

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 050**

51 Int. Cl.:

A61K 38/03 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 3/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2002 E 09004579 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2186524**

54 Título: **Uso de hepcidina para preparar un medicamento para tratar trastornos de la homeostasis del hierro**

30 Prioridad:

25.05.2001 EP 01401377

14.06.2001 EP 01401537

29.03.2002 EP 02290795

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

07.12.2018

73 Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (100.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR

72 Inventor/es:

NICOLAS, GAËL;

VAULONT, SOPHIE y

KAHN, AXEL

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

ES 2 693 050 T3

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

DESCRIPCIÓN**Uso de hepcidina para preparar un medicamento para tratar trastornos de la homeostasis del hierro**

5

La invención hace referencia al diagnóstico y a la terapia de los trastornos de la homeostasis del hierro.

10 El hierro es un elemento esencial necesario para el crecimiento y la supervivencia de casi todos los organismos. En mamíferos, el equilibrio del hierro se regula principalmente a nivel de la absorción duodenal del hierro alimenticio. Después de la absorción, el hierro férrico se carga en la apo-transferrina en la circulación y se transporta a los tejidos, incluyendo precursores eritroides, donde se capta por endocitosis mediada por el receptor de transferrina. Los macrófagos reticuloendoteliales desempeñan un papel importante en el reciclaje de hierro de la degradación de hemoglobina de eritrocitos senescentes, mientras que los hepatocitos contienen la mayor parte de las reservas de hierro del organismo en polímeros de ferritina. Durante los últimos cinco años, ha surgido un importante conjunto de información con respecto a las proteínas implicadas en la absorción del hierro y en la regulación de la homeostasis del hierro a partir del estudio de defectos hereditarios, tanto en seres humanos como en ratones, que conducen a distintos trastornos del hierro (para una revisión véase *ANDREWS, Nat. Rev. Genet., 1, 208-217, 2000*). En el caso de deficiencia de hierro, las consecuencias fisiopatológicas de defectos génicos identificados se comprenden bien, ya que habitualmente dan como resultado la pérdida de función de proteínas directamente implicadas en la ruta de la absorción del hierro. Las proteínas incluyen los transportadores de hierro DMT1 (también denominados Nramp2 o DCT1) (*FLEMING et al., Nat. Genet., 16, 383-386, 1997*; *GUNSHIN et al., Nature, 388, 482-488, 1997*), ferroportina (también denominada IREG1 o MTP1) (*DONOVAN et al., Nature, 403, 776-781, 2000*) y oxidasas de cobre acopladas a ferroportina, concretamente ceruloplasmina (*HARRIS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 10812-10817, 1999*; *YOSHIDA et al., Nat. Genet., 9, 267-272, 1995*) y hefastina (*VULPE et al., Nat. Genet., 21, 195-199, 1999*).

30 Por el contrario, varias anomalías asociadas con la sobrecarga de hierro genética han identificado diversas proteínas cuyo papel funcional en el control de la homeostasis del hierro continúa sin comprenderse bien. En seres humanos, la hemocromatosis hereditaria (HH) es una enfermedad genética autosómica recesiva común causada por hiperabsorción de hierro alimenticio, que conduce a una sobrecarga de hierro en el plasma y múltiples órganos, incluyendo en particular el páncreas, el hígado y la piel y dando como resultado lesiones en estos órganos y tejidos debido a los depósitos de hierro.

35 La hemocromatosis se debe habitualmente a una mutación en el gen de la hemocromatosis (denominado HFE) asociado a HLA localizado en el cromosoma 6p y la mayoría de los pacientes son homocigóticos para la mutación C282Y en HFE (*FEDER et al., Nat. Genet., 13, 399-408, 1996*). Además, se han implicado otros loci en diferentes familias con HH: se ha descrito una mutación sin sentido en el gen del receptor 2 de la transferrina (TRF2) en 7q en dos familias con HH no asociadas a HLA (*CAMASCHELLA et al., Nat. Genet., 25, 14-15, 2000*) y recientemente se ha mapeado un locus para hemocromatosis juvenil en el brazo cromosómico 1q (HFE2). Finalmente, aunque se conoce desde hace tiempo que la absorción del hierro se regula en respuesta al nivel de las reservas de hierro del cuerpo y a la cantidad de hierro necesaria para la eritropoyesis (*ROY et al., FEBS Lett., 484, 271-274, 2000*), todavía se tiene que identificar la naturaleza molecular de las señales que programan las células intestinales para regular la absorción del hierro.

50 Recientemente se han descrito la alteración del gen murino que codifica el factor de transcripción *USF2* y sus consecuencias en la regulación génica dependiente de glucosa en el hígado (*VALLET et al., J. Biol. Chem., 272, 21944-21949, 1997*).

55 Los inventores han observado ahora que, sorprendentemente, los ratones *Usf2* ^{-/-} desarrollan sobrecarga de hierro multivisceral que evita solamente el bazo cuyo contenido de hierro es extraordinariamente inferior en animales knock-out que en controles. Estos trastornos metabólicos del hierro se parecen a los observados en hemocromatosis hereditaria. Sin embargo, no se observó alteración en genes identificados previamente por su implicación en esta patología, por ejemplo, HFE o *TFR2*. Por tanto, los inventores buscaron nuevos genes candidatos que puedan explicar las anomalías de la homeostasis del hierro en ratones *Usf2* ^{-/-} mediante hibridación sustractiva supresora entre hígados de ratones *Usf2* ^{-/-} y ratones de tipo silvestre. Esto permitió aislar un ADNc que codifica el péptido hepcidina.

60 La hepcidina (también denominada LEAP-1, por péptido antimicrobiano expresado en hígado) se purificó recientemente de ultra filtrado de sangre humana y de orina y se observó que era un péptido unido por enlaces disulfuro que muestra actividad antimicrobiana (*KRAUSE et al., FEBS Lett., 480, 147-150, 2000*; *PARK et al., J. Biol. Chem., 276, 7806-7810, 2001*). La proteína se sintetiza en el hígado en forma de un propéptido que contiene 83 aminoácidos y se convierte en péptidos maduros de 20, 22 ó 25 aminoácidos (*PARK et al., J. Biol. Chem., 276, 7806-7810, 2001*; *PIGEON et al., J. Biol. Chem., 276, 7811-7819, 2001*). También se describió recientemente que la hepcidina se sintetiza de manera elevada en hígados de ratones sobrecargados con hierro experimentalmente o espontáneamente (*PIGEON et al., J. Biol. Chem., 276,*

7811-7819, 2001). Aunque se cuestionó la relación de esta sobre-expresión con la sobrecarga de hierro, se indicó que probablemente se producía como resultado de inflamación relacionada con sobrecarga crónica de hierro.

5 Por el contrario, los Inventores han demostrado ahora que un defecto completo en la expresión de hepcidina conduce a sobrecarga progresiva de hierro en los tejidos en ratones *Usp2*^{-/-}. Además, han obtenido ratones transgénicos que tienen un transgén que expresa hepcidina bajo el control de un promotor constitutivo específico del hígado y han observado que dichos ratones transgénicos estaban gravemente anémicos.

10 Estos hallazgos permiten proponer nuevos medios de regulación de la homeostasis del hierro, en particular mediante la regulación de la captura del hierro alimenticio por el intestino o del transporte del hierro materno-fetal a través de la barrera placentaria y del reciclaje del hierro por macrófagos reticuloendoteliales.

15 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido para su uso en un procedimiento de tratamiento para reducir la sobrecarga de hierro, en el que dicho polipéptido comprende una secuencia de 20 aminoácidos que tiene:

- 20
- al menos el 50% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1,
 - restos de cisteína en las posiciones 2, 5, 6, 8, 9, 14, 17 y 18, y

en donde el polipéptido es capaz de reducir la absorción de hierro.

25 También pueden usarse polipéptidos quiméricos, que comprenden la secuencia de una forma madura de hepcidina, (y finalmente, toda de parte de la secuencia pro o prepro).

En una realización, el polipéptido es un homólogo de vertebrado de una forma madura de hepcidina humana. En una realización, el homólogo de vertebrado es un homólogo de mamífero.

30 En una realización, el polipéptido es un polipéptido de 25 aminoácidos que tiene la secuencia SEQ ID NO: 3. Los homólogos de vertebrados conocidos de hepcidina humana incluyen, por ejemplo, hepcidina de rata, hepcidina de ratón, hepcidina de trucha.

35 También se pueden usar polipéptidos quiméricos que comprenden la secuencia de una forma madura de hepcidina (y eventualmente, toda la parte de la pro o de la secuencia previa).

40 La invención también abarca el uso de equivalentes funcionales de los polipéptidos definidos anteriormente. Los equivalentes funcionales se definen en el presente documento como variantes peptídicas u otros compuestos que tienen la misma actividad funcional que las formas maduras de hepcidina. Los ejemplos de tales equivalentes funcionales incluyen compuestos químicos que se modelan para imitar la estructura tridimensional de cualquiera de los polipéptidos que tienen la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3. De particular interés son los derivados de dichos polipéptidos que tienen una estabilidad y una semivida biológica mejorada. Ejemplos clásicos de tales derivados son, por ejemplo, péptidos "retro-inversos", en los que la secuencia de los aminoácidos se invierte, y los L-aminoácidos se reemplazan por D-aminoácidos.

45 Todos estos polipéptidos y ácidos nucleicos pueden obtenerse por procedimientos clásicos conocidos por sí mismos. Por ejemplo, las formas de hepcidina de 20 aminoácidos y 25 aminoácidos pueden obtenerse de plasma o de orina, como se describe por *KRAUSE et al.* o *PARK et al.* Como alternativa, pueden obtenerse cultivando células que expresan hepcidina y recuperando dicho polipéptido del cultivo celular.

