



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 307 769**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02746437 .9**

(96) Fecha de presentación : **23.05.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1395227**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

(54) Título: **Procedimientos y compuestos para la diagnosis de enfermedades inflamatorias e identificación de agentes farmacológicos de utilidad en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.**

(30) Prioridad: **23.05.2001 US 292968 P**
15.11.2001 US 335474 P
28.11.2001 US 333848 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

(73) Titular/es:
Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.
900 Ridgebury Road, P.O. Box 368
Ridgefield, Connecticut 06877-0368, US

(72) Inventor/es: **Li, Jun;**
Li, Xiang, John y
Barton, Randall

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 307 769 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

Procedimientos y compuestos para la diagnosis de enfermedades inflamatorias e identificación de agentes farmacológicos de utilidad en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

5

Antecedentes y trasfondo de la invención**1.- Sector de la invención**

El sector de la presente invención, se refiere al área de biología molecular. De una forma particular, la presente invención, se refiere a secuencias nucleótidas que codifican el Pim-2 humano (h-Pim-2) y el correspondiente h-Pim-2-polipéptido traducido, a vectores recombinantes que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos de h-Pim-2, y a procedimientos para la producción de recombinantes de h-Pim-2-polipéptidos, así como el uso de los mismos, en el diagnóstico de estados de enfermedades inflamatorias y en los ensayos de rastreo para la identificación de composiciones que pueden ser de utilidad en el tratamiento de estados de enfermedades inflamatorias, de una forma particular, enfermedades inflamatorias del intestino, tales como colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn.

2.- El arte especializado de la técnica relacionado

El Pim-2, es una serina/treonina-quinasa, altamente conservada, involucrada en la proliferación de células, meiosis, y la prevención de apoptosis (Baytel *et al.*, Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr. 1442 : 274 (1998). El Pim-2 de los ratones, también conocida como Tic-1, según se ha reportado, es aproximadamente un 53% idéntica en secuencia, en el nivel de aminoácidos, al proto-oncogen Pim-1, y ha expresado a unos reducidos niveles en una variedad de tejidos, con la expresión más alta en el cerebro y el timo (van der Lugt *et al.*, EMBO J. 14 (11): 2536 (1995). De la misma forma que el Pim-1, el locus de la Pim-2, es también un sitio común de integración de provirus (Haupt *et al.*, Cell 65: 753 (1991); Bruer *et al.*, Embo. J. 8: 742 (1989). De hecho, el Pim-2, se identificó en primer lugar, por mediación de experimentos provirales de identificación, realizados en ratones, y análisis de DNA, obtenidos a partir de tumores sobrecrecidos, obtenidos después del trasplante de linfomas inducidos mediante la inoculación de ratones BABL/c ó C57BL10, recién nacidos, en los cuales, el gen Pim-21, fue objeto de una amplia delección, mediante objetivación genética como diana, con MuLV de Moloney. (Breuer *et al.*, Embo J. 8 (39): 743 (1989). Tales estudios, sugieren el hecho de que, el Pim-2, es un sitio de integración proviral, el cual porta provirus somáticamente adquiridos, en la mayoría de tumores transplantados (id.).

Se cree que, el proto-oncogen de Pim-1, es uno de los colaboradores más potentes de proto-oncogenes myc, en la inducción de linfomagénesis, en ratones (van der Lugo *et al.*, EMBO J. 14(11): 2536 (1995). Allen *et al.* (Oncogene 15, 1133 (1997), sugieren, basándose en experimentos de identificación proviral, el hecho de que, el Pim-2, es similar, en su comportamiento oncogénico, al Pim-1. Éstos toman debida nota en cuanto al hecho de que, mientras que la expresión basal de Pim-1 y Pim-2, difieren, con respecto a la expresión basal en tejidos, ambos genes se encuentran altamente expresados en respuesta a las mismas citocinas. Se vio que, un transgen de Pim-2, en células linfoides, predisponía a los linfomas de células T, como aquéllas promocionadas mediante transgenes de Pim-1.

Tal y como se ha reportado anteriormente, arriba, el Pim-2, como el gen relacionado del Pim-2, codifica serina/treonina-quinasa citoplásmica. La fosforilación de sustratos de proteínas mediante serina/treonina-quinasa, se encuentra a menudo involucrada en la transducción de señales procedentes de receptores de superficies celulares, a efectores intracelulares. Se cree que, el Pim-2, como el Pim-1, es una diana para un transductor de señal mediatizado por gp-130 y señalizante de activador transcripcional 3 ("STAT3"). Tal y como se conoce por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, la activación del STAT3 mediante el receptor de citocinas gp130, es necesaria, tanto para la transición del ciclo celular G1 al ciclo celular S, como para la antiapoptosis (Shirogane *et al.*, Immunity 11 : 709 (1999).

Baytel *et al.* (Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr. 1442: 274 (1998), reportan sobre la clonación del gen h-Pim-2. En comparación con el Pim-2 de los ratones, el h-Pim-2, según se reporta por parte de Baytel *et al.*, codifica un proteína que comparte el 90% de identidad y un 93% de similitud en el primer nivel de estructura. Al nivel del RNA, se han identificado dos transcriptores de Pim-2, en humanos, un transcripto de 2,2 kb, el cual se expresa altamente en tejidos hematópoyéticos en líneas celulares leucémicas y de limfomas, y un transcripto de 5,0 kb, el cual se detecta en el bazo, el timo, el intestino delgado, y la apoptosis del colon (Baytel *et al.*, Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr. 142: 274 (1998). Se cree que, el gen Pim 2, en humanos, se X-ligado Ivan der Lug *et al.*, EMBO N. 14 (11): 2536 (1995).

Los presentes inventores (Li *et al.*, J. Biol. Chem, 276: 18579 (2001), han dado a conocer recientemente el hecho de que, el Pim-2, se induce, mediante lipopolisacáridos (LPS), en una variedad de líneas celulares. Los estudios realizados por parte de los inventores, sugieren el hecho de que, la regulación "up" (regulación hacia arriba) del Pim-2, en células 70Z3, mediante LPS, se controla mediante la trayectoria del IKK/NF- κ B.

La actividad aberrante de serina/treonina en proteínas, se ha visto implicada, o se sospecha que se encuentra implicada en un gran número de patologías, incluyendo el shock séptico, la pérdida ósea, la psoriasis, la artritis reumatoidea, muchos cánceres, y otras enfermedades proliferativas (Véase, a dicho efecto, la patente estadounidense U.S. n° 5.165.716, concedida a Creasy *et al.* (Fecha de publicación, 20 de diciembre del 2000). Un gran número de

investigadores, han invertido un tiempo considerable para identificar las proteínas serina/treonina-quinasa, las cuales pueden jugar un rol interpretativo en la prevención, la mejora y la corrección de disfunciones o enfermedades. Así, por ejemplo, la patente estadounidense U.S. n1 5.972.606, concedida a Creasy *et al.* (fecha de publicación, 26 de octubre de 1999), da a conocer una proteína humana de serina/treonina-quinasa, designada como HOACF72, de la familia hYAKI de polipéptidos, anticuerpos contra los cuales se dice que son de utilidad en el tratamiento de la pérdida ósea, enfermedades inflamatorias tales como la artritis, la osteoartritis, el síndrome de la enfermedad respiratoria en el adulto (ARDS), la enfermedad inflamatoria del intestino (IBS), la psoriasis, la dermatitis, el asma, la alergias, las infecciones, el shock séptico, los cánceres, la bulimia, y un huésped de otras condiciones. Las patentes estadounidenses U.S n^{os} 5.965.420 y 6.165.766, también concedidas a Creasy *et al.* (fechas de publicación, 12 de octubre de 1999 y 26 de diciembre del 2000, respectivamente), hacen valer los polipéptidos y polinucleótidos YAK3 humanos, anticuerpos contra los cuales se dice que son de utilidad para tratar la pérdida ósea, la enfermedades inflamatorias, las infecciones, los trastornos de inmunodeficiencia, el shock séptico, el dolor, los cánceres, y un huésped de otras condiciones. Tal y como se afirma por parte de Creasy *et al.*, existe una necesidad en cuanto al hecho de una identificación y una caracterización adicionales de miembros adicionales para la familia de proteínas serina/treonina-quinasa, para identificar otros miembros de la familia que pueden jugar un rol interpretativo en la prevención, la mejora y la corrección de disfunciones o enfermedades. Existe también una necesidad en cuanto al hecho de identificar relaciones potenciales entre estas quinasa y estados de enfermedad en sí mismos.

Resumen de la invención

El arte de la técnica anterior, ha enfatizado el rol interpretativo del Pim-2 en el comportamiento oncogénico, y ha clasificado el gen un proto-gen. Ha sido particularmente sorprendente, el hecho de que, los presentes inventores, han encontrado que, el Pim-2, se encuentra significativamente incrementado, en una gran variedad de estados inflamatorios, viéndose unos incrementos particularmente grandes en Pim-2-mRNA, con respecto a los niveles de tejidos intestinales en pacientes diagnosticados con colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn y estados de enfermedades inflamatorias, asociados con: un páncreas inflamado, unas amígdalas inflamadas, un intestino inflamado, (incluyendo los intestinos delgado y grueso y el recto), revestimiento del estómago inflamado, tiroides inflamadas, cérvix inflamado, pulmón inflamado, riñones inflamados, hígado inflamado y piel inflamada.

