-8. *J. Immunol.* 175:3469-3473 (2005).
- 20 Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815 (1996).
- Canbay A., Feldstein AE, Higuchi H., Weneburg N., Grambihler A., Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *HEPATOLOGY* 38:1188-1198 (2003).
- Chun HJ, Zheng L., Ahmad M., Wang J., Speirs CK, Siegel RM, Dale JK et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419:395-399 (2002).
- 25 Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* 174:160-171 (2000).
- Fausto N., Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *HEPATOLOGY* 43:S45-53 (2006).
- Fiume L., Di Stefano G., Busi C., Mattioli A., Bonino F., Torrani-Cerenzia M., Verme G., Rapicetta M., Bertini M., Gervasi GB. Liver targeting of antiviral nucleoside analogues through the asialoglycoprotein receptor. *J. Viral Hepat.* 1997;4(6):363-70. Review.
- 30 Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J. Invest. Surg.* 16:99-102 (2003).
- Groman EV, Enriquez PM, Jung C., Josephson L. Related Arabinogalactan for hepatic drug delivery. *Bioconjug Chem.* 5(6):547-56 (1994).
- 35 Gruenheid S., Gros P. Related Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Curr. Opin. Microbiol* Feb;3(1):43-8 (2000).
- Higgins GM AR. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 1931; 12:186-202.
- Hunter T., Hunt T., Jackson RJ, Robertson HD. The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 250(2):409-17 (1975).
- 40 Kang TB, Ben-Moshe T., Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y., Yogev N., Jurewicz A., Waisman A., et al. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J. Immunol.* 173:2976-2984 (2004).
- Kellendonk C., Opherk C., Anlag K., Schutz G., Tronche F. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis* 26:151-53 (2000).

- Kennedy NJ, Kataoka T., Tschopp J., Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 190:1891-1896 (1999).
- Lee DS, Gil WH, Lee HH, et al. Factors affecting graft survival after living donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 36:2255-2256 (2004).
- 5 Martinon F., Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117:561-574 (2004).
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 276:60-66 (1997).
- Muzio M., Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchencko A., Ni J., Scalfidi C., et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827 (1996).
- 10 Newton K., Harris AW, Bath ML, Smith KG, Strasser A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J* 17:706-718 (1998).
- Sakamaki K., Inoue T., Asano M., Sudo K., Kazama H., Sakagami J., Sakata S., et al. Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death Differ* 9:1196-1206 (2002).
- 15 Saleh M., Mathison JC, Wollinski MK, Bensinger SJ, Fitzgerald P., Droin N., Ulevitch RJ, et al. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* 440:1064-1068 (2006).
- Salmena L., Lemmers B., Hakem A., Matysiak-Zablocki E., Murakami K., Au PY, Berry DM, et al. Essential role for caspase 8 in T cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.* 17:883-895 (2003).
- 20 Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell.* 9:459-470 (2002).
- Steinert M., Hentschel U., Hacker J. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev.* (2):149-62 (2002).
- Su H., Bidere N., Zheng L., Cubre A., Sakai K., Dale J., Salmena L., et al. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* 307:1465-1468 (2005).
- 25 Varfolomeev EE, Schuchmann M., Luria V., Chiannikulchai N., Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D., et al. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9:267-276 (1998).
- Wallach D., Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17: 331-367 (1999).
- 30 Walsh CM, Wen BG, Chinnaiyan AM, O'Rourke K., Dixit VM, Hedrick SM. A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity* 8:439-449 (1998).
- Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J. Infect. Dis.* 185 Supl 1:S18-24 (2002).
- 35 Wu J., Nantz MH, Zern MA. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications. *Front. Biosci.* 7:d717-25. Review (2002).
- Wu YT, Jiaang WT, Lin KG, Huang CM, Chang CH, Sun YL, Fan KH, Hsu WC, Wang HE, Lin SB, Chen ST. A new N-acetylgalactosamine containing peptide as a targeting vehicle for mammalian hepatocytes via asialoglycoprotein receptor endocytosis. *Curr. Drug. Deliv.* (2):119-27 (2004).
- 40 Zhang J., Cado D., Chen A., Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392:296-300 (1998).
- Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *HEPATOLOGY* 38:326-334 (2003).