De acuerdo con una realización particular, dichas células son células hospedadoras transformadas por un ácido nucleico que codifica uno de los polipéptidos definidos anteriormente.

55 También puede usarse la síntesis química, en particular en el caso de los derivados peptídicos.

60 Puede obtenerse un ácido nucleico que codifica hepcidina a partir de, por ejemplo, una genoteca genómica o de ADNc de un vertebrado, usando cebadores adecuados capaces de hibridarse lectivamente con dichos ácidos nucleicos. También se puede obtener mediante las técnicas clásicas de síntesis de polinucleótidos.

La presente invención también proporciona procedimientos para seleccionar equivalentes funcionales de hepcidina capaces de reducir la absorción del hierro.

65 A modo de ejemplo, pueden seleccionarse fácilmente equivalentes funcionales que tienen las propiedades biológicas de hepcidina en la regulación de la homeostasis del hierro con animales, en especial con mamíferos no humanos que carecen de hepcidina.

En particular, un procedimiento para seleccionar equivalentes funcionales de hepcidina capaces de reducir la absorción del hierro comprende las siguientes etapas:

- 5
- administrar un compuesto a ensayar para su capacidad para reducir la absorción de hierro a un animal knock-out deficiente en expresión de hepcidina.
 - determinar el efecto de dicho compuesto en la sobrecarga de hierro en dicho animal.

Los medicamentos obtenidos de acuerdo con la invención son útiles para prevenir y/o tratar:

- 10
- todas las formas de hemocromatosis;
 - la sobrecarga secundaria de hierro, relacionada, por ejemplo, con anemias hereditarias y/o congénitas como la talasemia;
- 15
- y enfermedades asociadas con las mismas. Estas últimas enfermedades incluyen, por ejemplo, hepatocarcinoma, cardiomiopatía o diabetes.

20

De acuerdo con otro aspecto, la invención también propone el uso de un inhibidor de la expresión de hepcidina o tal y como se reivindica de la actividad de hepcidina tal y como se reivindica para preparar un medicamento útil para aumentar la absorción de hierro mediante el aumento de la captura de hierro alimenticio por el intestino y/o el aumento del reciclaje del hierro por los macrófagos. Dicho medicamento es útil para tratar anemia o enfermedades relacionadas con anemia. Lo anterior incluye en particular anemia asociada con enfermedades agudas o crónicas que se produce en condiciones tales como infección o inflamación, por ejemplo, enfermedades osteoarticulares tales como poliartritis reumatoide o tumores malignos, especialmente cuando están asociadas con un síndrome inflamatorio.

25

Los inhibidores de la expresión de hepcidina incluyen por ejemplo, moléculas de ARN o ADN antisentido, o ribozimas.

30

Los inhibidores de la actividad de hepcidina incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-hepcidina, en particular anticuerpos dirigidos contra las formas maduras de hepcidina.

35

Los inhibidores de la actividad de hepcidina incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-hepcidina, en particular anticuerpos dirigidos contra las formas maduras de hepcidina.

La presente descripción también proporciona procedimientos para seleccionar otros inhibidores de actividad de la hepcidina, por ejemplo, con animales transgénicos, en particular mamíferos transgénicos no humanos tales como ratones transgénicos que tienen un transgén que expresa hepcidina, induciendo dicha expresión anemia en el animal.

40

Por ejemplo, un procedimiento para seleccionar inhibidores de la actividad de hepcidina capaces de aumentar la absorción de hierro comprende los siguientes pasos:

- 45
- administrar un compuesto a ensayar para su capacidad de aumentar la absorción de hierro mediante la inhibición de la actividad de hepcidina a un animal transgénico que tiene un transgén que expresa hepcidina.
 - determinar el efecto de dicho compuesto sobre la anemia en dicho animal.
- 50

Los medicamentos obtenidos de acuerdo con la invención pueden administrarse de diversas maneras, dependiendo de su naturaleza:

55

Por ejemplo, los polipéptidos de hepcidina según la reivindicación 1, así como los inhibidores de hepcidina como se definen en la reivindicación 6, tales como anticuerpos anti-hepcidina, pueden administrarse por sí solos o mezclados con transportadores o excipientes adecuados. Pueden usarse por vía sistémica o por vía local. Una vía de administración preferida es la vía parenteral, que incluye, por ejemplo, inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas o intraperitoneales.

60

La vía oral también puede usarse, a condición de que el medicamento esté en una forma adecuada para administración oral, capaz de proteger el principio activo de las enzimas gástricas e intestinales.

65

Como se ha indicado anteriormente, también puede usarse una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos de hepcidina que se han mencionado anteriormente, para permitir la expresión de dicho polipéptido en las células o de un ácido nucleico transcrito en un ARN antisentido, para suprimir la expresión de hepcidina en las células de un sujeto a tratar.

En este caso, dicha molécula de ácido nucleico se introduce en las células diana mediante las técnicas clásicas de transferencia de genes.

5 Habitualmente, la molécula de ácido nucleico se pone bajo control transcripcional de un promotor apropiado. La elección del promotor depende del uso deseado del medicamento y/o del órgano o tejido diana. Por tanto, puede elegirse un promotor constitutivo o inducible y/o ubicuo o específico de tejido.

10 El casete de expresión obtenido de esta manera puede transferirse directamente a las células como ADN desnudo, o ponerse en un vector apropiado, tal como un vector viral, por ejemplo, un vector obtenido de adenovirus.

15 La elección del procedimiento de transferencia y/o del vector depende del órgano o tejido diana y/o de si se desea una expresión a corto plazo (expresión transitoria) o una expresión estable.

La transferencia de genes puede realizarse ex vivo en células extraídas del sujeto a tratar y reimplantadas posteriormente en dicho sujeto, o puede realizarse por administración directa del ácido nucleico a dicho sujeto.

20 La invención también describe animales no humanos modificados genéticamente, en los que la modificación genética da como resultado una anomalía en la expresión de hepcidina. La invención también incluye material biológico, tal como células, tejidos y órganos obtenidos de dichos animales modificados genéticamente.

25 Esto comprende en particular animales knock-out, preferiblemente mamíferos knock-out y en particular ratones knock-out que no expresan hepcidina funcional. Esta falta de expresión de hepcidina induce una sobrecarga de hierro en dichos animales. Los ratones knock-out conocidos, descritos por VALLET *et al.* (*J. Biol. Chem.*, 272, 21944-21949, 1997), en los que el gen que codifica el factor de transcripción *USF2* está inactivado, están excluidos.

30 Los animales knock-out de la invención pueden obtenerse por inactivación total o parcial del gen o los genes de la hepcidina, dando como resultado dicha inactivación la ausencia de producción de hepcidina o una pérdida de funcionalidad de la misma.

35 La inactivación del gen de hepcidina puede tener como objetivo:

- la secuencia que codifica hepcidina, que da como resultado la ausencia de producción de dicha proteína, o una pérdida de funcionalidad de la misma, y / o

40 - al menos una de las secuencias reguladoras que controlan la expresión de hepcidina, que da como resultado una falta de producción de hepcidina, o una disminución drástica de la cantidad de hepcidina producida.

45 Otros animales modificados genéticamente de la invención que tienen una anomalía en la expresión de hepcidina son animales transgénicos, preferiblemente mamíferos transgénicos y en particular ratones transgénicos, que tienen un transgén que expresa hepcidina, produciendo dicha expresión anemia en dichos animales.

50 Se conocen bien en la técnica los procedimientos adecuados para la preparación de animales transgénicos o knock-out, descritos, por ejemplo, en: *Manipulating the Mouse Embryo, 2a Ed.*, de HOGAN *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994; *Transgenic Animal Technology*, editado por C. PINKERT, Academic Press Inc., 1994; *Gene Targeting: A Practical Approach*, editado por A.L. JOYNER, Oxford University Press, 1995; *Strategies in Transgenic Animal Science*, editado por G.M. MONASTERSKY y J. M. ROBL, ASM Press, 1995; *Mouse Genetics: Concepts and Applications*, de Lee M. SILVER, Oxford University Press, 55 1995.

60 Los animales knock-out que expresan hepcidina no funcional, así como los animales transgénicos que tienen un transgén que expresa hepcidina, pueden usarse como modelos para estudiar los mecanismos de la homeostasis del hierro. También pueden usarse, como se ha descrito anteriormente, para explorar compuestos que tienen el mismo efecto que la hepcidina sobre la absorción del hierro, o para explorar compuestos capaces de inhibir el efecto de la hepcidina sobre la absorción del hierro.

65 La invención también proporciona procedimientos de diagnóstico para determinar si una anomalía de la absorción del hierro está asociada con una mutación en hepcidina o con una producción anormal de hepcidina.

Por ejemplo, la invención divulga:

- un procedimiento para detectar si una anomalía de absorción de hierro resulta de una producción anormal de hepcidina, donde dicho procedimiento comprende determinar la cantidad de hepcidina en una muestra biológica de un sujeto que padece dicha anomalía;

5

- un procedimiento para detectar si una anomalía de absorción de hierro está asociada con una mutación que perjudica la producción de hepcidina funcional, donde dicho procedimiento comprende detectar una mutación en el gen de hepcidina en una muestra de ácido nucleico obtenida de un sujeto que padece dicha anomalía.

10

Las muestras biológicas adecuadas para determinar la cantidad de hepcidina incluyen, por ejemplo, muestras de sangre, orina o líquido amniótico o biopsias de órganos, en particular biopsias de hígado o biopsias de placenta.

15

Las muestras de ácido nucleico adecuadas para detectar una mutación que altera la producción de hepcidina funcional incluyen ARN, ADNc o ADN genómico.