La presente invención, se refiere a secuencias nucleótidas que codifican los Pim-2 (h-Pim-2) y polipéptidos de h-Pim-2. Una forma de presentación de la presente invención, se refiere a procedimientos para la utilización de tales polinucleótidos y polipéptidos par el tratamiento de enfermedades inflamatorias humanas, tales como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn. Otra forma de presentación de la presente invención, se refiere a procedimientos para rastrear compuestos para la actividad anti-inflamatoria potencial, mediante la consideración del efecto de tales compuestos en la Pim-2-actividad. Y todavía otra forma de presentación de la presente invención, se refiere a ensayos de diagnóstico para detectar enfermedades inflamatorias, asociadas con la actividad Pim-2 alterada.

En una forma de presentación de la presente invención, se da a conocer un procedimiento para diagnosticar estados de enfermedad, tales como un estado inflamatorio del intestino, utilizando una muestra de tejido obtenida de un paciente, comprendiendo, dicho procedimiento, las etapas de : (a) medir el nivel de Pim-2 ó Pim-2-mRNA, en la muestra de tejido del paciente, y (b) determinar cualquier diferencia del nivel de Pim-2 ó Pim-2-mRNA, en la muestra de tejido del paciente, como comparación al nivel de Pim-2 ó Pim-2-mRNA, en muestra(s) de tejido comparable(s), obtenidas de uno o más pacientes que no tienen el estado de enfermedad inflamatoria. Tal procedimiento, pueden comprender adicionalmente la etapa de (c) diagnosticar al paciente, como teniendo el estado de enfermedad inflamatoria, cuando la medición de tales parámetros, con respecto al tejido del paciente, es significativamente superior que en muestra(s) de tejido comparable(s), obtenidas de uno o más pacientes que no tienen la estado de enfermedad inflamatoria. Mediante "significativamente superior", se quiere dar a entender una diferencia de más de un porcentaje de aproximadamente un 50%, de una forma más preferible, una diferencia mayor de un porcentaje de aproximadamente un 100%, y de una forma todavía más preferible, una diferencia mayor de un porcentaje de aproximadamente un 200%. El nivel de Pim-2 ó Pim-2-mRNA, puede medirse directamente, o indirectamente, como por ejemplo, midiendo la actividad quinasa del Pim-2. Tal tipo de procedimiento, puede comprender una hibridación *in situ*, de por lo menos una sonda de ácidos nucleicos, que comprende una secuencia polinucleótida de por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID NO: 1, incluyendo, de una forma preferible, una sonda de ácidos nucleicos, los nucleótidos 294 a 311 de la SEQ ID NO: 1. Tal tipo de procedimiento, puede utilizarse, de una forma particularmente ventajosa, para la diagnosis de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, pero puede también utilizarse para detectar estados de enfermedades inflamatorias, asociadas con el páncreas inflamado, unas amígdalas inflamadas, un intestino inflamado, (incluyendo los intestinos delgado y grueso y el recto), revestimiento del estómago inflamado, tiroides inflamadas, cérvix inflamado, pulmón inflamado, riñones inflamados, hígado inflamado y piel inflamada.

En otra forma de presentación de la presente invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar un estado de enfermedad inflamatoria, tal como una enfermedad inflamatoria del intestino, en un paciente, que comprende las etapas de (a) establecer una correlación estadísticamente significativa, entre la expresión del Pim-2, y el tejido inflamado del estado de enfermedad inflamatoria, y la presencia y/o gravedad del estado de enfermedad inflamatoria; (b) medir el nivel de Pim-2, en el correspondiente tejido obtenido del citado paciente; y (c) determinar si el nivel de Pim-2 medido, corresponde al nivel correlacionado con el estado de enfermedad inflamatoria. Tal tipo de procedimiento, puede también utilizarse, de una forma particularmente ventajosa, para la diagnosis de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, pero puede también utilizarse para detectar estados de enfermedades inflamatorias, asociadas con el páncreas inflamado, unas amígdalas inflamadas, un intestino inflamado, (incluyendo los intestinos delgado y grueso

y el recto), revestimiento del estómago inflamado, tiroides inflamadas, cérvix inflamado, pulmón inflamado, riñones inflamados, hígado inflamado y piel inflamada.

Se proporciona, también, un procedimiento para controlar la eficacia de regímenes con fármacos antiinflamatorios, en un estado de enfermedad inflamatoria, tal como una enfermedad inflamatoria del intestino, comprendiendo, dicho procedimiento, las etapas de (a) establecer una correlación estadísticamente significativa, entre los niveles de Pim-2, y la respuesta clínica de la terapia antiinflamatoria en el estado de la enfermedad inflamatoria; (b) medir el nivel de Pim-2, en el paciente; y (c) determinar la correspondencia entre el nivel de Pim-2 medido en el paciente y los niveles de Pim-2 correlacionados a la respuesta clínica a la terapia anti-inflamatoria. Este procedimiento, puede emplearse, de una forma ventajosa, para controlar la eficacia de regímenes con fármacos antiinflamatorios, con respecto al tratamiento de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa. Este procedimiento, puede también emplearse para medir la para controlar la eficacia de regímenes con fármacos antiinflamatorios, en estados de enfermedades asociados con el páncreas inflamado, unas amígdalas inflamadas, un intestino inflamado, (incluyendo los intestinos delgado y grueso y el recto), revestimiento del estómago inflamado, tiroides inflamadas, cérvix inflamado, pulmón inflamado, riñones inflamados, hígado inflamado y piel inflamada.

Mediante la presente invención, se abarcan, también, otros procedimientos para detectar estados de enfermedades inflamatorias, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino. Así, por ejemplo, la presente invención, comprende adicionalmente un procedimiento para detectar estados de enfermedades inflamatorias, que comprende las etapas de: a) recolectar una muestra sospechosa, y (b) someter la muestra sospechosa, a un test de ensayo de diagnóstico, empleando la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 1, ó fragmentos de ésta, comprendiendo, el test de ensayo de diagnóstico, una reacción en cadena de la polimerasa o una hibridación de ácidos nucleicos ó (a) recolectar una muestra sospechosa, y (b) someter la muestra a un test de ensayo de diagnóstico, que comprende antisuero policlonal y/o anticuerpo monoclonal, que dan lugar a inmunógenos que comprenden la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 2, o un fragmento inmunogénico de ésta, comprendiendo, el citado test de ensayo de diagnóstico, el análisis de transferencia de Western o el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Éste proporciona, asimismo, un procedimiento para detectar estados de enfermedades antiinflamatorias, que comprende las etapas de: (a) recolectar una muestra sospechosa, y someter la muestra a un test de ensayo de diagnóstico, que comprende antisuero policlonal y/o anticuerpo monoclonal, que dan lugar a inmunógenos que comprenden la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 2, ó un fragmento inmunogénico de ésta, (b) detectar el citado antisuero policlonal y/o anticuerpo monoclonal.

Mediante la presente invención, se abarca, también un equipo de diagnóstico, a modo de kit, el cual comprende, por ejemplo: (a) un anticuerpo específico para la SEQ ID NO:2, ó una porción de enlace a un antígeno de un anticuerpo específico para SEQ ID NO:2; y (b) reactivos para detectar el citado anti-cuerpo o porción específica para la SEQ ID NO:2.

La presente invención, proporciona, también, ensayos de rastreo, para determinar si un compuesto sería efectivo en el tratamiento de un estado de enfermedad inflamatoria. Uno de estos ensayos de rastreo, comprende las etapas de: (a) incubar el compuesto con células la SEQ ID NO:2, o una variante de ésta, en la exposición a LPS; (b) determinar la extensión de la inhibición causada por el citado compuesto, en la expresión de la SEQ ID NO:2, o variante de ésta, mediante la medición de un parámetro indicativo del nivel de SEQ ID NO:2 (o variante de ésta), o m-RNA traducido a la SEQ ID NO:2 (o variante de ésta). Otro de tales tipos de ensayo de rastreo, comprende: (a) incubar *in vitro* el compuesto, con una proteína que comprende la SEQ ID NO:2, o variante de ésta, que tenga actividad quinasa, y un sustrato, con respecto a la citada actividad quinasa; (b) determinar si el compuesto inhibe la actividad quinasa de la proteína, con respecto al sustrato. La proteína de este ensayo, puede ser recombinante o de origen natural. Mediante la presente invención, se abarcan, también, los compuestos identificados por tales tipos de ensayos de rastreo.