REIVINDICACIONES

1. El uso de al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - 5 (i) caspasa 8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal de los mismos;
 - (ii) un agente capaz de regular por aumento el nivel y/o la actividad de caspasa-8; y
 - (iii) un inhibidor de un inhibidor natural del nivel y/o actividad de caspasa-8 en la producción de un medicamento para prevenir y/o tratar la inflamación del hígado, en el que la inflamación se desarrolla después del daño del hígado.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el daño está causada por la resección del hígado.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 3, en la que el órgano es el hígado y el nivel y/o la actividad de caspasa-8 está regulado por disminución en hepatocitos.
4. Al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - 15 (i) caspasa-8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal de los mismos;
 - (ii) un agente capaz de regular por aumento el nivel y/o actividad de caspasa-8; y
 - (iii) un inhibidor de un inhibidor natural del nivel y/o la actividad de la caspasa-8 para usarse en la prevención y/o el tratamiento de la inflamación del hígado, en el que la inflamación se desarrolla después del daño del hígado.
- 20 5. El agente para usarse de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el daño está causada por la resección del hígado.
6. El agente para usarse de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en la que el órgano es el hígado y el nivel y/o actividad de caspasa-8 está regulada por disminución en hepatocitos.
7. El uso de al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - 25 (i) caspasa-8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal de los mismos;
 - (ii) un agente capaz de regular por aumento el nivel y/o actividad de caspasa-8; y
 - (iii) un inhibidor de un inhibidor natural del nivel y/o la actividad de caspasa-8 en la producción de un medicamento para tratar una infección causada por un patógeno intracelular, en el que el patógeno intracelular se selecciona entre Mycobacteria, Listeria, Leishmania, Legionella y Salmonella y en el que la infección se desarrolla en el hígado.
- 30 8. Al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - (i) caspasa-8 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal de los mismos;
 - 35 (ii) un agente capaz de regular por aumento el nivel y/o actividad de la caspasa-8; y
 - (iii) un inhibidor de un inhibidor natural del nivel y/o la actividad de caspasa-8 para usarse en el tratamiento de una infección causada por un patógeno intracelular, en el que el patógeno intracelular se selecciona entre Mycobacteria, Listeria, Leishmania, Legionella y Salmonella y en el que la infección se desarrolla en el hígado.
- 40 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la infección está causada por Listeria.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la Listeria es Listeria monocytogenes.
11. El agente para usarse de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la infección está causada por Listeria.

12. El agente para usarse de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la Listeria es *Listeria monocytogenes*.