20

La cantidad de hepcidina en una muestra biológica puede determinarse fácilmente mediante procedimientos bien conocidos, tales como, a modo de ejemplo, cromatografía HPLC, espectroscopía de masas o mediante inmunoensayo usando anticuerpos anti-hepcidina.

25

Las mutaciones en el gen de hepcidina pueden detectarse fácilmente secuenciando dicho gen o una parte del mismo, previamente aislado de la muestra de ADN a analizar, y comparando la secuencia con la secuencia o las secuencias de tipo silvestre correspondientes, que pueden obtenerse de uno o varios sujetos que no tienen anomalías de la homeostasis del hierro.

30

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante la siguiente descripción adicional, que se refiere a ejemplos que ilustran los efectos de la falta de producción de hepcidina en animales knock-out o de la sobreproducción de hepcidina en animales transgénicos. Debe entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se proporcionan solamente a modo de ilustración de la invención y no constituyen de ningún modo una limitación de la misma.

35

EJEMPLO 1: CARACTERÍSTICAS DE RATONES KNOCK-OUT DEFICIENTES EN EXPRESIÓN DE HEPCIDINA

Materiales y Procedimientos

40

Generación y genotipificación de ratones *Usf2* ^{-/-}

45

La alteración del gen *Usf2* se ha descrito anteriormente (VALLET et al., J. Biol. Chem., 272, 21944-21949, 1997). El alelo mutado contiene el casete IRES β geo sin promotor en el exón 7 del gen *USF2* murino. Todos los ratones estudiados tienen un fondo genético mixto que incluía contribuciones de las cepas C57BL/6 y 129/Sv. Los ratones se alimentaron con pienso para ratón de laboratorio convencional (AO3, UAR, Francia) que contenía 280 mg de carbonato férrico por kg. Se sacrificaron ratones de 2, 5 meses hasta 19 meses de edad. Se realizó el genotipado del ADN de cola de ratón usando una única reacción de PCR para identificar los alelos de tipo silvestre (TS) y knock-out para *USF2*. Se usó ADN genómico (0, 5-1 μ g) en una reacción de 50 μ l que incluía 3 cebadores: el alelo de *USF2* de tipo silvestre se amplificó usando los siguientes cebadores:

55

- directa (recocido en Intrón 6):

GCGAAGCCCTGGGTTCAATC (SEQ ID NO: 4) e

60

- inversa (recocido en Intrón 7):

GGGGTCCACCACTTCAAGAGG (SEQ ID NO: 5).

El alelo knock-out para *USF2* se amplificó usando los siguientes cebadores:

65

- directa:

GCGAAGCCCTGGGTTCAATC (SEQ ID NO: 6), e

- inversa (recocido en el marcador de selección Neo de la construcción de direccionamiento):

GAATTCTCTAGAGCGGCCGGAC (SEQ ID NO: 7).

5

La PCR se realizó del siguiente modo: 37 ciclos (consistiendo cada ciclo en 30 s a 94°C, 30 s a 56°C y 40 s a 72°C) con un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min y un paso de elongación final a 72°C durante 5 min en Tris-HCl 20 mM (pH 8, 4), KCl 50 mM, W-I al 0, 05%, MgCl₂ 2 mM, glicerol al 5%, azul de bromofenol al 0, 04%, cada dNTP 0, 2 mM, cada cebador 0, 2 μM, 2 unidades de Taq polimerasa (Gibco). La reacción se analizó en gel de agarosa al 1, 5-2% que contenía bromuro de etidio. Se observó que este procedimiento de PCR para genotipado de ratón proporciona los mismos resultados que el procedimiento de transferencia de Southern que se ha descrito anteriormente (VALLET et al., J. Biol. Chem., 272, 21944-21949, 1997).

15

Generación de una genoteca sustraída mediante Hibridación Sustractiva Supresora (SSH)

20 Se preparó ARN total como se ha descrito anteriormente (CHOMCZYNSKI y SACCHI, *Anal. Biochem.*, 162, 156-159, 1987). Se aisló ARN poliadenilado usando oligo (dT) celulosa (Boehringer Mannheim Biochemica). La SSH se realizó entre 3 ARN de hígado combinados de ratones deficientes en *USF2* homocigóticos de 5 meses de edad ('de control') y ARN de hígado de un ratón de tipo silvestre de 5 meses de edad ('de ensayo') usando el kit de sustracción de ADNc PCR-select™ (Clontech) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para todos los pasos. En resumen, se mezclaron 14 ng de ADNc de ensayo ligado y 420 ng de control no ligado, se desnaturalizaron y se dejaron re-hibridar. Después de la hibridación sustractiva, se amplificó 1 μl de ADNc mediante dos rondas de PCR. La genoteca de ADNc sustraída se clonó en el vector pT-Adv usando el kit de clonación de PCR AdvantAge™ (Clontech). Después de la PCR secundaria (15 ciclos) con la mezcla de ADNc polimerasa Advantage (Clontech), la mezcla de ADNc sustraído para PCR se incubó durante 10 min adicionales a 72°C con 1 unidad de ADN polimerasa de Taq (Gibco BRL) para maximizar la eficacia de clonación y se purificó con el kit de purificación de PCR QIAquick (Quiagen). La mezcla de ligación se introdujo en la cepa bacteriana Electromax DH10B (Gibco BRL) por electroporación (1, 8 kV) usando un Cell-Porator® (Gibco BRL). La genoteca se sembró en placas de agar de 22 x 22 cm que contenían ampicilina (100 μg/ml) y se propagó con 40 μl de X-gal (40 mg/ml) y 40 μl de IPTG (0,1 M). Las bacterias se cultivaron a 37°C hasta que las colonias fueron visibles y se mantuvieron a 4°C hasta que la tinción azul/blanco pudiera distinguirse claramente.

40 Transferencias de Northern Inversa de elevada densidad y selección

Se recogió un total de 400 clones individuales, se resuspendieron en 30 μl de agua, se calentaron a 100°C durante 10 min, después se pusieron en hielo durante 5 min y se centrifugaron durante 5 min. Se realizó PCR usando 3 μl de sobrenadante limpio con los siguientes cebadores:

45

- directa:

5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3' (SEQ ID NO: 8), e

50

- inversa:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGA-3' (SEQ ID NO: 9).

55 Los productos de PCR se transfirieron a filtros Hybond-N+ (Amersham Pharmacia). Las transferencias se hibridaron durante una noche a 72°C con ADNc bicatenario marcado con ³²P-dCTP (RTS RadPrime DNA Labeling System, Gibco) sintetizado con 2 μg de ARN poliadenilado de hígado de ratón de tipo silvestre o *Usf2 -/-*, tal y como se describe a continuación. Las transferencias se lavaron cuatro veces en SSC 2X/SDS al 0,1% a 68°C durante 20 min y dos veces en SSC 0, 2X/SDS al 0,1% a 68°C durante 20 min.

60

Transcripción inversa y RT-PCR

65 Se sintetizó ADNc bicatenario en 20 μl, con 2 μg de ARN total (o ARN poliA para la genoteca sustraída), en presencia de 0, 25 mM de cada dNTP, 200 ng de cebadores hexanucleotídicos aleatorios, 20 unidades de RNA sin (Promega), DTT10 mM y 200 unidades de transcriptasa inversa M-MLV (Gibco). Después de la desnaturalización del ARN a 70°C durante 10 min en un termociclador (Perkin Elmer Cetus), se realizó la

ES 2 693 050 T3

reacción durante 1 hora a 42°C antes de que se inactivara la transcriptasa inversa durante 6 min a 96°C. Al final de la reacción se añadieron 80 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 0,1 mM (pH 8, 0). La amplificación por PCR se realizó con 5 µl de mezcla de reacción de transcriptasa inversa en 50 µl de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 2mM, W-1 al 0,05% (v/v), 0, 2 mM de cada dNTP, 1 pmol de cebadores específicos directos e inversos (enumerados más adelante), 1 pmol de cebadores de β-actina de control directos e inversos y 2 unidades de Taq polimerasa (Gibco). Las condiciones de PCR eran 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 s, hibridación a 50°C durante 20 s y extensión con cebador a 72°C durante 20 s. Después de la PCR, se separaron los productos amplificados (171 pb para *HEPC1* o *HEPC2* y 250 pb para β-actina) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1, 5%.

Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes:

15 * *HEPC1*:

- directa:
5'-CCTATCTCCATCAACAGATG-3' (SEQ ID NO: 10) e
- 20 - inversa
5'-AACAGATACCACACTGGGAA-3' (SEQ ID NO: 11);

25 * *HEPC2*.

- directa:
30 5'-CCTATCTCCAGCAACAGATG-3' (SEQ ID NO: 12) e
- inversa:
35 5'-AACAGATACCACAGGAGGGT-3' (SEQ ID NO: 13);

* *β-actin*:

- directa:
40 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' (SEQ ID NO: 14) e
- inversa:
45 5'-TTTGATGTCACGCACGATTT-3' (SEQ ID NO: 15).