Otro ensayo de rastreo, para identificar compuestos que mejoren los estados de enfermedad inflamatoria, comprende las etapas de: (a) cultivar separadamente una primera línea de células inmortalizada, que contiene por lo menos un gen de la SEQ ID NO:1, y una segunda línea de células inmortalizada, en donde, el gen de la SEQ ID NO:1, se inactiva; (b) someter ambas líneas de células, a un compuesto sospechoso de tener actividad antiinflamatoria; y (c) determinar si, el citado compuesto, inhibe selectivamente el crecimiento de la citada primera línea inmortalizada de células. Otra vez, los compuestos identificados por tal tipo de ensayo, se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

Y en todavía otra forma de presentación de la presente invención, se proporciona un ensayo de rastreo (y compuestos identificados mediante éste), para identificar compuestos que pueden tener un uso en la mejora de estados de enfermedades inflamatorias, tal como una enfermedad inflamatoria del intestino, debido a la modulación o alteración de actividad Pim-2, que comprende las etapas de: (a) establecer un sistema de control que comprende Pim-2 y un sustrato de Pim-2; (b) establecer un sistema de test de ensayo, que comprende Pim-2, el citado sustrato de Pim-2, y el compuesto candidato; (c) medir la actividad de Pim-2, en los sistemas de control y de test de ensayo; y (d) determinar que, el compuesto candidato, modula o altera la actividad Pim-2, si la actividad del Pim-2, en el sistema de test de ensayo, es inferior o mayor que la actividad medida para el sistema de control. El ensayo de rastreo, puede también comprender el contactar un compuesto con una célula cultivada que expresa el gen Pim-2, y detectar un cambio en la expresión del gen Pim-2, ó actividad quinasa de Pim-2, en la célula cultivada. Este procedimiento, puede comprender adicionalmente la etapa de determinar que un compuesto rastreado, es de utilidad en el tratamiento de estados de enfermedades inflamatorias, cuando la expresión del gen Pim-2, o actividad quinasa del Pim-2, en la célula cultivada, disminuye de una forma significativa mediante el compuesto rastreado. Mediante la expresión “disminuye de una forma significativa”, se pretende dar a entender el hecho de que, la expresión del gen Pim-2, o actividad quinasa de Pim-

2, se reduce en un porcentaje de más de aproximadamente un 50%, de una forma preferible, en un porcentaje de más de aproximadamente un 100% y, de una forma más preferible, en un porcentaje de más de aproximadamente un 200%. Estos procedimientos, pueden también emplearse para identificar compuestos que pueden tener un uso en la mejora de los estados de enfermedades inflamatorias, asociados con el páncreas inflamado, unas amígdalas inflamadas, un
 5 intestino inflamado, (incluyendo los intestinos delgado y grueso y el recto), revestimiento del estómago inflamado, tiroides inflamadas, cérvix inflamado, pulmón inflamado, riñones inflamados, hígado inflamado y piel inflamada.

De una forma alternativa, los compuestos, pueden rastrearse para una actividad en el tratamiento de estados de enfermedades inflamatorias y estados de enfermedades inflamatorias, asociados con un páncreas inflamado, unas amígdalas inflamadas, un intestino inflamado, (incluyendo los intestinos delgado y grueso y el recto), revestimiento del
 10 estómago inflamado, tiroides inflamadas, cérvix inflamado, pulmón inflamado, riñones inflamados, hígado inflamado y piel inflamada.

En los procedimientos de rastreo de la presente invención, un cambio en el nivel de expresión de citocinas pro-inflamatorias, tales como la IL-6, comparado con el de control, es una indicación de actividad Pim-2. Pueden determinarse las diferencias en los niveles de expresión, utilizando procedimientos conocidos en el arte especializado de la técnica, incluyendo, pero no de una forma limitativa en cuanto a ésta, a la tecnología de la interferencia de RNA (RNAi) (Elbashir, S. M. *et al.*, 2001, Nature, 411, 494-498).

Los compuestos candidatos identificados y/o aislados mediante cualquiera de estos procedimientos, se abarcan también, mediante la presente invención.

Se encuentran también incluidos, los procedimientos para tratar animales afectados de estados de enfermedades inflamatorias, y prevenir el desarrollo de estados de enfermedades inflamatorias, los cuales incluyen, pero no de una
 25 forma limitativa en cuanto a ésta, a una enfermedad inflamatoria del intestino.

En un procedimiento, el tratamiento, se lleva a cabo mediante la administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva, de un compuesto antisentido, que objetiviza, como diana, una secuencia de ácido nucleico, que codifica al Pim-2. En todavía otra forma de presentación, se proporciona un procedimiento para tratar un estado
 30 de enfermedad inflamatoria, tal como una enfermedad inflamatoria del intestino, la cual comprende el administrar, a un paciente con necesidad de éste, un oligonucleótido que hibrida específicamente a un transcripto que codifica la Pim-2 humana, y que suprime la expresión del Pim-2 humano, como su ingrediente efectivo, y un portador o vehículo farmacológicamente aceptable. En todavía otro procedimiento, se administra, a un paciente, una cantidad de un agente que inhibe la producción de Pim-2, en donde, el agente, es una construcción antisentido que objetiviza, como diana, las
 35 secuencias que codifican el Pim-2, bajo las condiciones en las que se efectúa el tratamiento. En otro procedimiento, el agente es una construcción de RNA de corta interferencia (si), que objetiviza, como diana, las secuencias que codifican al Pim-2.

Los procedimientos anteriormente descritos, arriba, de diagnosticar, controlar la eficacia de fármacos antiinflamatorios, detectar, rastrear e identificar, funcionan particularmente bien, con respecto a enfermedades inflamatorias del
 40 intestino, de una forma particular, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa.

Descripción reducida de los dibujos

La figura 1, muestra los cambios múltiples de la expresión de Pim-2-mRNA, en personas que sufren de diferentes estados de enfermedades inflamatorias, al compararse con la expresión de Pim-2-mRNA en personas que no sufren de dichos estados de enfermedades inflamatorias. El número de muestras de donantes sometidas a tests de ensayo, se indica mediante (n). Los niveles de expresión de mRNA, se obtuvieron mediante series de distribución de genes en
 45 obleas, del tipo "Affymetrix Gene Chip arrays", tal y como se describen (Lockhard, D. J. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14: 1675-1680 (1996)). Los valores p de confianza, se calcularon en base al test de ensayo de dos muestras modificado de Welch, de dos lados.

La figura 2, muestra la expresión de Pim-2-mRNA, en tejido de intestino inflamado, según se compara con la expresión de Pim-2-mRNA, en tejido de intestino no inflamado de los mismos pacientes diagnosticados con colitis ulcerativa. "A", indica tejido inflamado y "B", indica tejido "no inflamado". Los cuatro diferentes pacientes, se numeran
 55 como 1, 2, 3 y 4.

La figura 3, muestra los resultados de tres experimentos, en donde, la expresión Pim-2, se midió en líneas de células THP-1, estimuladas y no estimuladas con liposacárido. Los valores de los múltiples cambios, se derivaron a partir de la comparación de la expresión de Pim-2-mRNA en células THP-1, estimuladas con LPS, durante un transcurso de
 60 tiempo de 6 horas, con respecto a la expresión de Pim-2-mRNA, en THP-1 no estimulada.

La figura 4, muestra que la Pim-2-mRNA, se induce mediante la estimulación de anti-CD3 ó de IL-12/IL-18, en células CD4+ Th1. Se estimularon células esplénicas DO11.10, con OVA, IL-12 y anti-IL-4, durante un transcurso de tiempo de 4 días. Las células CD4+, se recolectaron y estimularon con anti-CD3 ó IL-12/IL-18, durante un transcurso
 65 de tiempo de 16 horas; se extrajo el RNA total y se sintetizó la primera hebra de cDNA. El mRNA de Pim-2 e IFN- γ , se detectaron mediante análisis de TaqMan. Los niveles de expresión de mRNA de cada gen, se presentan como valores en porcentajes del número medio de copias de mRNA, en la muestra estimulada de IL-12/IL-18.

La figura 5, muestra el hecho de que, el Pim-2 recombinante purificado, es activo en la fosforilación de Histona. Se expresó Pim-2 marcado con His, y se purificó a partir de *E. coli*. Se sometieron a tests de ensayo las cantidades indicadas de Pim-2, en un tampón que contenía 25 mM HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 10 μM ATP fría, 1,5 μCi[γ³³P]-ATP, 10 μg Histona III (el tipo es de timo de ternero) a la temperatura ambiente (- ● - μg enzima versus His-Pim-2; (··· ● ··· μg enzima versus Pim-2, 30 min; ··· ▼ ··· μg enzima vs. His-Pim-2, 60 minutos). Se procedió a medir la incorporación de ³³P en Histona.

La figura 6, muestra el hecho de que se requiere Pim-2, para la expresión de IL-6 NTFα-inducida en células HeLa. Los dúplex de Pim-2 siRNA (Pim2_1 control invertida, PIM2_1 a 200 nM). por se transfectaron en células HeLa, durante un tiempo de 2 días. A continuación, las células, se trataron con varias concentraciones (entre 0,16 y 20 ng/ml) de TNFα, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, antes de que su RNA celular total, se preparara para análisis de PCR a tiempo real, con Taq-Man. Las RT y PCR, se llevaron a cabo utilizando cuantificación de Taq-Man (mostrando un número de copias de mRNA detectado en 20 ng de RNA total). El número de copias de transcritos de genes, se determinó en concordancia con los patrones standard de DNA y se normalizó con Gapdh humana. Todas las reacciones de PCR con Taq-Man de cada muestra individual, se realizaron por triplicado y, a continuación, se procedió a determinar el número de copias y error standard.