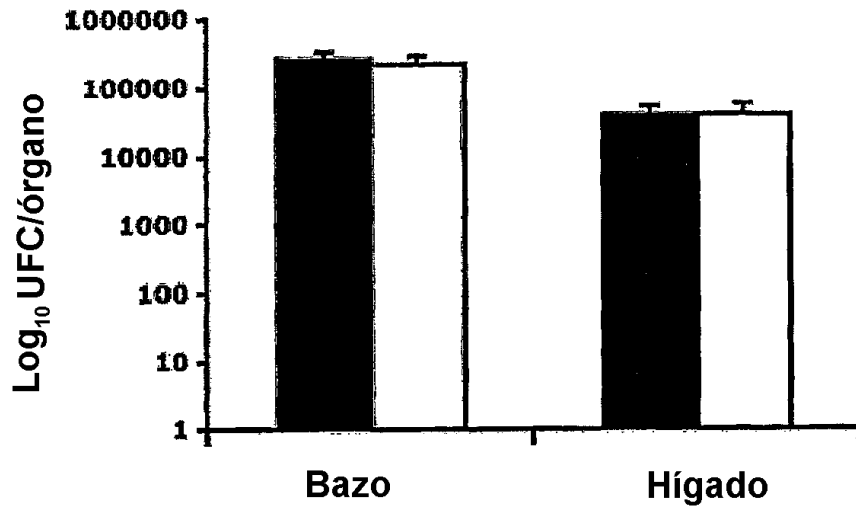


Fig. 1A

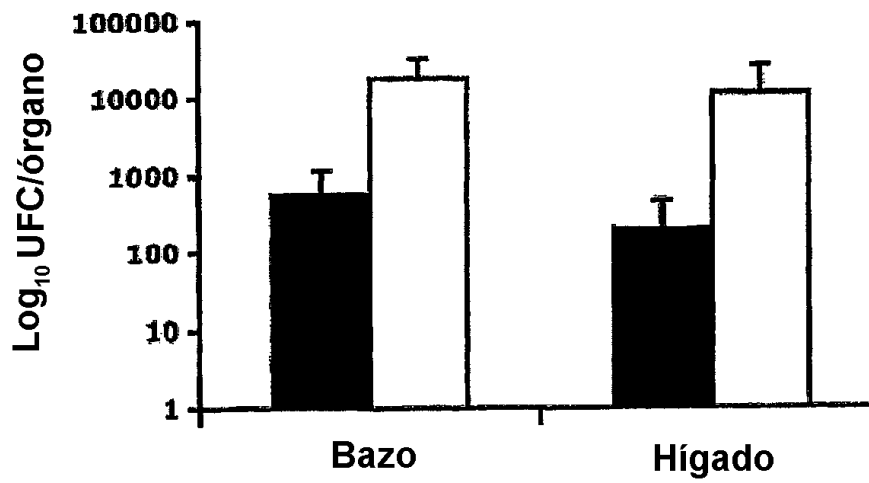


Fig. 1B

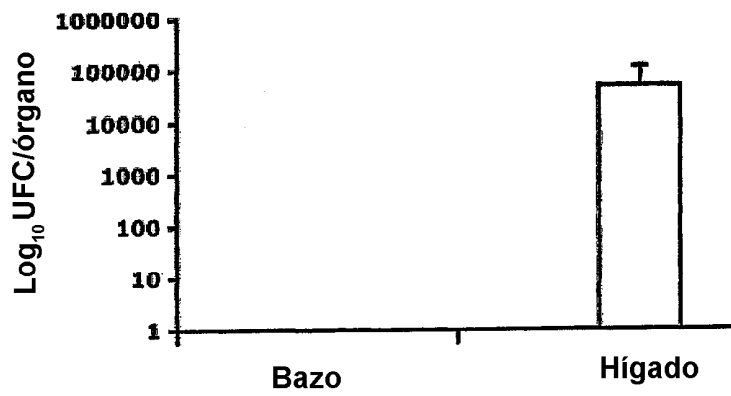


Fig. 1C

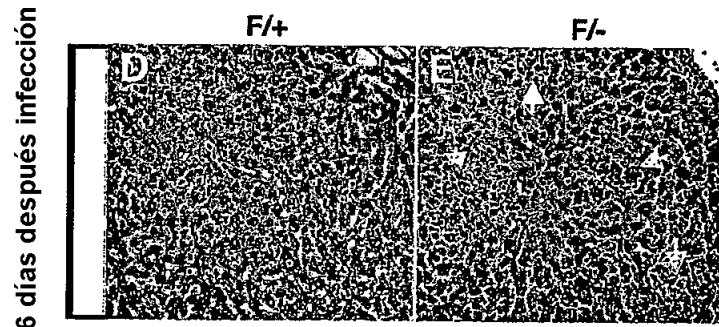


Fig. 1D