Los cebadores usados para la amplificación de DMT1 fueron los siguientes:

50 * *isoforma de DMT1 sin IRE*:

- directa:
55 5'-TCCTGGACTGTGGACGCT-3' (SEQ ID NO: 16) e
- inversa:
60 5'-GGTGTT CAGAAGATAGAGTTCAGG-3' (SEQ ID NO: 17);

* *DMT1 con IRE*:

- directa:
65 5'-TGTTTGATTGCATTGGGTCTG-3' (SEQ ID NO: 18) e

ES 2 693 050 T3

- inversa:

5'-CGCTCAGCAGGACTTTTCGAG-3' (SEQ ID NO: 19);

5

* Normalización con 14S:

- directa:

10 5'-CAGGACCAAGACCCCTGGA-3' (SEQ ID NO: 20) e

- inversa:

15 5'-ATCTTCATCCCAGAGCGA-3' (SEQ ID NO: 21)

15

Transferencia de Northern

20 Los cebadores usados para la amplificación de las sondas usadas para detectar los ARNm específicos fueron:

* para amplificación de ADNc (1080 pb) de hemocromatosis (HFE) de ratón:

25

- directa:

5'- ATGAGCCTATCAGCTGGGCT -3' (SEQ ID NO: 22) e

30

- inversa:

5'-TCACTCACAGTCTGTTAAGA-3' (SEQ ID NO: 23);

35 * para amplificación de ADNc (285 pb) del receptor de transferrina (TfR) de ratón:

- directa:

40 5'-GAAATCCCTGTCTGTTATAC-3' (SEQ ID NO: 24) and

40

- inversa:

5'-GGCAAAGCTGAAAGCATTTTC-3' (SEQ ID NO: 25);

45

* para amplificación de ADNc (333 pb) del receptor 2 de transferrina (TFR2) de ratón:

- directa:

50 5'-TACAGCTCGGAGCGGAACG-3' (SEQ ID NO: 26) e

50

- inversa:

55 5'-TTACAATCTCAGGCACCTCC-3' (SEQ ID NO: 27);

55

* para amplificación de ADNc (350 pb) de ceruloplasmina de ratón:

- directa

60 5'-ACTTATTTTCAGTTGACACGG-3' (SEQ ID NO: 28) e

60

- inversa

65 5'-GCAGCACATACACATACTGT-3' (SEQ ID NO : 29);

65

* para amplificación de ADNc (258 pb) de hemo oxigenasa 1 (Hmox1) de ratón:

- directa:

5 5'-ATGGAGCGTCCACAGCCCG-3' (SEQ ID NO: 30), e

- inversa:

10 5'-CCTTCGGTGCAGCTCCTCAG-3' (SEQ ID NO: 31).

Cada fragmento se amplificó usando Taq polimerasa y ADNc total hepático, se purificó de gel de agarosa (kit de purificación de PCR QIAquick, Qiagen) y se subclonó en el vector TA (kit de clonación AdvanTAge, Clontech). El plásmido recombinante se seleccionó de acuerdo con el protocolo y se amplificó en medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se purificó (QIAprep Spin Miniprep, Qiagen). Cada ADNc se purificó del vector después de la digestión con EcoRI y migración en gel de agarosa. La sonda usada para detectar ARNm de *HEPC1* se preparó a partir de la digestión con EcoRI del pT-Adv/*HEPC1* aislado mediante hibridación sustractiva supresora. Se desnaturalizaron veinte microgramos de ARN de cada fuente en tampón que contenía formaldehído y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1%, formaldehído 2,2 M. La transferencia de Northern se realizó como se ha descrito anteriormente (VALLET et al., J. Biol. Chem., 272, 21944-21949, 1997). Se separó cada transferencia y se resonó con ADNc 18 S ribosómico, para comprobar la integridad y la cantidad de los ARN cargados.

25 Transferencia de Southern

Las transferencias de Southern se realizaron tal y como se describió anteriormente (VALLET et al., J. Biol. Chem., 272, 21944-21949, 1997). La sonda de *HEPC1* se preparó a partir de un fragmento de ADN genómico de ratón de 1437 pb amplificado con los siguientes cebadores:

- directa:

5'-GAGCAGCACCCACCTATCTCCA-3' (SEQ ID NO: 32) and

- inversa:

5'-AACAGATACCACAGGAGGGT-3' (SEQ ID NO: 33).

40 Después de la digestión con PvuII, se purificó un fragmento de 545 pb del gel de agarosa y se usó como sonda para la transferencia de Southern. Esta sonda de *HEPC1* mostró una identidad del 95% con la región de *HEPC2* homóloga.

45 Análisis hematológico de ratones

Se obtuvo sangre por flebotomía retroorbital antes de la eutanasia de los ratones y se recogió en tubos heparinizados (capiject™ T-MLH, Terumo® medical corporation). Los hemogramas y parámetros de los eritrocitos se determinaron usando un analizador automático MaxM coulter.

50 Mediciones de hierro e histología

55 La cuantificación del nivel de hierro se realizó tal como lo ha sido descrito anteriormente por *Torrance y Bothwell* (1968) en fragmentos u órganos enteros usando IL test™ (*Instrumentation Laboratory*). Para la histología, se fijaron los tejidos en formaldehído al 4%, se incluyeron en parafina, se montaron sobre portaobjetos y se tñieron con azul de Prusia y tinción de contraste con rojo nuclear usando procedimientos convencionales.

60 Resultados

Sobrecarga masiva de hierro en hígado y páncreas de ratones *Usf2* -/-

65 Todos los ratones *USF2* -/- presentan después del tercer mes de vida una densa pigmentación marrón del hígado y una pigmentación bronce más o menos pronunciada del páncreas. Dado que este rasgo fenotípico

es característico de la hemocromatosis, el trastorno hereditario de la absorción del hierro, se decidió analizar el estado del hierro de los ratones *Usp2*^{-/-}. En primer lugar, para evaluar el nivel de acumulación de hierro, se realizó tinción con azul de Prusia de Perls en hígado y páncreas de ratones de tipo silvestre y *Usp2*^{-/-} alimentados con una dieta convencional.

5

Los resultados se muestran en la figura 1 (de A a D):

10 Reseña: sección de hígado de (A) ratones de tipo silvestre de 8 meses de edad (x 50), (B) miembro de la misma camada *Usp2*^{-/-} de 8 meses de edad y (C) ratón *Usp2*^{-/-} de 19 meses de edad (x 10). La sección del páncreas en (D) es de un ratón *Usp2*^{-/-} de 8 meses de edad (x 12,5). Las puntas de flecha en C indican hierro en el núcleo del hepatocito. Las puntas de flecha en D señalan los islotes de Langerhans dispersos por todo el tejido exocrino.

15 Mientras que los ratones de control mostraron muy poca o ninguna tinción de hierro positiva en el hígado (figura 1A), los ratones *Usp2*^{-/-} presentaron acumulación de hierro en los hepatocitos (figura 1B-C). Este depósito de hierro se limitó principalmente a los hepatocitos periportales y después, con la edad, el número de hepatocitos teñidos aumentó. A los 19 meses de edad, como se muestra en la figura 1C, la acumulación de hierro era considerable y la tinción era homogénea por todo el parénquima hepático. Además, en algunos hepatocitos se detectó una intensa acumulación de hierro nuclear (figura 1B). Para el páncreas, se obtuvieron resultados similares, es decir, ninguna tinción en el tejido de control y una intensa acumulación de hierro en el páncreas exocrino de ratones *Usp2*^{-/-} (figura 1D).

25 Para cuantificar más exactamente la sobrecarga de hierro durante la vida de los animales, se midieron los niveles de hierro en hígado y páncreas de ratones de 2, 5 a 19 meses de edad.

Los resultados se muestran en la figura 1 (E y F):

30 Reseña: Concentración de hierro no hemo (microgramos de hierro por gramo de tejido seco) hepática (E) y pancreática (F) dependiente de la edad cuando se mide en ratones de control (ratones de tipo silvestre y heterocigóticos, ▲) y ratones *Usp2*^{-/-} (□).

35 Como se muestra en la figura 1E, el hierro se acumula en el hígado de ratones entre 60 y 100 días después del nacimiento y alcanzó un nivel correspondiente aproximadamente a un contenido de hierro 10 veces mayor que en ratones de tipo silvestre. En el páncreas (figura 1F), la acumulación de hierro fue más progresiva, con niveles en ratones *Usp2*^{-/-} un máximo de 20 veces superior que en ratones de tipo silvestre. La acumulación de hierro también se midió en riñón y corazón mostrando una acumulación de 2 y 4 veces, respectivamente. Finalmente, se observó un nivel de hierro 1,7 veces superior en el suero de ratones *Usp2*^{-/-} en comparación con ratones de control (3,550 ± 259 µg de hierro/l en controles [n=15] frente a 6,274 ± 514 µg de hierro/l en ratones *Usp2*^{-/-} [n=13] P<(0,0001), pero este aumento no pareció ser dependiente de la edad. Este aumento del nivel de hierro en suero en ratones *Usp2*^{-/-} se correlacionó con un aumento de 1,6 veces de la saturación de transferrina (61 ± 9% de saturación en controles [n=6] frente al 95 ± 9% de saturación en ratones *Usp2*^{-/-} [n=6] P<0, 0004). Finalmente, en la hembra de más edad analizada hasta ahora (19 meses), la sobrecarga de hierro se extendió con un nivel de hierro aumentado en todos los tejidos ensayados incluyendo músculo, útero, pulmón e hipófisis (no se muestra).

45

El bazo de ratones *Usp2*^{-/-} es resistente al depósito natural de hierro

50

Los resultados se muestran en la figura 2:

Reseña de la figura 2:

55 (A) Concentración de hierro no hemo esplénico dependiente de la edad (microgramos de hierro por gramo de tejido seco) cuando se mide en ratones de control (ratones de tipo silvestre y heterocigóticos, ▲) y ratones *Usp2*^{-/-} (□). Sección de bazo de un ratón representativo (B) de tipo silvestre de 8 meses (x 20) y (C) un compañero de la misma camada *Usp2*^{-/-} de 8 meses (x 20) teñido con la tinción de Perls para hierro. RP, pulpa roja; WP pulpa blanca.

60

A diferencia de todos los demás tejidos ensayados, se observó una acumulación de hierro dependiente de la edad en el bazo de ratones de tipo silvestre, como se muestra (figura 2A).