Descripción detallada de la invención

20 1.- Definiciones

Las definiciones que se facilitan a continuación, se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos utilizados aquí.

25 Mediante “anticuerpos”, se pretende dar a entender que se incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, de cadena individual y humanizados, así como fragmentos de Fab., incluyendo el producto de una Fab o de otra biblioteca de expresión de inmunoglobulina.

30 Mediante “células”, se pretende dar a entender que se incluyen células de cualquier forma, incluyendo, pero no de u una forma limitativa en cuanto a éstas, a células retenidas en tejidos, agrupaciones de células y células aisladas individuales.

Mediante “línea celular” (o línea de células), se pretende dar a entender un clon de una célula primaria, la cuales es capaz de un crecimiento estable, *in vitro*, para muchas generaciones.

35 Mediante “clon”, se pretende dar a entender una población de células derivadas de una célula individual o ancestro común mediante mitosis.

40 Mediante “secuencia codificadora”, se pretende dar a entender una secuencia de DNA de doble hebra, la cual se transcribe y se traduce en un polipéptido *in vivo*, cuando se emplaza bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora, se determinan mediante un codón de inicio, en el (amino)termino 5' y un codón de paro, en el (carboxi)termino 3'. Una señal de poliadenilización y secuencia de terminación de transcripción, se encontrarán usualmente localizadas (corriente abajo de) 3', en la secuencia de codificación.

45 Mediante material “exógeno”, se pretender dar a entender material que se ha introducido en una célula, organismo, etc., que se ha originado fuera de la misma.

50 Mediante región “heteróloga” de una construcción de DNA, se pretende dar a entender un segmento identificable de DNA, dentro de una molécula de DNA más grande, que no se encuentra en asociación con la molécula más grande, en la naturaleza.

55 Mediante “aislamiento” de un material (o aislar un material), se pretende dar a entender cambiar el entorno medioambiental del material, o retirar un material de su entorno medioambiental original, o ambos. Así, por ejemplo, cuando un polinucleótido o un polipéptido se separa de sus materiales coexistentes de su estado natural, éste se “aísla”.

60 Mediante secuencias nucleótidas “operativamente unidas”, se pretende dar a entender una yuxtaposición tal que, la funcionalidad de las secuencias, se conserva. Así, por ejemplo, una secuencia codificadora “operativamente unida” a un promotor, se posiciona de tal forma que, el promotor, es capaz de efectuar la expresión de las secuencias codificadoras.

65 Mediante “polinucleótido”, se pretende dar a entender cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, el cual puede ser RNA ó DNA no modificado, ó DNA ó DNA modificado. Tal y como se utiliza aquí, el término “polinucleótido”, incluye, sin ninguna limitación, moléculas híbridas de DNA y RNA de hebra individual y de doble hebra, que comprenden DNA y RNA que puede ser de hebra individual, o de una forma más típica, de doble hebra, o un mezcla de regiones de hebra individual o de doble hebra. El término “polinucleótido”, puede adicionalmente referirse a regiones de triple hebra, que comprenden RNA ó DNA, ó ambos, DNA y RNA. “Polinucleótido”, abarca a las formas químicamente, enzimáticamente ó metabólicamente modificadas de polinucleótidos típicamente encontrados en la naturaleza, así como también a las formas químicas de DNA y RNA, características de virus y células. El

término, se pretende que abarque a ambas, tanto secuencias largas de nucleótidos así como a las secuencias cortas de oligonucleótidos, a las cuales se les hace referencia, a menudo, como oligonucleótidos y oligómeros.

Mediante el término “polipéptido”, se pretende dar a entender cualquier péptido o proteína, que comprende dos o más aminoácidos, unidos entre ellos, mediante enlaces de péptidos, o enlaces de péptidos modificados, es decir, isómeros de péptidos. Los polipéptidos, pueden comprender aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados en genes, e incluyen aminoácidos modificados naturalmente o sintéticamente.

Mediante “polipéptido Pim-2”, se quiere dar a entender que se incluye las SEQ ID NO:2, y polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, que tiene por lo menos un 80% de identidad, de una forma todavía más preferible, un 90% de identidad y, de una forma todavía más preferible, un 95% de identidad, con la SEQ ID NO:2, en la totalidad de su longitud. El polipéptido Pim-2, puede ser en forma de una proteína “natural”, o puede ser parte de una proteína más larga, tal como una proteína de fusión, y puede incluir secuencias secretorias o líder, pro-secuencias que ayudan en la purificación, o secuencia adicional para la estabilidad durante la producción de recombinantes.

Mediante célula “recombinante” o “de ingeniería genética”, se pretende dar a entender una célula, en el interior de la cual, se ha introducido un gen recombinante, por mediación de la mano humana. Los genes introducidos recombinantemente, pueden ser en forma de un gen de cDNA (es decir, carente de intrones), una copia de un gen genómico, (es decir, incluyendo intrones con los exones), genes producidos por medios sintéticos, y/o pueden incluir genes posicionados adyacentes a un promotor, u operativamente asociados con el gen particular introducido.

Mediante “replicón”, se pretende dar a entender un elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus), que funciona como una unidad autónoma de replicación de DNA *in vivo*, es decir, capaz de replicación bajo su propio control.

Mediante “célula transformada”, se pretende dar a entender una célula, en la cual, se ha introducido DNA exógeno o heterólogo. El DNA transformante, puede estar integrado, o puede no estar integrado (unido de forma covalente), en el DNA cromosómico que forma el genoma de la célula. El DNA transformante, puede mantenerse en un elemento episomal, tal como un plásmido.

Mediante “variante”, se pretende dar a entender una secuencia, tal como un polinucleótido o polipéptido, que difiere de otra secuencia, pero que retiene propiedades esenciales. Así, por ejemplo, una variante de un polinucleótido, puede diferir en secuencia nucleotídica, mediante una o más sustituciones, y deleciones, con respecto al polinucleótido de referencia.

Mediante “vector”, se pretende dar a entender un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al cual se le puede unir otro segmento de DNA, de tal forma que se produzca el replicón del segmento unido.

2.- Ensayos de diagnóstico para la determinación de estados de enfermedades inflamatorias

Los presentes inventores, han descubierto, de una forma sorprendente, el hecho de que, la transcripción y traducción del Pim-2, se mejora de una forma significativa, en estados de enfermedades inflamatorias. De una forma particular, tal y como se muestra en la figura 1, los presentes inventores, han descubierto el hecho de que, la expresión del Pim-2 humano y su molde de mRNA, se incrementan de una forma dramática, en tejidos seleccionados de humanos diagnosticados con colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn, dos enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedades de las tiroides inflamadas, enfermedades del estómago inflamado, enfermedades del páncreas inflamado, cérvix inflamado, tejido pulmonar inflamado, riñones inflamados, hígado inflamado, y piel inflamada, al compararse con tejidos de humanos sin tales estados de enfermedades inflamatorias o en remisión de tales estados de enfermedades inflamatorias (controles). Se han observado también incrementos en la expresión de h-Pim-2 y sus moldes de mRNA, en amigdalitis, tiroiditis y enfermedad del recto inflamado. Tal y como puede verse en la fig. 2, la expresión de mRNA en h-Pim-2, era significativamente superior (2-3 veces), en tejidos inflamados del colon, de personas que sufren de colitis ulcerativa de enfermedades del intestino inflamado, si se comparan con tejido de colon no inflamado.

Las enfermedades inflamatorias, pueden diagnosticarse mediante procedimientos que comprenden el determinar, a partir de una muestra derivada de un sujeto, la extensión de transcripción y traducción de Pim-2, al compararse con la transcripción y traducción del gen, en una población normal (es decir, que no sufren de la enfermedad inflamatoria). La caracterización de la expresión, en el nivel de RNA, puede realizarse utilizando cualesquiera de los procedimientos bien conocidos en el arte especializado de la técnica, para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, PCR, RT-PCR, protección de RNasa, transferencia de Northern y otros procedimientos de hibridación. Los niveles de polipéptido Pim-2, pueden ensayarse de una forma semejante, utilizando técnicas bien conocidas en el arte especializado de la técnica, incluyendo, tales técnicas, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstas, los ensayos de enlace competitivo, el análisis de transferencia de Western, y los ensayos ELISA. La tecnología de microseries de distribución (microarray technology), se conoce bien, y tiene una aplicabilidad general en la expresión genética de gauge (de calibración).

3.- *Ensayos de rastreo*

El descubrimiento inesperado en cuanto al hecho de que, la expresión de Pim-2, se mejora de una forma significativa, en ambos niveles, el nivel transcripcional y el nivel traductor, en estados de enfermedades inflamatorias, ofrece nuevos procedimientos de rastreo para aislar compuestos que disminuyen (o incrementan) la gravedad del estado de enfermedad inflamatoria.

Los agonistas y antiagonistas de Pim-2, o de la transcripción y/o traducción del gen Pim-2, puede encontrar un uso en el tratamiento de estados inflamatorios.