Fig. 1E

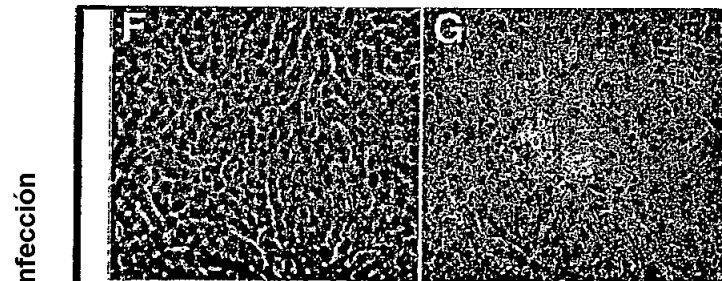


Fig. 1F

Fig. 1G

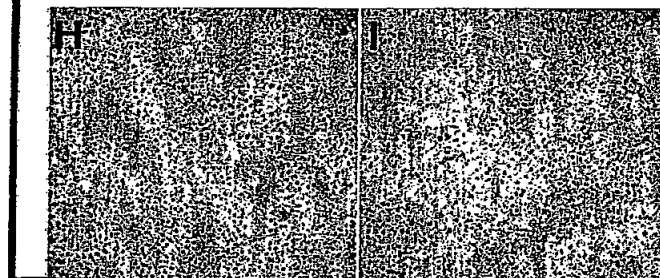


Fig. 1H

Fig. 1I

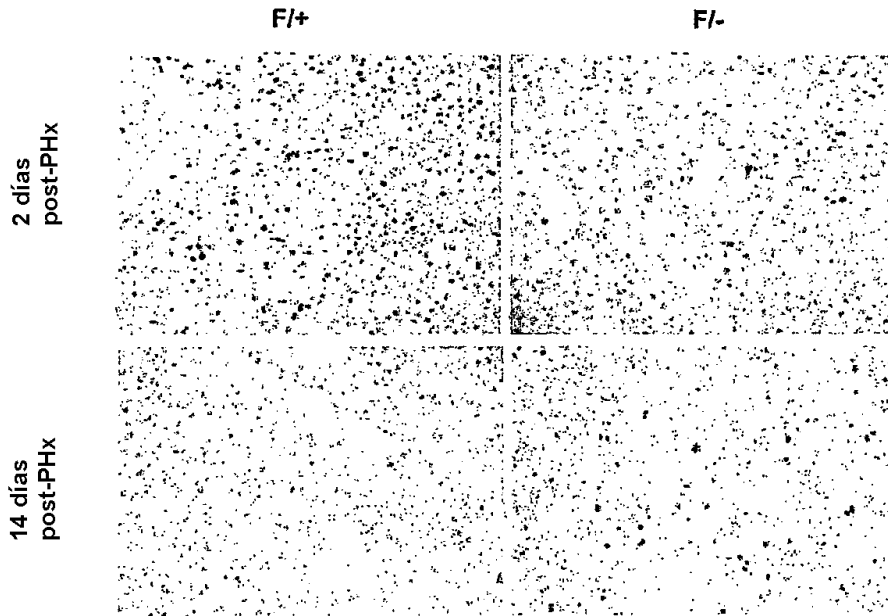


Fig. 2A

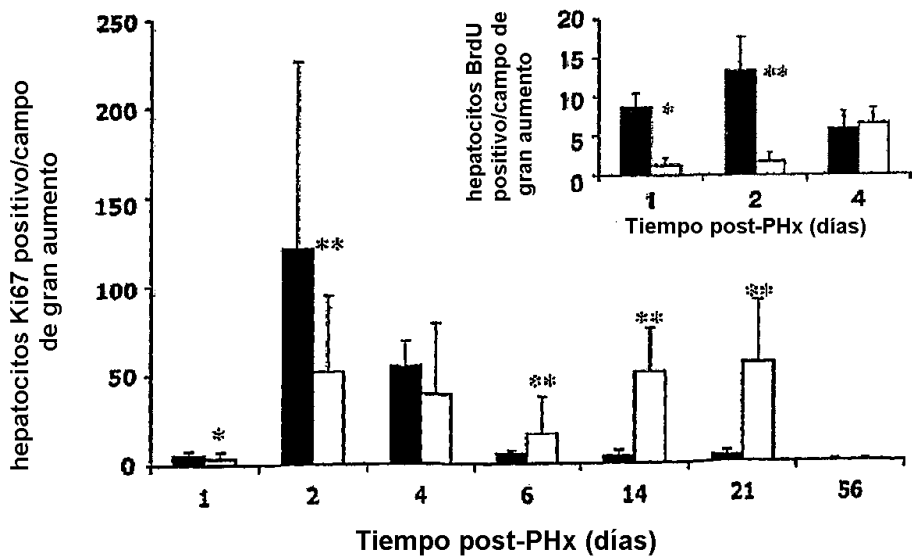