65 Se observaron gránulos que dieron una reacción positiva con tinción con azul de Prusia de Perls, principalmente dispersos entre células de la pulpa roja (figura 2B). Se observó que esta acumulación fluctuaba enormemente entre ratones, sugiriendo que puede depender del fondo de cepa híbrida (129/Sv x C57BL/6) de cada animal. Este almacenamiento de hierro natural se ha comunicado anteriormente en

ratones C57BL/6 y se describió que se producía principalmente en macrófagos esplénicos (VENINGA *et al.*, *Lab. Anim.*, 23, 16-20, 1989). De manera sorprendente, en el bazo de ratones *Usf2*^{-/-}, los niveles de hierro permanecieron muy bajos (figura 2A), con una ausencia completa de tinción con azul de Prusia de Perls (figura 2C).

5

Los parámetros eritroides no se ven afectados en ratones *Usf2*^{-/-}

Para descartar la posibilidad de que la acumulación de hierro aumentada en ratones *Usf2*^{-/-} pudiera ser el resultado de anemia diseritropoyética, se midieron los parámetros eritroides en ratones de control y *Usf2*^{-/-} a diferentes edades. Los valores del recuento de glóbulos rojos (RCB, 106/ml), concentración de hemoglobina (Hb, g/dl) y volumen corpuscular medio (MCB, fl) eran normales: RBC, Hb y MCB de 10,3±0,3, 16,73 ± 0,49 y 48,27 ± 0,67 para ratones de tipo silvestre (n=3); 10,0 ± 0,3, 15,67 ± 0,06 y 48,63 ± 1,63 para ratones *Usf2*^{-/-} (n=3), respectivamente.

15

Por tanto, de manera interesante, las anomalías del hierro observadas en ratones *Usf2*^{-/-}, incluyendo la resistencia del bazo a la acumulación de hierro y los parámetros hematológicos normales, se parecen notablemente al fenotipo de ratones HFE^{-/-} (LEVY *et al.*, *Blood*, 94, 9-11, 1999; ZHOU *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2492-2497, 1998), el modelo murino de hemocromatosis hereditaria.

20

La expresión de genes HFE y TFR2 no está modificada en el hígado de ratones *Usf2*^{-/-}

Puesto que USF2 es un factor de transcripción, se determinó si USF2 podría estar implicado en la regulación de genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. Debido a la similitud entre ratones HFE^{-/-} y el modelo *Usf2*^{-/-}, se comprobó en primer lugar la expresión del gen HFE. También se examinó el gen que codifica el receptor 2 de la transferrina, del cual se ha descrito recientemente una mutación en HH (CAMASCHELLA *et al.*, *Nat. Genet.*, 25, 14-1, 2000).

30

Los resultados se muestran en la figura 3:

Reseña de la figura 3:

Veinte microgramos de ARN total de hígado de ratones de tipo silvestre y ratones *Usf2*^{-/-} (de 3 a 11 meses de edad) se sometieron a electroforesis y transferencia. Las transferencias se hibridaron con una sonda marcada con ³²P (generada por PCR, como se describe en Materiales y Procedimientos) para HFE (A) y RTf2 (B).

Como se muestra en la transferencia de Northern de la figura 3A, la abundancia de ARNm de HFE en el hígado de ratones *Usf2*^{-/-} es comparable a la de ratones de tipo silvestre. El análisis de transferencia de Northern también demostró que la expresión hepática del gen RTf2 no se modificó en ratones *Usf2*^{-/-} en comparación con ratones de tipo silvestre (figura 3B).

También se controló el nivel de ARNm de ceruloplasmina, hemo oxigenasa 1 y receptor de transferrina en ratones *Usf2*^{-/-}, ya que se había descrito que la abundancia de estos ARNm se modificaba en trastornos que alteran el equilibrio del hierro (para una revisión véase ANDREWS *et al.*, *Nutr. Rev.*, 57, 114-123, 1999). Se observó de nuevo que el nivel de estos ARNm era comparable en ratones *Usf2*^{-/-} y de control.

Finalmente, se analizó la expresión del gen DMT1 (denominado también Nramp2), la principal proteína transmembrana de captación de hierro que transporta activamente el hierro alimenticio reducido al interior de eritrocitos intestinales. Se analizó la expresión duodenal de DMT1 por cuantificación relativa usando RT-PCR (7 ratones *Usf2*^{-/-} frente a 6 de control). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de ratones (no se muestran).

55

Análisis de genotecas de ADNc de sustracción: identificación de hepcidina como un supuesto candidato para hemocromatosis

60

Para identificar genes cuyo nivel de expresión está modificado en ratones *Usf2*^{-/-}, se realizó una genoteca de ADNc sustraída entre hígado de ratones *Usf2*^{-/-} (de control) y de tipo silvestre (de ensayo) (DIATCHENKO, *Proc. Natl. Sci. USA*, 93, 6025-6030, 1996). Entre los 400 clones analizados, varios clones estaban regulados negativamente en el hígado de ratones *Usf2*^{-/-} como se analiza por transferencia de Northern inversa (no se muestra). Uno de estos clones contenía un ADNc de longitud completa que codifica el péptido hepcidina caracterizado recientemente (KRAUSE *et al.*, *FEBS Lett.*, 480, 147-150, 2000; PARK *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276, 7806-7810, 2001; PIGEON *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276, 7811-7819, 2001).

65

Organización murina de genes *Usf2* y de hepcidina en el cromosoma 7

5

El genoma murino contiene dos genes de hepcidina estrechamente relacionados que se colocan en el mismo clon genómico de ratón (clon de Genbank, número de acceso AC020841). Estos genes *HEPC1* y *HEPC2* fueron mencionados por PIGEON *et al.* (*J. Biol. Chem.*, 276, 7811-7819, 2001). De manera interesante, el clon genómico CT7-8N15 también mostró que *HEPC1* se sitúa en estrecha proximidad del gen *Usf2* en el cromosoma 7 murino. PIGEON *et al.*, describieron que *HEPC1* se localizaba directamente

10

cadena abajo del gen *Usf2* (PIGEON *et al.* *J. Biol. Chem.*, 276, 7811-7819, 2001). Analizando otro clon genómico, RP23-22G9 (Genbank, número de acceso AC87143), se observó que parte del gen *Usf2* (incluyendo los exones 8, 9 y 10) también estaba duplicado y que, de hecho, *HEPC1* se sitúa cadena abajo del gen *Usf2* truncado.

15

La organización genómica de los genes *Usf2* y de hepcidina se muestra en la figura 4.

Reseña de la figura 4:

20

Representación esquemática (no a escala) de la región del locus que incluye los genes *Usf2* y hepcidina. El alelo dirigido se representa con la inserción del casete betageo en el exón 7 (VALLET *et al.* *J. Biol. Chem.*, 272, 21944-21949, 1997). Los datos se obtienen del clon genómico RP23-22G9 (Genbank). Hasta ahora, no se disponía de datos con respecto a la orientación y la distancia entre los dos genes de hepcidina. La transferencia de Southern a la derecha de la figura es de ADN de cola de ratones heterocigotos y homocigotos, de tipo silvestre, digerido con BglII e hibridado con la sonda de *HEPC1*. Se detectaron dos bandas del tamaño esperado, 12, 4 kpb y 5, 1 kpb, cualquiera que fuese el genotipo. Usando la sonda de *USF2* se mostraron las mismas bandas.

25

El gen *HEPC2* se localiza cadena abajo del gen *Usf2* funcional completo y el gen *HEPC1* se localiza cadena abajo del gen *Usf2* parcial. En la actualidad, no existe información disponible con respecto a la orientación relativa 5'-3' de los genes *HEPC1* y *HEPC2* ni la distancia entre los mismos.

30

Debido a la proximidad del gen *Usf2* y del locus de hepcidina, se determinó si el acontecimiento de recombinación en el intrón 7 del alelo de *Usf2* dirigido podría haber eliminado o truncado los genes *HEPC1* y *HEPC2*. Para comprobar esta hipótesis, se realizó transferencia de Southern en ADN de cola genómico de ratones *Usf2* +/- o *Usf2* -/-, de tipo silvestre, con una sonda de *HEPC1* (figura 4). El ADN genómico se digirió con BglII. Basándose en el análisis del locus AC087143, se predijo que esta digestión genera dos fragmentos de 5,1 y 12,4 kpb, que contienen los genes *HEPC1* y *HEPC2*, respectivamente. Debido a la estrecha similitud (más del 95%) entre la región de hibridación de *HEPC1* y *HEPC2*, se esperaba que ambas bandas se mostrasen mediante la sonda de *HEPC1*. Esto es lo que se observó, como se muestra en la transferencia de Southern en la figura 4. Se observó el mismo patrón con ADN de ratones *Usf2* -/- indicando que los genes de hepcidina están presentes en ratones *Usf2* -/ y que no han experimentado una redistribución importante. Finalmente, las dos bandas también hibridaron con una sonda de *USF2* que se extiende desde el exón 8 al exón 10, demostrando que los exones 8 a 10 de *USF2* están efectivamente duplicados.

35

40

45

Los genes de hepcidina son totalmente silenciosos en el hígado de ratones *Usf2* -/-

50

Se midió el nivel de expresión de los genes de hepcidina mediante análisis de transferencia de Northern. De hecho, el ARNm de hepcidina era totalmente indetectable en el hígado de ratones *Usf2* -/- (figura 5). Vale la pena señalar que el hígado de ratones *Usf2* +/- contenía una cantidad reducida de ARNm de hepcidina en comparación con la de ratones de tipo silvestre. Para evaluar adicionalmente el nivel específico de mensajeros de *HEPC1* y *HEPC2*, se diseñaron cebadores específicos para los transcritos de *HEPC1* y *HEPC2*. Mediante RT-PCR se demostró que ambos genes se transcribían activamente en el hígado de ratones de tipo silvestre (figura 5B-C) mientras que los transcritos tanto de *HEPC1* como de *HEPC2* estaban totalmente ausentes en el hígado de ratones *Usf2* -/- (figura 5B-C).