Los antagonistas, pueden emplearse para propósitos terapéuticos y profilácticos, para hacer decrecer la inflamación, procediendo a hacer decrecer la actividad Pim-2, en el tejido u órgano afectado. Los antagonistas de actividad Pim-2, pueden encontrar un uso particular, en el mejoramiento de enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedades inflamatorias de las tiroides, enfermedades inflamatorias del estómago, y enfermedades inflamatorias del páncreas, en donde, la expresión incrementada del gen, se ve que es alta, en individuos afectados. Los antagonistas, pueden también encontrar un uso, en el mejoramiento de las condiciones inflamatorias vistas en otros tejidos, incluyendo, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, al pulmón, la piel, los riñones, y las tiroides. Puesto que, el Pim-2, se expresa ampliamente en tejidos del cuerpo, los antagonistas de actividad de la línea básica de Pim-2, pueden encontrar un uso en una variedad de estados inflamatorios, distintos de estas enfermedades inflamatorias, incluyendo (pero no de una forma limitativa en cuanto a éstas) al síndrome de la enfermedad respiratoria en el adulto (ARDS), alergias, asma, dermatitis, osteoartritis, psoriasis, artritis reumatoidea.

Los procedimientos de rastreo, pueden acarrear la utilización de células apropiadas que expresen Pim-2 ó que respondan al polipéptido Pim-2 de la presente invención. Tales tipos de células, incluyen a las células de mamíferos, levadura, *Drosophila* ó *E. coli*. Una línea celular particularmente de utilidad, es la THP-1, una línea celular humana de leucemia monolítica aguda, comercialmente obtenible en el mercado, de procedencia de la American Type Culture Collection, Rockville, MD (USA), la cual exhibe una morfología celular semejante a la linfoblástica, tiene receptores Fc y C3b, y carece de inmunoglobulinas de superficie y citoplásmicas (estas células, marcan como positivas para la alfa-naftil-butilato-estearasa, producen lisozimas, y son fagocíticas). Las células que expresan Pim-2, ó que responden a Pim-2, pueden ponerse en contacto con un compuesto de test de ensayo, para determinar el efecto del compuesto de test de ensayo en la actividad Pim-2. Los compuestos de test de ensayo que demuestran acción para reducir la actividad Pim-2, con respecto a tales tipos de células, pueden considerarse como buenos candidatos como agentes terapéuticos en el tratamiento de estados de enfermedades inflamatorias.

Las células que expresan Pim-2, puede ser células transformadas, de tal forma que expresen la SEQ ID NO:2, o una variante de ésta. El polipéptido Pim-2 de la SEQ ID NO:2, puede prepararse en ambos sistemas, el sistema procariótico y el sistema eucariótico. Pueden realizarse construcciones, en donde, la secuencia de codificación para el polipéptido, venga precedida por un péptido de señal operativo, el cual tiene como resultado la secreción de la proteína. Las particularidades para la construcción de los sistemas de expresión, y de purificación de polipéptidos, y segmentación de péptidos de fusión, son bien conocidas, por parte de aquéllas personas comúnmente expertas en el arte especializado de la técnica. La tecnología para la introducción de DNA en células, incluye cuatro procedimientos generales: (1) procedimientos físicos, tales como la micro-inyección, la electroporación, y el cañón génico (véase, por ejemplo, Johnston *et al.*, Gen gun transfection of animal cells and genetic immunization, -Transfección mediante cañón génico, de células animales, e inmunización genética-, 43(A) Methods Cell. Biol. 353-35 (1994)); (2) vectores víricos (véase, por ejemplo, Eglitis *et al.*, Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells, -Vectores retrovíricos para la introducción de genes en células de mamíferos-, 6 (7) Biotechniques 608-614 (1988); (3) Procedimientos químicos (véase, por ejemplo, Zatloukal *et al.*, Transferrinfection: A highly efficient way to Express gene constructs in eukariotic cells, -Transferrinfección: Una vía altamente eficiente para expresar construcciones génicas en células eucarióticas-, 660 Ann. N.Y. Acad. Sci. 136-153 (1992)), y (4) mecanismos mediatizados por receptores (véase por ejemplo, Wagner *et al.*, Coupling of adenovirus to transferrin-polisine/DNA complexes greatly enhances receptor mediated gene delivery and expression of transfected genes, -EL acoplamiento de adenovirus a complejos de transferrina-polisina/DNA, mejora ampliamente el suministro génico mediatizado por receptores y la expresión de los genes transfectados-, 89 (13) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 6099-6102 (1992)).

Tal y como se comprenderá por parte de una persona comúnmente experta en el arte especializado de la técnica, una modificación menor de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, puede dar como resultado un polipéptido que tenga una actividad substancialmente equivalente al compararse con la SEQ ID NO:2. Mediante "modificación" de la secuencia primaria de aminoácidos, se pretende dar a entender el hecho de que, ésta, incluye "deleciones" (es decir, polipéptidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos, se encuentran ausentes), "adiciones" (es decir, un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos adicionales, si se compara con el polipéptido especificado), "sustituciones" (es decir, un polipéptido, el cual resulta del reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos), y "fragmentos" (es decir, un polipéptido consistente en una secuencia primaria de aminoácidos, la cual es idéntica a una porción de la secuencia primaria del polipéptido especificado). Mediante "modificación", se quiere también dar a entender, que se incluyen polipéptidos que se encuentran alterados o modificados, como resultado de eventos post-traducción, los cuales cambian, por ejemplo, la glicosilación, la amidación, el modelo patrón de lipidación, o la estructura primaria, secundaria o terciaria del polipéptido.

ES 2 307 769 T3

Se conoce, en el arte especializado de la técnica, el hecho de que, ciertos aminoácidos, pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan un índice o puntuación hidropática similar, y que todavía tengan como resultado un polipéptido que tenga una actividad biológica similar. En la realización de tales tipos de cambios, la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos se encuentren comprendidos dentro de unos márgenes de ± 2 , son los que se prefieren, prefiriéndose más, aquéllos que cuyos índices se encuentren comprendidos dentro de unos márgenes de ± 1 , y prefiriéndose todavía más, aquéllos que cuyos índices se encuentren comprendidos dentro de unos márgenes de $\pm 0,5$. De una forma similar, los aminoácidos seleccionados, pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan una hidrofiliidad o capacidad hidrofílica similar a la que se expone en la patente estadounidense US nº 4.554.101 (la cual se incorpora aquí, en este documento, en su totalidad, a título de referencia). En la realización de tales tipos de cambios, al igual que con los índices hidropáticos, la sustitución de aminoácidos cuyos índices de hidrofiliidad se encuentren comprendidos dentro de unos márgenes de ± 2 , son los que se prefieren, prefiriéndose más, aquéllos que cuyos índices se encuentren comprendidos dentro de unos márgenes de ± 1 , y prefiriéndose todavía más, aquéllos que cuyos índices se encuentren comprendidos dentro de unos márgenes de $\pm 0,5$ (véase, por ejemplo, Kyte *et al.*, 157 J. Mol. Bio. 105-132 (1982), que incorpora aquí, en este documento, en su totalidad, a título de referencia).

Los cambios conservadores de aminoácidos, pueden realizarse procediendo a cambiar los codones de secuencias de DNA, utilizando, por ejemplo, la redundancia conocida en el código:

TABLA 1

<u>Aminoácido</u>	<u>Designación de tres letras</u>	<u>Designación de una letra</u>	<u>Codones</u>
Alanita	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisterna	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

En este aspecto, la presente invención, se refiere, también, a vectores que comprenden Pim-2, ó una variante de éste, y células huésped, las cuales se diseñan mediante ingeniería genética, con vectores de la invención, y a la producción de polipéptidos de Pim-2, mediante técnicas de recombinantes. Los sistemas de traducción libres de células, pueden también emplearse, para producir tales tipos de proteínas, utilizando RNAs derivados de las construcciones de DNA de la presente invención

El polinucleótido Pim-2 de la SEQ ID NO:1, puede obtenerse utilizando clonación y rastreo standard, por ejemplo, a partir de una biblioteca de cDNA derivada de mRNA o a partir bibliotecas de DNA genómico, o puede sintetizarse utilizando procedimientos bien conocidos y técnicas comercialmente disponibles en el mercado. Cuando el polinucleótido se utiliza para la producción de recombinantes, es decir, para producir células recombinantes, éste puede consistir en el polipéptido maduro, o un fragmento de éste, o puede incluir otras secuencias de codificación, tales como una secuencia líder o secretoria, una pre-, ó pro-, ó pre-pro-secuencia, u otras porciones de péptidos de fusión.

Las células huésped que deben transformarse, pueden diseñarse mediante ingeniería genética, para incorporar sistemas de expresión del polipéptido Pim-2. La introducción de la secuencia polinucleótida de la expresión de Pim-2 en la célula huésped, puede efectuarse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tal y como de describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., -Clonación molecular: Un manual de laboratorio, 2ª Edición-, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), tal como la transfección de fosfato cálcico, transacción mediada con DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección catiónica mediada por lípidos, electroporación, transducción, carga mediante roce, introducción balística o infección. Generalmente, puede utilizarse cualquier sistema o vector apropiado para mantener, propagar o expresar el polinucleótido, para producir el polipéptido.