Fig. 2B

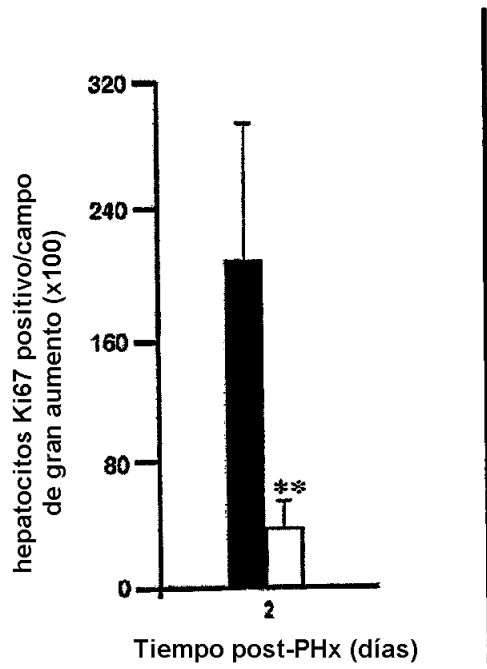


Fig. 2C

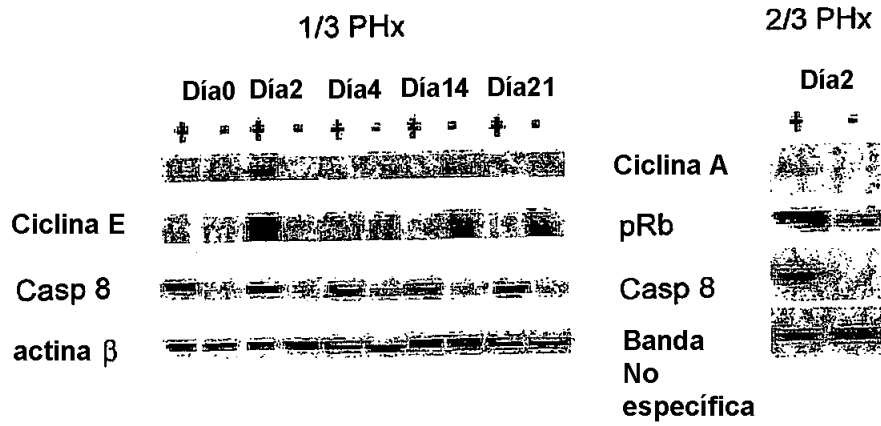


Fig. 2D

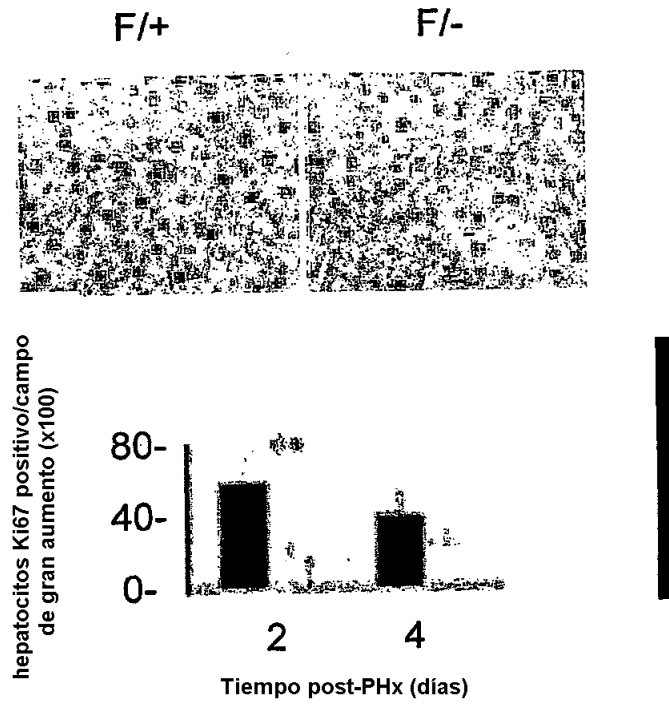


Fig. 2E

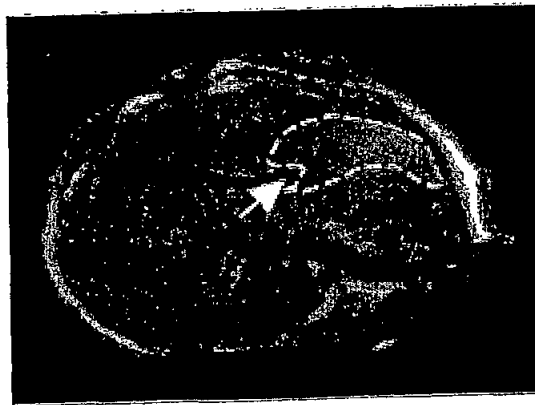