55

60

Reseña de la figura 5:

65

(A) Veinte microgramos de ARN total de hígado de animales de tipo silvestre, *Usf2* +/- y *Usf2* -/- (entre 3 y 11 meses de edad) se sometieron a electroforesis y transferencia. La transferencia se hibridó con una sonda de HEPC marcada con ³²P (preparada como describe en "Materiales y Métodos") que más probablemente reconocía los transcritos tanto de *HEPC1* como de *HEPC2*. (B) Se midieron los niveles específicos de *HEPC1* y *HEPC2* mediante RT-PCR como se describe en

5 Materiales y Métodos. Después de la PCR, los productos amplificados (171 pb para *HEPC1* o *HEPC2* y 250 pb para β -actina) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Ninguno de los cebadores específicos de *HEPC1* ni de *HEPC2* fueron capaces de reamplificar los productos PCR de *HEPC2* y *HEPC1*, respectivamente, demostrando la elevada especificidad de cada par de cebadores (no mostrado).

10 La similitud de las alteraciones en el metabolismo del hierro entre ratones knock-out para HFE y los ratones *Usp2*-/ deficientes en hepcidina sugiere que la hepcidina puede funcionar en la misma ruta reguladora que HFE. Se ha demostrado que HFE interacciona físicamente con el receptor de transferrina en células crípticas de la mucosa duodenal (*WAHEED et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1579-1584, 1999*). Sin quedar ligado a la teoría, puede postularse que esta interacción modula el estado del hierro de estas células que, a su vez, controlan la expresión de los transportadores apicales y basolaterales en células maduras en las puntas de las vellosidades. La hepcidina puede ser necesaria para la actividad de HFE quizás mediante la interacción directa con el complejo HFE/beta2 microglobulina / receptor de transferrina. De manera similar, la hepcidina puede ser necesaria para la regulación del depósito de hierro en macrófagos. La presencia de una proteína de HFE mutada o un defecto completo en la expresión de hepcidina puede ser responsable de absorción de hierro intestinal aumentada y de reservas de hierro reducidas en macrófagos, de acuerdo con el modelo mostrado en la figura 6.

20 En este modelo, la hepcidina evita la sobrecarga de hierro reduciendo el transporte de hierro al enterocito y programando los macrófagos para retener el hierro. En ratones *Usp2* -/-, la deficiencia de hepcidina sería responsable del transporte de hierro intestinal aumentado y de reservas de hierro reducidas en macrófagos.

25 En ambas condiciones, el hierro plasmático supera la capacidad de unión de transferrina y el hierro no unido a transferrina se acumula en diversos tejidos incluyendo corazón y páncreas.

30 De acuerdo con la función propuesta de la hepcidina en la homeostasis del hierro, la producción de hepcidina puede depender de la captación de hierro unido a transferrina mediada por *TFR2* en hepatocitos. Esto podría explicar por qué el defecto de *TFR2* es responsable de una forma de hemocromatosis genética humana si este defecto conduce a una disminución en la secreción de hepcidina que, a su vez, da como resultado una absorción de hierro aumentada. Esta hipótesis se podrá ensayar midiendo la hepcidina en plasma en pacientes con deficiencia de *TFR2* o en ratones knock-out para *TFR2*.

35 EJEMPLO 2: CARACTERÍSTICAS DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBRE-EXPRESAN HEPCIDINA

40 Procedimientos

Generación de ratones transgénicos

45 Se amplificó ADNc de longitud completa de ADNc de hepc1 murino usando los cebadores

5'-GGGGGATATCAGGCCTCTGCACAGCAGAACAGAAGG-3' (SEQ ID NO: 34) y

5'-GGGGGATATCAGGCCTCTATGTTTTGCAACAGATACC-3' (SEQ ID NO: 35).

50 Ambos cebadores contienen un sitio *StuI* (subrayado).

55 El fragmento de PCR de hepc1 se introdujo entre el promotor de transtiretina (TTR) de ratón (que consiste en el primer exón, primer intrón y la mayor parte del segundo exón) y el casete de señal poli (A) T pequeño de SV40. La construcción lleva 3 kb de secuencias de ADN de TTR de ratón 5' al sitio cap (*YAN et al., EMBO J., 9, 869-879, 1990*). El transgén de TTR-hepc1 de 4, 7 kpb se separó de la secuencia plasmídica mediante digestión con *HindIII* y se usó para microinyección pronuclear.

60 Genotipado mediante PCR y transferencia de Southern

65 Se realizó transferencia de Southern de acuerdo con métodos convencionales (*SAMBROOK et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989*). Se preparó ADN genómico a partir de cola como se indica a continuación: se cortó un trozo de 5 mm de cola de cada ratón y se puso en 500 μ l de mezcla de digestión (Tris 50 mM, pH 8/EDTA 100 mM /NaCl 100 mM/SDS al 1%). Se añadió proteinasa K (200 μ g) y se realizó la digestión a 55°C durante una noche. Las muestras se

- 5 extrajeron directamente añadiendo 500 µl de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (1/24/25). Después de agitación vorticial y centrifugación, se precipitó la fase acuosa transparente con un volumen de isopropanol. Para la transferencia de Southern, el ADN se digirió con BamHI, que cortó dos veces el transgén. Después de la electroforesis, el ADN se transfirió a una membrana de nailon (Hybond N+, Amersham). La sonda se corresponde al fragmento de BglII-HindIII de 1,7 kpb del plásmido TTR que se ha descrito anteriormente (YAN *et al.*, *EMBO J.*, 9, 869-878, 1990). La sonda se marcó con dCTP ³²P con cebado aleatorio, usando un kit disponible en el mercado (*DNA Labeling System, Gibco*). El fragmento marcado de 5,3 kpb corresponde al gen de TTR endógeno y el fragmento marcado de 4,7 kpb se corresponde al transgén.
- 10 Para la reacción de PCR, se utilizó ADN genómico (0,5-1 µg) en reacciones de 25 µl que incluían dos cebadores: el transgén de TTR-hepc1 se amplificó usando los cebadores:
- 5'-CTTTTTGCACCATGCACCTTTC-3' (SEQ ID NO: 36; hibridación en el intrón 1 of TTR) y
 - 15 - 5'-AACAGATACCACACTGGGAA-3' (SEQ ID NO: 37; hibridación en hepc1 DNAc).

20 La reacción de PCR se realizó del siguiente modo: 25 ciclos (cada ciclo consiste en 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 50°C y 40 segundos a 72°C) con un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos y un paso de elongación final a 72°C durante 5 minutos en Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, W-I al 0,05%, MgCl₂ 2 mM, cada dNTP 0,2 mM, cada cebador 0,2 µM, 2 unidades de Taq polimerasa (Gibco). El producto específico de 612 pb se amplificó con un fragmento no específico del mismo tamaño. La presencia del transgén se muestra después de la digestión del producto de PCR con 10 unidades de StuI durante 2 horas que produce 268 pb y 344 pb. La reacción se analizó en gel de agarosa al 1,5-2% que contenía bromuro de etidio. La amplificación del fragmento no específico garantiza que la ausencia del transgén no se debe a la falta o degradación de ADN genómico. Se observó que este método de PCR para genotipado de ratón daba los mismos resultados que el método de transferencia de Southern.

30 Resultados

Características de ratones transgénicos TTR-hepc1

- 35 Se produjeron un total de nueve ratones fundadores transgénicos independientes por el método clásico de microinyección de una construcción linealizada.

La construcción se representa esquemáticamente en la figura 7A.

- 40 La figura 7B muestra una transferencia de Southern con los diferentes fundadores.

45 Tres fundadores de ratones transgénicos (TH27, TH 37 y TH52) eran indistinguibles de los miembros de su misma camada de ratones tipo silvestre (Ts). Tres fundadores de ratones transgénicos nacieron con una piel pálida y murieron a las pocas horas del nacimiento (bb2, 3 y 5). Finalmente, el fenotipo de los tres últimos fundadores de ratones transgénicos (TH5, 35 y 44) era inequívoco: tenían pérdida de pelo en todo el cuerpo y su piel estaba arrugada. Se realizaron frotis de sangre de estos animales y se encontraron pruebas de poiquilocitosis intensa e hipocromía en los tres ratones con la piel arrugada.

50 Los anteriores ejemplos destacan el papel de la hepcidina como un regulador clave en la homeostasis del hierro. La hepcidina se propone como un nuevo gen candidato que, cuando muta, podría estar implicado en la regulación anormal del metabolismo del hierro y el desarrollo de HH. Finalmente, el nuevo modelo murino de enfermedad de sobrecarga de hierro que se ha descrito anteriormente parece ser un modelo animal adecuado para ensayar nuevos enfoques terapéuticos para la prevención y corrección del depósito del hierro en HH así como para la comprensión de la homeostasis del hierro.