Los presentes inventores, han demostrado adicionalmente el hecho de que, el gen Pim-2, es una diana de “bona fide” de NF- κ B, en virtud de su respuesta al I κ B α SR (super represor), y que, su expresión, puede inducirse mediante liposacáridos (“LPS”) (J. Biol. Chem. 276: 13579 (2001)). Estudios realizados por parte de los presentes inventores, sugieren el hecho de que la regulación up (regulación hacia arriba) del Pim-2 en células, mediante LPS, se controla mediante la trayectoria del HCK/NF- κ B. La trayectoria de la transducción de la señal del NF- κ B, involucra una serie de etapas intracelulares que fomentan la fosforilización y la subsiguiente disociación de la proteína inhibitoria de I κ B, procedente del complejo inactivo de NF- κ B. Se cree que, el NF- κ B liberado, se transloca al núcleo, en donde, éste, se une al elemento mejorador k, en el DNA, y que puede activar la transcripción del gen Pim-2. Puesto que, la trayectoria de transducción de señal de NF- κ B, se induce también mediante THF, IL-1 y forbol-éster, estos compuestos, pueden también utilizarse para inducir actividad Pim-2.

La expresión con LPS, de varias líneas celulares, incluyendo a los monocitos humanos (THP-1) y pre-células B de ratones, según se ha visto por parte de los presentes inventores, se incrementa en aproximadamente 10 veces. Así, de este modo, una célula estimulada mediante LPS (u otro inductor de la trayectoria de transducción de señal de NF- κ B), puede utilizarse, de una forma ventajosa, para mejorar la detección de compuestos que pueden poseer actividad anti-inflamatoria, asociadas con actividad de línea de base de Pim-2. La figura 3, ilustra tres diferentes experimentos, llevados a cabo para determinar el cambio multiplicador de la transcripción de Pim-2-RNA, en líneas celulares de THP-1, siendo, el cambio multiplicador, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 8,4 a 18,6.

La enfermedad de Crohn, se mediatiza, “*inter alia*”, mediante células Th1 activadas. Los cultivos de células T procedentes de pacientes con la enfermedad de Crohn, producen unos niveles significativamente más altos de INF- γ y TNF- α , que los cultivos de células T procedentes de controles sanos (Agholt, J. y K. Kalltoft, Citokine 15(4): 212-222 (2001)). La figura 4, ilustra un experimento llevado a cabo para determinar la inducción de Pim-2 e IFN α , mediante la estimulación con anti-CD3 ó IL-12/IL-18 de las células CD4⁺ Th1. Tal y como puede verse en la figura 4, la expresión de Pim-2-mRNA, en células CD4⁺ Th1 estimuladas, se había incrementado de una forma significativa, comparándola con la de las células de control no estimuladas.

Las líneas celulares, pueden activarse de una forma alternativa, o pueden también activarse, para expresar Pim-2, mediante la exposición de las células a pro-virus de leucemia mürda de Moloney.

Los procedimientos de rastreo, pueden también acarrear un test de ensayo para determinar el enlace de un compuesto candidato con Pim-2, en sí mismo. El enlace, puede detectarse mediante cualesquiera de los procedimientos que son bien conocidos en el arte especializado de la técnica, como por mediación con un marcador directamente o indirectamente asociado con un compuesto candidato o mediante la medición de la competencia con un competidor marcado, tal como un agonista de la actividad Pim-2 identificado mediante la presente invención, el cual se encuentre que se enlaza al Pim-2, en sí mismo. Los procedimientos standard para conducir tales tipos de ensayos de rastreo, se entienden bien, en el arte especializado de la técnica. Los indicadores de actividad Pim-2, pueden incluir, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a las diferencias en la actividad quinasa, comparada con el control o cambios en los niveles de expresión de substancias pro-inflamatorias, por ejemplo, TNF- α , IL-6, 3 INF- γ .

4.- Tratamiento de estados inflamatorios, empleando agentes dirigidos al gen y polipéptido Pim-2

La secuencia nucleótida del Pim-2, se reporta a los números de acceso del banco de genes (GenBank Accesion Nos.) NM_006875/U77735, basados en los datos de secuencia reportados por parte de Baytel *et al.*, Biochim. Acta 1442 : 274 (1998) (SEQ ID NO:3). Los presentes inventores, han descubierto el hecho de que, la secuencia de co-
 5 dicación del polinucleótido reportada, del Pim-2, por parte de Baytel *et al.*, difiere de la obtenida por éstos, en la secuencia de clones “image”-EST, que comprenden el gen Pim-2. La secuencia polinucleótida Pim-2 de Baytel *et al.*, indica una timidina (“t”) adicional, en la posición 1063 ó 1064, en la región de codificación, de forma opuesta a las SEQ ID NO: 1, obtenida por parte de los presentes inventores, y una secuencia de codificación, en las posiciones
 10 185-1120, de forma opuesta a la secuencia de codificación 185 a 1117, obtenida por parte de los presentes inventores.

Tal y como se conoce bien en el arte especializado de la técnica, una inserción (o delección) individual, en una secuencia nucleótida, comparada con la secuencia real, provocará un cambio del marco de lectura en la traducción de la secuencia nucleótida, de tal forma que, la secuencia de aminoácidos pronosticada codificada por una secuencia
 15 nucleótida determinada, será diferente de la secuencia de aminoácidos realmente codificada por la molécula de DNA secuenciada, que empieza en el punto de tal inserción (o delección). Los presentes inventores, han determinado el hecho de que, éste es el caso, con respecto a la secuencia de aminoácidos reportada por parte de Baytel *et al.* La secuencia (SEQ ID NO: 4) de Baytel *et al.*, indica el hecho de que, el Pim-2, tiene 41 aminoácidos, que no se encuentran en la SEQ ID NO: 2, y que, éste, comprende veintitrés aminoácidos adicionales, si se compara con dicha SEQ ID NO:
 20 2, debido a un codón de paro tardío. Los presentes inventores, han determinado el hecho de que, la SEQ ID NO: 1, codifica el Pim-2 de tipo salvaje. La secuencia polinucleótida de Baytel *et al.* para el Pim-2, puede diferir del tipo salvaje, debido al material de fuente para su secuenciación, comprendiendo un polimorfismo en forma de una mutación adicional, o puede haber resultado a partir de un error de secuenciación.

Se encuentra un soporte para el polipéptido SEQ ID NO:2, en datos de secuencias genómicas suministrados por parte de Ishida *et al.*, en el NCBI: AB042425, con respecto a la organización genómica del gen transportador humano de UDP-galactosa, a partir de los cuales, éstos pronostican un polipéptido “homólogo” del proto-oncogén Pim-2 (SEQ ID NO: 5), que corresponde al polipéptido Pim-2 descubierto por la presente invención. Hasta la fecha, ha habido una
 25 carencia de consistencia en la predicción o pronosticación de genes humanos, a partir de secuencias genómicas (Hogenesch, *et al.*, Cell 106: 413-415 (2001). Debido a errores potenciales de exones pronosticados a partir de secuencias genómicas, Ishida *et al.*, no pudieron señalar la mutación del error de secuencia en el registro del h-Pim-2 (acceso: U77735), y en lugar de ello, éstos denominaron a la secuencia péptida pronosticada como homólogo de Pim-2. Un soporte para el polinucleótido de la secuencia SEQ ID NO:1, así como para el polipéptido de la secuencia SEQ ID NO:2, se encuentra en los NCBI:XM_010208 (SEQ ID NO:6) y NCBI:XP_010208 (SEQ ID NO:7), presentados y aducidos,
 30 ambos, por el Nacional Center for Biotechnology, que se basan en datos de secuencia, derivados mediante análisis computacional automatizado “coting” de secuencia genómica NCBI, NT_011611, utilizando metodología de predicción genética de ensamblaje, indican secuencias polinucleótidas y polipeptídicas correspondientes a las encontradas por parte de los presentes inventores.

La figura 5, ilustra el hecho de que, el polipéptido Pim-2, según se caracteriza por parte de los presentes inventores, es capaz de fosforolizar histonas, en una forma dependiente de la concentración.

La invención, contempla la mejora y/o tratamiento de tales tipos de enfermedades, mediante la administración de una cantidad inhibitoria de Pim-2 de un inhibidor de actividad Pim-2. Tal y como se comprenderá por parte de una
 45 persona comúnmente experta en el arte especializado de la técnica, los inhibidores de utilidad de actividad Pim-2 en el nivel celular, incluyen, pero no de una forma limitativa en cuenta a éstos, a compuestos que inhiben la actividad quínasa de Pim-2 y/o reducen la expresión de Pim-2, tanto en el nivel de transcripción como en el nivel de traducción, y/o incrementan la degradación de Pim 2, y/o inhiben la interacción de Pim-2, con uno o más de sus moduladores/substratos, corriente arriba o corriente abajo, e incluyen anticuerpos, o fragmentos de análogos de éstos. En una
 50 forma de presentación de la presente invención, el inhibidor de actividad Pim-2, se identifica por mediación del test de ensayo de rastreo descrito anteriormente, arriba.