Fig. 3A

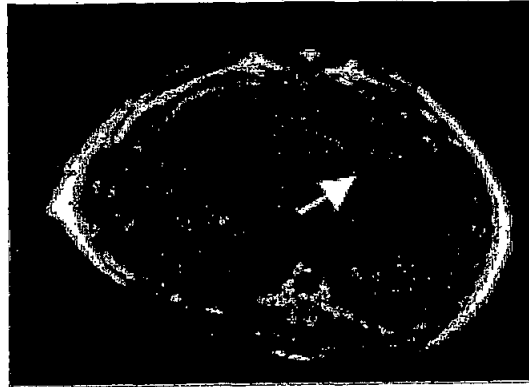


Fig. 3B

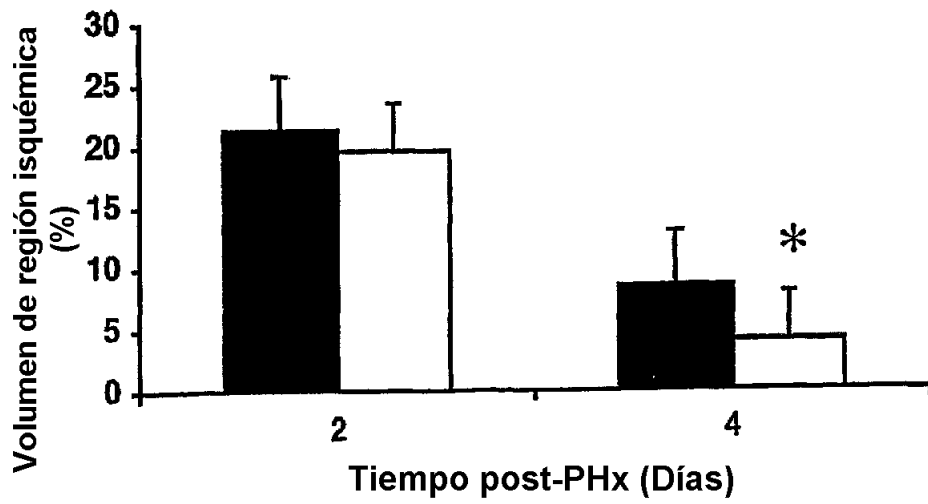


Fig. 3C

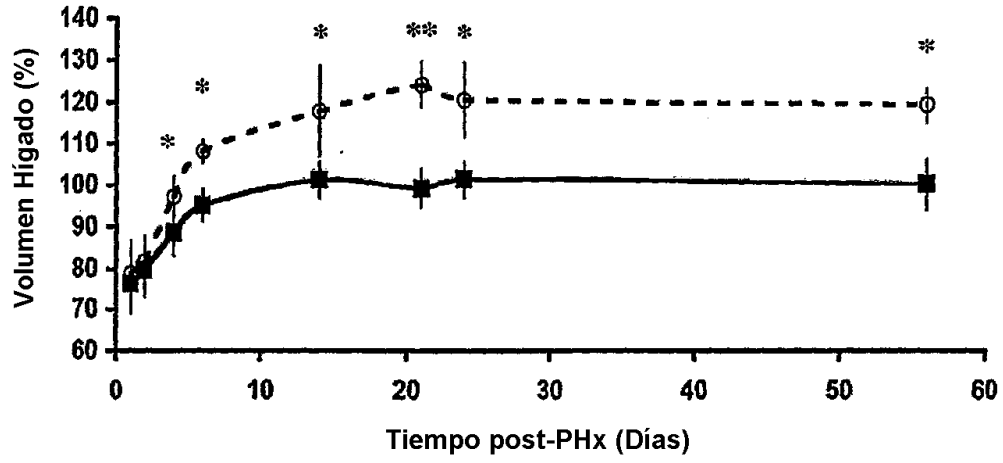


Fig. 3D

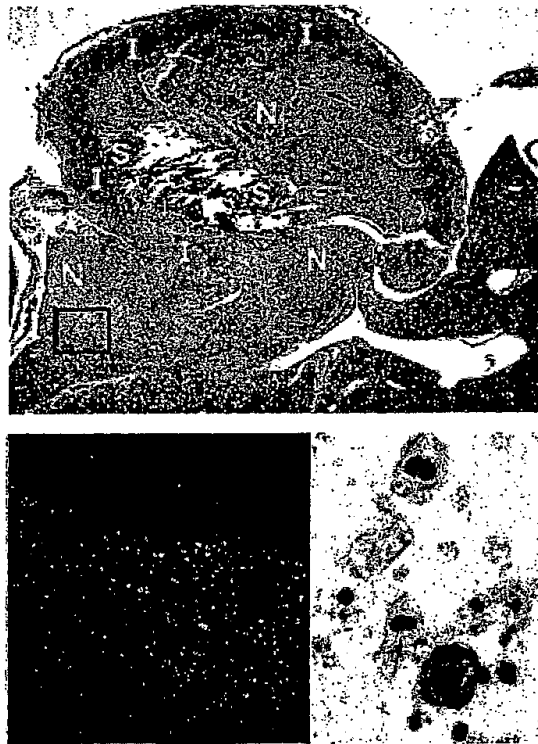