55

LISTA DE SECUENCIAS

- 60 [0106]
<110> INSERM
- <120> USO DE HEPCIDINA COMO UN REGULADOR DE LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO
- 65 <130> MJPcb598-54
- <140>

ES 2 693 050 T3

<141>

<150> 01401377.5
 <151> 2001-05-25

5 <160> 37
 <170> PatentIn Ver. 2.1

10 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 1

Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met
 1 5 10 15
 Cys Cys Lys Thr
 20

20 <210> 2
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys
 1 5 10 15
 Gly Met Cys Cys Lys Thr
 20

25 <210> 3
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 3

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
 1 5 10 15
 Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
 20 25

35 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

40 <400> 4
 gcgaagccct ggggtcaatc 20

45 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

50 <400> 5
 ggggtccacc actcaagag g 21

ES 2 693 050 T3

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 5
 <400> 6
 gcgaagccct ggggtcaatc 20
 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 10
 <400> 7
 gaattctcta gagcggccgg ac 22
 <210> 8
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 20
 <400> 8
 caggaaacag ctatgacat gattac 26
 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 25
 <400> 9
 taatagact cactataggg cga 23
 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 35
 <400> 10
 taatagact cactataggg cga 23
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 45
 <400> 11
 taatagact cactataggg cga 23
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 50
 <400> 12
 cctatctcca gcaacagatg 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 60
 <400> 13
 aacagatacc acaggagggt 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 693 050 T3

<213> Mus sp.
 <400> 14
 agccatgtac gtagccatcc 20
 5
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 10
 <400> 15
 ttgatgtca cgcacgatt 20
 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 15
 <400> 16
 tcctggactg tggacgct 18
 20
 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 25
 <400> 17
 ggtgtcaga agatagagtt cagg 24
 30
 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 35
 <400> 18
 tgtttgattg cattgggtct g 21
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 40
 <400> 19
 cgctcagcag gacttctgag 20
 45
 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 50
 <400> 20
 caggaccaag acccctgga 19
 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 55
 <400> 21
 atctcatcc cagagcga 18
 60
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 65
 <400> 22 20

ES 2 693 050 T3

	atgagcctat cagctgggct	20
5	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Mus sp.	
10	<400> 23 tcactcacag tctgtaaga	20
15	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Mus sp.	
20	<400> 24 gaaatccctg tctgttatac	20
25	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Mus sp.	
30	<400> 25 ggcaaagctg aaagcatttc	20
35	<210> 26 <211> 19 <212> ADN <213> Mus sp.	
40	<400> 26 tacagctcgg agcggaacg	19
45	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Mus sp.	
50	<400> 27 ttacaatctc aggcacctcc	20
55	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Mus sp.	
60	<400> 28 acttattca gttgacacgg	20
65	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Mus sp.	
	<400> 29 gcagcacata cacatactgt	20
	<210> 30 <211> 19 <212> ADN <213> Mus sp.	
	<400> 30 atggagcgtc cacagcccg	19
	<210> 31	

ES 2 693 050 T3

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

5 <400> 31
 ccttcggtgc agctcctcag 20

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

10

<400> 32
 gagcagcacc acctatctcc a 21

15

<210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

20

<400> 33
 aacagatacc acaggagggt 20

<210> 34
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

25

<400> 34
 gggggatatc aggcctctgc acagcagaac agaagg 36

30

<210> 35
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

35

<400> 35
 gggggatatc aggcctctat gtttgcaac agatacc 37

40

<210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

45

<400> 36
 cttttgcac catgcacctt tc 22

<210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

50

<400> 37
 aacagatacc aactgggaa 20

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido para su uso en un procedimiento de tratamiento para reducir la sobrecarga de hierro, en el que el polipéptido comprende una secuencia de 20 aminoácidos que tiene:
- al menos 50% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1;
 - residuos de cisteína en las posiciones 2, 5, 6, 8, 9, 14, 17 y 18; y
- 10 en donde el polipéptido es capaz de reducir la absorción de hierro.
- 15 2. Polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende una secuencia de 20 aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad con la secuencia SEC ID N°:1.
3. Polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un homólogo de vertebrado de una forma madura de hepcidina humana.
- 20 4. Polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el homólogo de vertebrado es un homólogo de mamífero.
5. Polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un polipéptido de 25 aminoácidos que tiene la secuencia SEQ ID NO: 3.
- 25 6. Polipéptido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para prevenir y/o tratar la hemocromatosis o una enfermedad resultante de la misma.
- 30 7. Polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la enfermedad producida por la hemocromatosis es hepatocarcinoma, cardiomiopatía o diabetes.
6. Inhibidor de la expresión de hepcidina para su uso en un procedimiento de tratamiento para aumentar la absorción de hierro en el que el inhibidor es una molécula de ADN o ARN antisentido, o una ribozima
- 35 9. Inhibidor de la capacidad de la hepcidina para reducir la absorción de hierro para su uso en un procedimiento de tratamiento para aumentar la absorción de hierro, en el que el inhibidor es un anticuerpo anti-hepcidina.
- 40 10. Inhibidor para el uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo anti-hepcidina se dirige contra una forma madura de hepcidina.
11. Inhibidor para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para tratar la anemia o una enfermedad resultante de la misma.