Los estados de enfermedades inflamatorias, pueden tratarse mediante la inhibición de la expresión del gen Pim-2, utilizando técnica de bloqueo de expresión, siendo dichas técnicas conocidas, por parte de aquellas personas comúnmente expertas en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, tales técnicas, pueden involucrar el uso
 55 se secuencias antisentido, bien ya sea internamente generadas, o bien ya sea separadamente administradas (véase, por ejemplo, O'Connor, J. Neurochem. 56: 560 (1991), o la formación de triples hélices con el gen (véase, por ejemplo, Dervan *et al.*, Science 251: 1360 (1991). De una forma alternativa, tales tipos de técnicas, pueden utilizar tecnología de interferencia de RNA (RNAi)(a la cual se le hace también referencia como tecnología de interferencia corta de RNA (siRNA). La figura 6, ilustra estudios de destrucción genética, de las células HeLa, utilizando la tecnología de siRNA (Elbashir, S.M. *et al.*, 2001, Nature, 411, 494-498). SiRNA-oligo (Pim-2; sentido: 5'-GU GAUUCGGGAAUCGUGT-3' (SEQ ID NO:8), antisentido: 5'-CACGAUUCGGGGAAUACACTT-3' (SE1 ID NO:9), se designó que destruía específicamente la expresión de DNA del Pim-2. El siRNA oligo, inverso (Pim-2-1 inv; sentido: 5'-GUGCUAAGGCCCUUAGUGTT-3' (SEQ ID NO:10), antisentido: 5'-CACUAAGGGGCCUAG
 60 CACTT-3' (SEQ ID NO:11)), se utilizó como control. El rol interpretativo del Pim-2, en la mediación de la inflamación, puede por lo menos explicarse por su función en el control de la expresión de interleucina-6 (IL-6). La IL-6, en una citosina pro-inflamatoria mayor. La producción incrementada de IL-6, se ha reportado, tanto en la enfermedad de Crohn, como en la enfermedad de la colitis ulcerativa (Braegger CP *et al.*, 1994, Ann Allergy, 72, 135-141). Los

ratones con IL-6, muestran una respuesta inflamatoria defectuosa (Fattori *et al.*, J. Exp Med 1994, 180 : 1243-1250). Tal y como se muestra en la figura 6, cuando se suprimió la expresión de Pim-2, mediante su siRNA-oligo (Pim-2-1), la expresión de IL-6, se redujo, cuando las células se estimularon con varias dosis de TNF- α . Tal tipo de regresión, es gen-específica, puesto, el mismo siRNA, no tenía un efecto significativo en la producción de IL-8, como respuesta al TNF- α (figura 6).

Los estados de enfermedades inflamatorias, pueden también tratarse por mediación de anticuerpos, o vacunas formuladas para inducir una respuesta inmunológica en el animal afectado, de tal forma que se interfiera con la actividad Pim-2 en la célula. Así, por ejemplo, pueden generarse anticuerpos contra el polipéptido Pim-2 de la presente invención, mediante la administración de Pim-2, o un fragmento de éste, portador de epítopes, a un animal capaz de generar tales tipos de anticuerpos, utilizando protocolos de rutina. Para la preparación anticuerpos no clónicos, puede utilizarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos continuos de líneas de células (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Técnicas para la producción de anticuerpos de cadena individual, se dan a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense U.S. nº 4.946.778, y se utilizan para producir anticuerpos de cadena individual, para los polipéptidos de la presente invención. Para expresar anticuerpos humanizados, pueden utilizarse adicionalmente animales no humanos. Las vacunas, pueden comprender el inocular un mamífero con un polipéptido Pim-2, o un fragmento de éste, en una concentración apropiada, para proteger al animal contra el estado de enfermedad inflamatoria que se contempla prevenir. Puesto que, los polipéptidos, pueden degradarse en el entorno medioambiental gástrico, se prefiere administrar las vacunas proteínicas parenteralmente.

Los polipéptidos o moléculas pequeñas, pueden formularse en combinación con un vehículo o portador apropiado. Los vehículos o portadores, incluyen, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a sueros salinos, sueros salinos tamponizados, agua, dextrosa, glicerol, etanol, y combinaciones de éstos. La formulación de la composición, dependerá, por supuesto, de la vía o ruta de administración y de las características del activo. Las técnicas de formulación, son bien conocidas en el arte especializado de la técnica. Puede emplearse cualquier modo de administración, siempre que, el activo, realice un efecto en el tejido inflamado, incluyendo, tal tipo de administración, sin limitación, la administración parenteral (incluyendo la administración subcutánea, intramuscular e intraperitoneal), la administración enteral (incluyendo la administración oral y rectal), la administración dérmica y transdérmica, y la administración ocular y aural. La invención, se refiere, también, a packs farmacéuticos y equipos a modo kits farmacéuticos, que comprenden uno o más recipientes contenedores cargados con un activo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar un estado de enfermedad inflamatoria, en el que se utiliza una muestra de tejido obtenida de un paciente, comprendiendo, dicho procedimiento, las etapas de:
 - (a) medir un parámetro indicativo del nivel de Pim-2, ó Pim-2-mRNA, en la muestra de tejido del paciente;
 - (b) determinar cualquier diferencia en la medición del citado parámetro, en la muestra de tejido, al compararse con la medición del citado parámetro en (una) muestra(s) de tejido comparable(s), obtenida(s) de uno o más pacientes que no tienen el citado estado inflamatorio.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de:
 - (c) diagnosticar al paciente, como teniendo el citado estado de enfermedad inflamatorio, cuando la citada medición del citado parámetro, con respecto al tejido del paciente, es significativamente superior que la citada muestra de tejido obtenida del (de los) citado(s) un o más paciente(s) que no tienen el citado estado de enfermedad inflamatoria.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en donde, la citada medición del citado parámetro, con respecto al tejido del paciente, se juzga como siendo significativamente superior que la citada medición del citado parámetro, en la(s) citada(s) muestra(s) de tejido comparable(s), cuando las mediciones, difieren en más de un porcentaje de aproximadamente un 50%.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en donde, la citada medición del citado parámetro, con respecto al tejido del paciente, se juzga como siendo significativamente superior que la citada medición del citado parámetro, en la(s) citada(s) muestra(s) de tejido comparable(s), cuando las mediciones, difieren en más de un porcentaje de aproximadamente un 100%.
5. El procedimiento de la reivindicación 2, en donde, la citada medición del citado parámetro, con respecto al tejido del paciente, se juzga como siendo significativamente superior que la citada medición del citado parámetro, en la(s) citada(s) muestra(s) de tejido comparable(s), cuando las mediciones, difieren en más de un porcentaje de aproximadamente un 200%.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde, el parámetro medido, es actividad quinasa de Pim-2.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde, el procedimiento, comprende la hibridación *in situ* de por lo menos una sonda de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos de por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en donde, las secuencia polinucleótida de la citada sonda de ácidos nucleicos que se deriva, incluye los nucleótidos 294 a 311 de la SEQ ID NO:1.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde, el estado de enfermedad inflamatoria, consiste en un páncreas inflamado, unas amígdalas inflamadas, un segmento del intestino inflamado, un revestimiento del estómago inflamado, o unas tiroides inflamadas.
10. Un procedimiento para detectar estados de enfermedades inflamatorias, que comprende la etapas de: a) recolectar una muestra sospechosa, y (b) someter la muestra sospechosa, a un test de ensayo de diagnóstico, empleando la secuencia nucleótida de la SEQ ID NO: 1, ó fragmentos de ésta, comprendiendo, el citado test de ensayo de diagnóstico, una reacción en cadena de la polimerasa o una hibridación de ácidos nucleicos.
11. Un procedimiento para detectar estados de enfermedades inflamatorias, que comprende las etapas de: recolectar una muestra sospechosa, y someter la muestra a un test de ensayo de diagnóstico, que comprende antisuero policlonal y/o anticuerpo monoclonal, que dan lugar a inmunógenos que comprenden la secuencia polinucleótida de la SEQ ID NO: 2, o un fragmento inmunogénico de ésta, comprendiendo, el citado test de ensayo de diagnóstico, el análisis de transferencia de Western o el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).
12. Un procedimiento para detectar estados de enfermedades inflamatorias, que comprende las etapas de: (a) recolectar una muestra sospechosa, y someter la muestra a un test de ensayo de diagnóstico, que comprende antisuero policlonal y/o anticuerpo monoclonal, que dan lugar a inmunógenos que comprenden la secuencia polinucleótida de la SEQ ID NO: 2, ó un fragmento inmunogénico de ésta, (b) detectar el citado antisuero policlonal y/o anticuerpo monoclonal.
13. Un ensayo de rastreo, para determinar si un compuesto sería efectivo en el tratamiento de un estado de enfermedad inflamatoria, que comprende:
 - (1) incubar el compuesto, *in vitro*, con células la SEQ ID NO:2, o una variante de ésta, en la exposición a LPS;

(2) determinar la extensión de la inhibición causada por el citado compuesto, en la expresión de la SEQ ID NO:2, o variante de ésta, mediante la medición de un parámetro indicativo del nivel de SEQ ID NO:2 (o variante de ésta), o m-RNA traducido a la SEQ ID NO:2 (o variante de ésta).