Fig. 3E

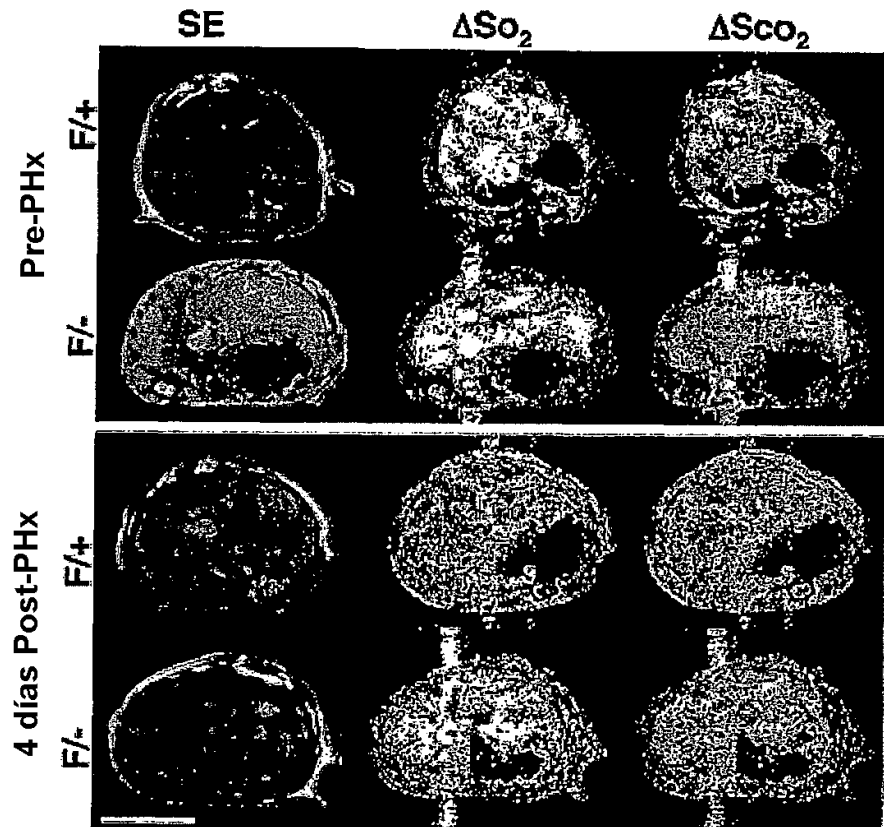


Fig. 4A

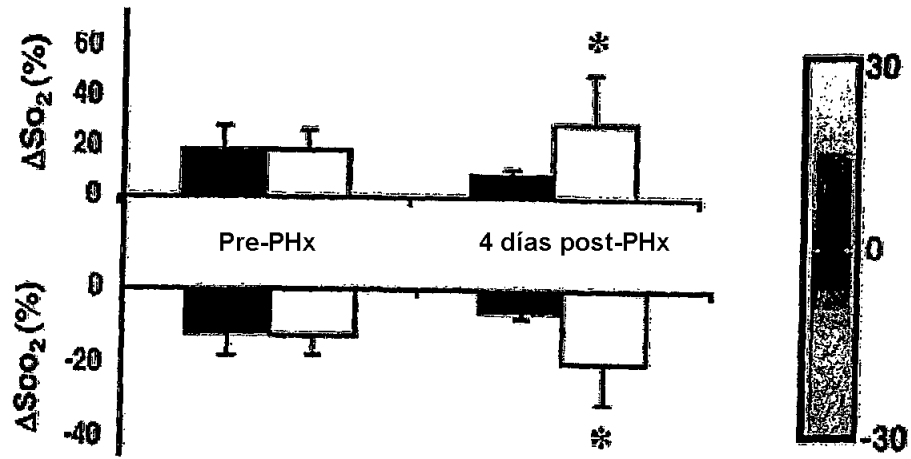


Fig. 4B

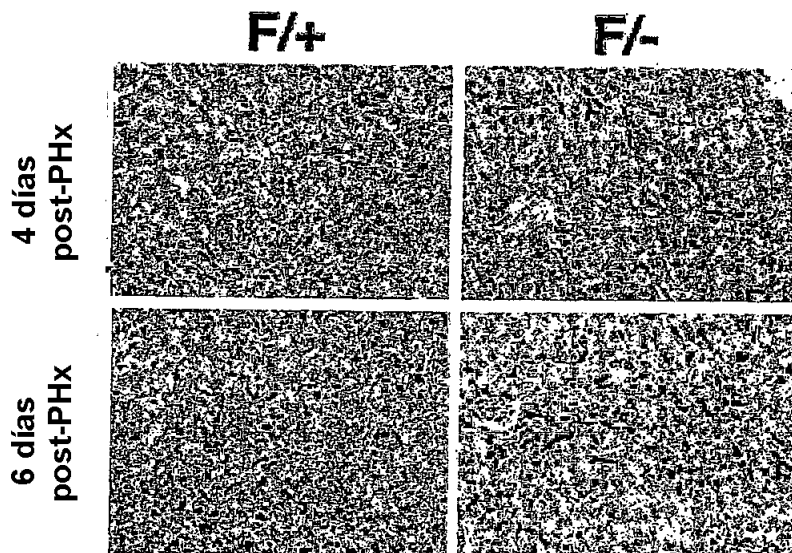


Fig. 5A

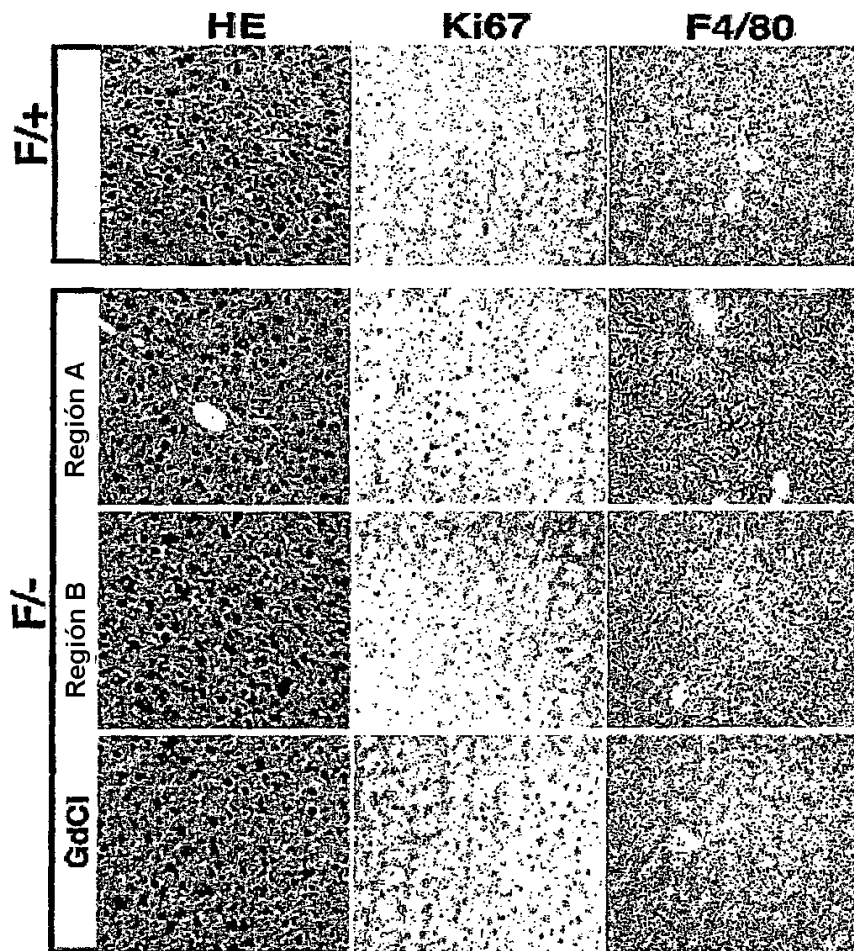