Fig. 1

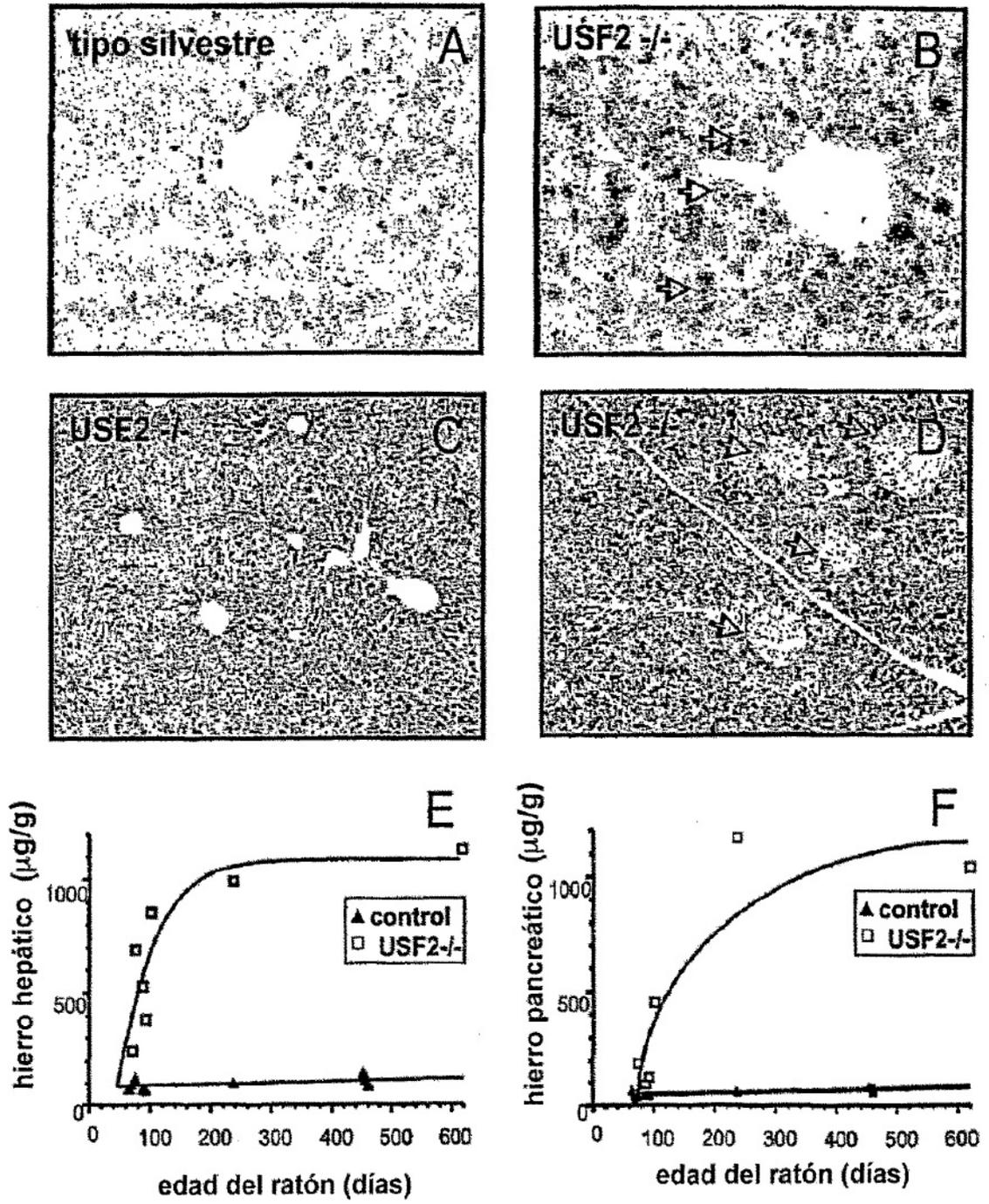


Fig. 2

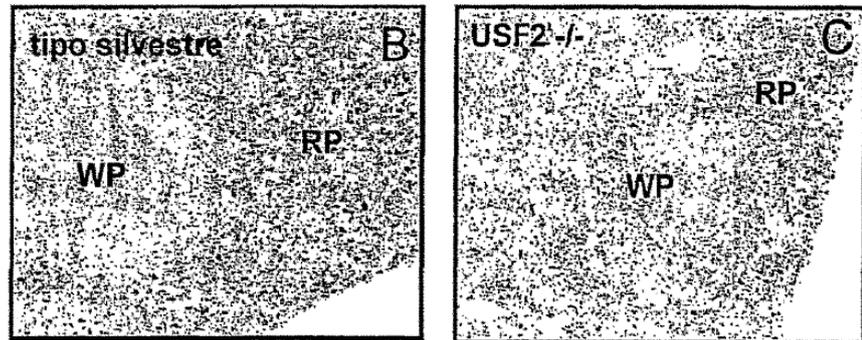
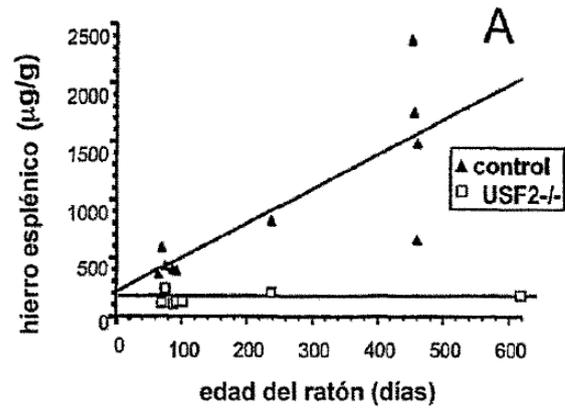
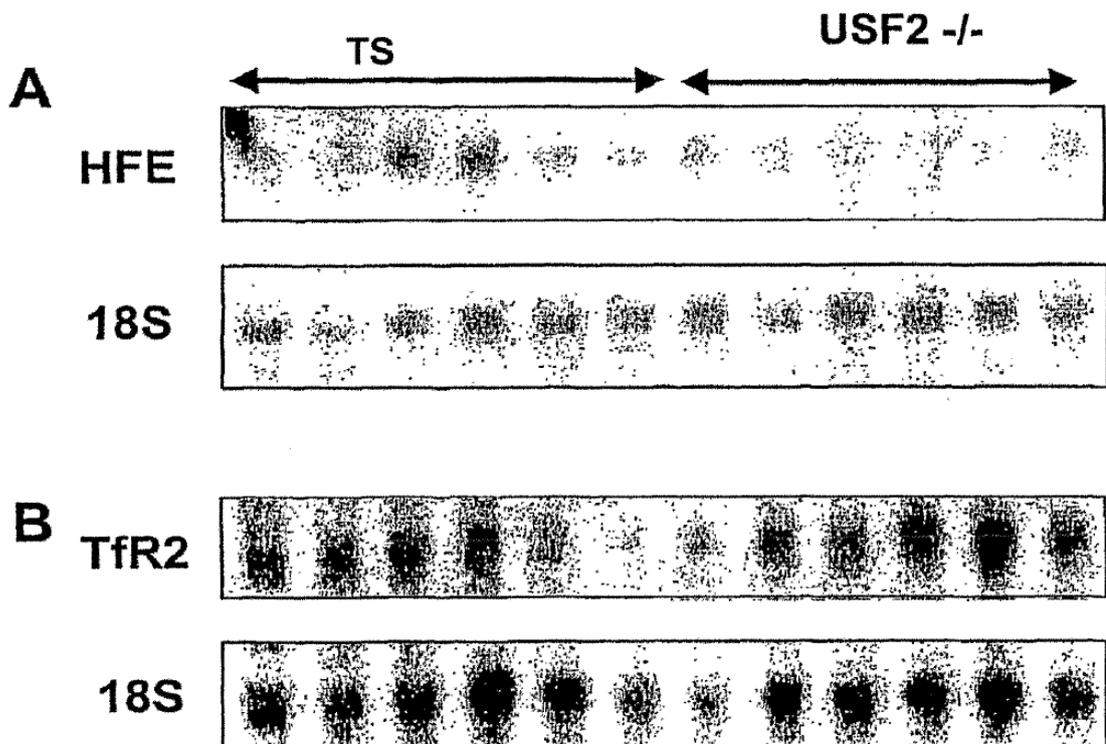


Fig. 3



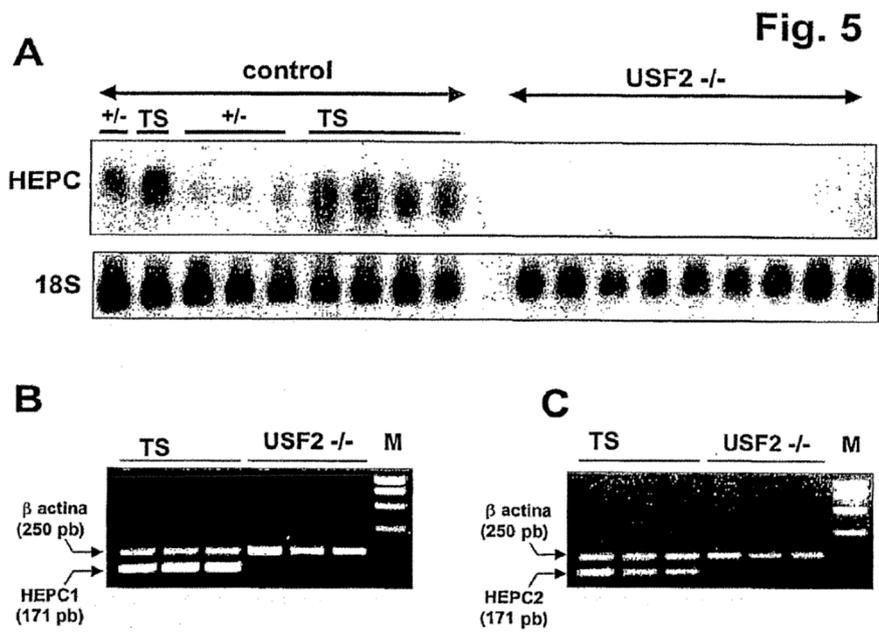
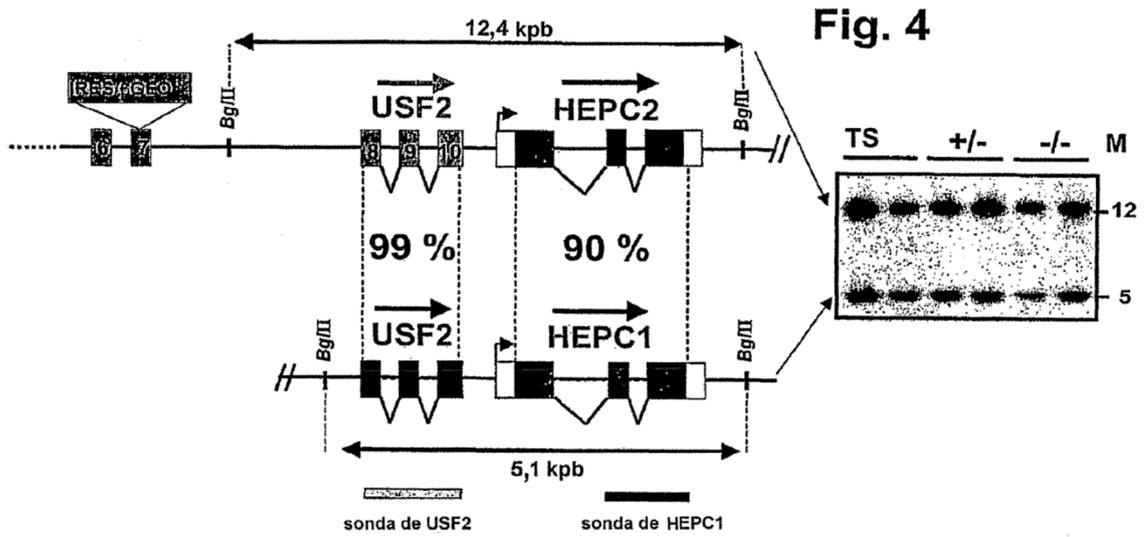


Fig. 6

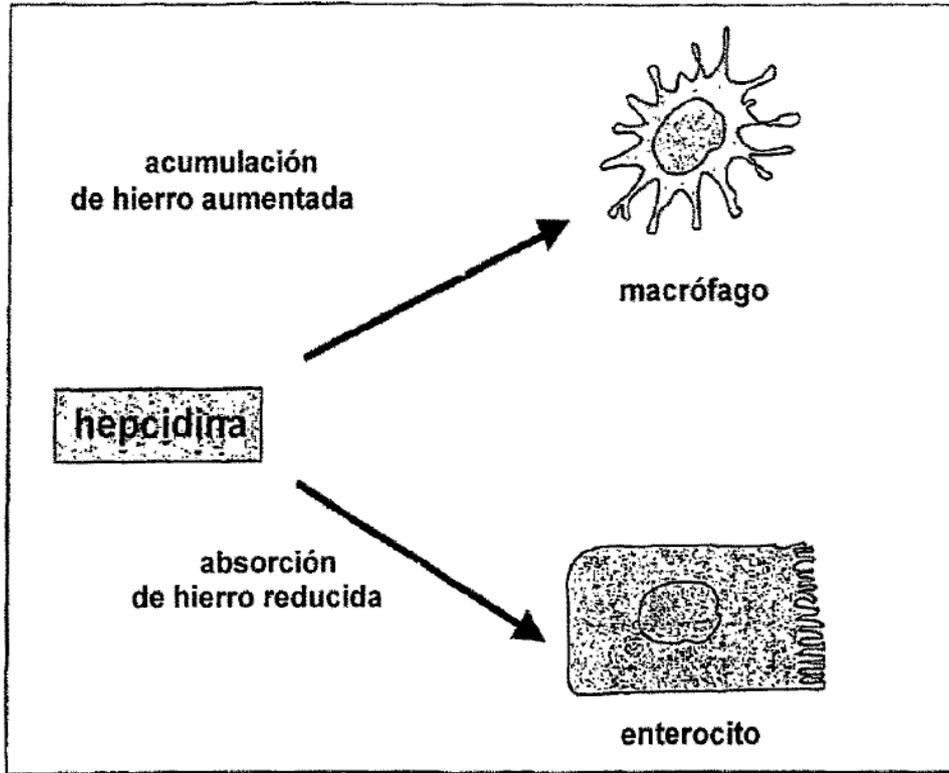


Fig. 7 ratones transgénicos