Fig. 5B

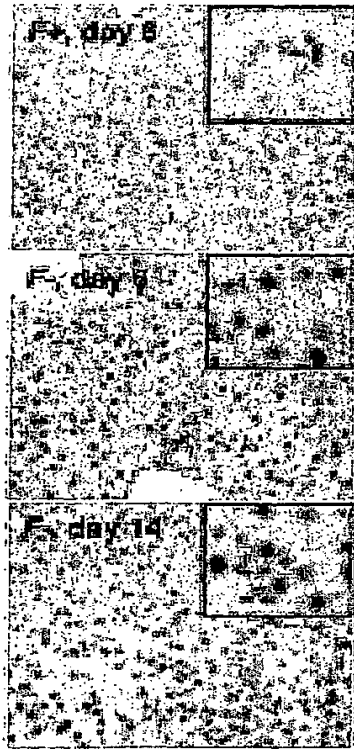
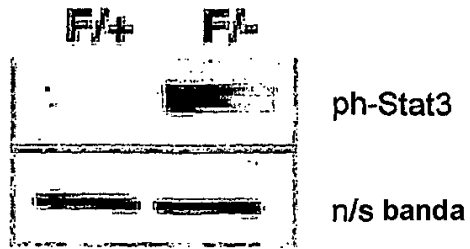


Fig. 5C

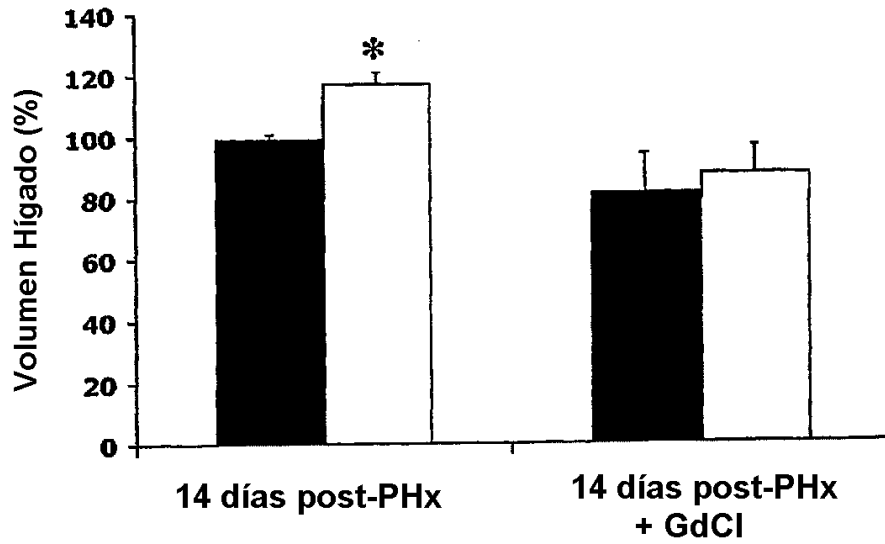


Fig. 6A

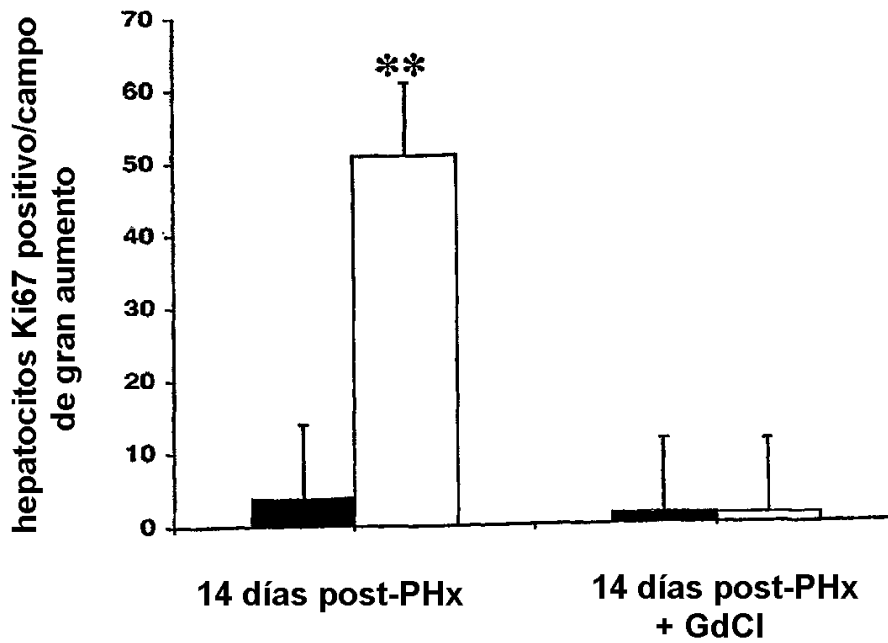


Fig. 6B