14. Un ensayo de rastreo, para determinar si un compuesto sería efectivo en el tratamiento de un estado de enfermedad inflamatoria, que comprende:

(1) incubar *in vitro* el compuesto, con una proteína que comprende la SEQ ID NO:2, o variante de ésta, que tenga actividad quinasa, y un sustrato, con respecto a la citada actividad quinasa;

(2) determinar si el compuesto inhibe la citada actividad quinasa de la proteína, con respecto al citado sustrato.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en donde, la citada proteína, es de origen recombinante o de origen natural.

16. Un ensayo de rastreo, para determinar compuestos candidatos para el mejoramiento de los estados de enfermedades inflamatorias, que comprende las etapas de:

(a) cultivar separadamente una primera línea de células inmortalizada, que contiene por lo menos un gen de la SEQ ID NO:1, o una variante de ésta, y una segunda línea de células inmortalizada, en donde, el gen de la SEQ ID NO:1, o variante de ésta, se inactiva;

(b) someter ambas líneas de células, a un compuesto sospechoso de tener actividad en el mejoramiento del estado de enfermedad inflamatoria; y

(c) determinar si, el citado compuesto, inhibe selectivamente el crecimiento de la citada primera línea inmortalizada de células.

17. Un ensayo de rastreo, para identificar compuestos que pueden tener un uso en la mejora de estados de enfermedades inflamatorias, debido a la modulación o alteración de actividad Pim-2, que comprende las etapas de:

(a) establecer un sistema de control que comprende Pim-2 y un sustrato de Pim-2;

(b) establecer un sistema de test de ensayo, que comprende Pim-2, el citado sustrato de Pim-2, y el compuesto candidato;

(c) medir la actividad de Pim-2, en los sistemas de control y de test de ensayo; y

(d) determinar que, el compuesto candidato, modula o altera la actividad Pim-2, si la actividad del Pim-2, en el sistema de test de ensayo, es inferior o mayor que la actividad medida para el sistema de control.

18. Un procedimiento para el rastreo de compuestos para su uso en el tratamiento de estados de enfermedades inflamatorias, que comprende las etapas de: (a) contactar un compuesto con una célula cultivada que expresa el gen Pim-2, y (b) detectar un cambio en la expresión del gen Pim-2, ó actividad quinasa de Pim-2, en la célula cultivada.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, que comprende adicionalmente la etapa de:

(c) determinar que un compuesto rastreado, es de utilidad en el tratamiento de estados de enfermedades inflamatorias, cuando la expresión del gen Pim-2, o actividad quinasa del Pim-2, en la célula cultivada, disminuye de una forma significativa mediante el citado compuesto rastreado.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en donde, se determina una disminución significativa en la etapa (c), cuando, la expresión del gen Pim-2, ó la actividad quinasa del Pim-2, en las células cultivadas, se reduce en un porcentaje de más de aproximadamente un 50%, mediante el compuesto rastreado.

21. El procedimiento de la reivindicación 19, en donde, se determina una disminución significativa en la etapa (c), cuando, la expresión del gen Pim-2, ó la actividad quinasa del Pim-2, en las células cultivadas, se reduce en un porcentaje de más de aproximadamente un 100%, mediante el compuesto rastreado.

22. El procedimiento de la reivindicación 19, en donde, se determina una disminución significativa en la etapa (c), cuando, la expresión del gen Pim-2, ó la actividad quinasa del Pim-2, en las células cultivadas, se reduce en un porcentaje de más de aproximadamente un 200%, mediante el compuesto rastreado.

23. Un procedimiento para rastrear compuestos para la actividad en el tratamiento de estados de enfermedades inflamatorias, que comprende la etapa de medir la afinidad de los compuestos para Pim-2 *in vitro*.

24. Uso de un compuesto antisentido objetivizado a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al Pim-2, para preparar un medicamento para el tratamiento de un animal que tenga una enfermedad inflamatoria.

ES 2 307 769 T3

25. Uso de un oligonucleótido el cual hibrida específicamente a un transcritto que codifica al Pim 2, y suprime la expresión del Pim-2 humano, para preparar un medicamento para tratar un estado de enfermedad inflamatoria.

5 26. Uso de un constructor antisentido que objetiviza, como diana, secuencias que codifican al Pim-2, para preparar un medicamento para el tratamiento de un estado de enfermedad inflamatoria, en un paciente.

27. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual, el estado de enfermedad inflamatoria, es una enfermedad inflamatoria del intestino.

10 28. El procedimiento de la reivindicación 27, en donde, la enfermedad inflamatoria del intestino a ser diagnosticada, es la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa.

15 29. El procedimiento de las reivindicaciones 10 a 12, en el cual, el estado de enfermedad inflamatoria, es una enfermedad inflamatoria del intestino.

30. El ensayo de rastreo de las reivindicaciones 13 a 15, en el cual, el estado de enfermedad inflamatoria, es una enfermedad inflamatoria del intestino.

20 31. El ensayo de rastreo de las reivindicaciones 16 a 17, en el cual, el estado de enfermedad inflamatoria, es una enfermedad inflamatoria del intestino.

32. El procedimiento de las reivindicaciones 18 a 22, en el cual, los estados de enfermedades inflamatorias, son enfermedades inflamatorias del intestino.

25 33. Un procedimiento para rastrear compuestos, para la actividad en el tratamiento de estados de enfermedades inflamatorias, que comprende medir la afinidad de los compuestos para Pim-2 *in vitro*.

30 34. Uso de un anticuerpo reactivo con el polipéptido de la SEQ ID NO:2, para preparar un medicamento para tratar un individuo que tiene una enfermedad inflamatoria del intestino.

35 35. El procedimiento de las reivindicaciones 24 a 26, en el cual, la enfermedad inflamatoria, es una enfermedad inflamatoria del intestino.

40

45

50

55

60

65

70

Figura 1

Tejido	Cambio del factor mul- tiplicador	Dirección	Valor de p
Cérvix inflamado(6)_ vs_ cérvix normal (103)	2,04	hacia arriba	0,07087
Pulmón con enfisema (12)_ vs_ pulmón normal (64)	1,31	hacia arriba	0,17909
Colon con enfermedad de Crohn (6) _vs_ colon normal (139)	2,2	hacia arriba	0,03205
Colon con colitis ulcerativa (7) _vs_ colon normal (139)	2,44	hacia arriba	0,02286
Riñón inflamado (10) _vs_ riñón normal (67)	3,26	hacia arriba	0,00133
Hígado inflamado (7) _vs_ hígado normal (35)	1,78	hacia arriba	0,01825
Pulmón inflamado (8) _vs_ pulmón normal (96)	2,2	hacia arriba	0,00503
Páncreas inflamado (3) _vs_ páncreas normal (18)	2,67	hacia arriba	0,21582
Recto inflamado (3) _vs_ recto normal (46)	3,76	hacia arriba	0,0681
Piel inflamada (2) _vs_ piel normal (60)	2,22	hacia arriba	0,55042

Figura 1 (continuación)

Tejido	Cambio del factor multiplicador	Dirección	Valor de p
Estómago inflamado (18)_ vs_ estómago normal (44)	1,57	hacia arriba	0,11758
Glándula tiroides inflamada (9)_ vs_ glándula tiroides normal (17)	3,99	hacia arriba	0,02235

Figura 2

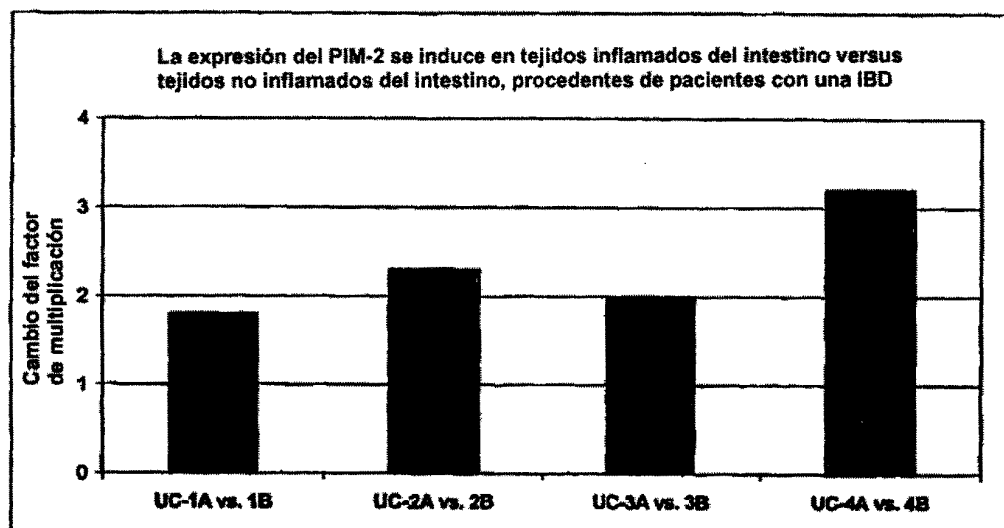


FIGURA 3

	THP-1 + 6h de estimulación con LPS / THP-1 no estimuladas		
Genes	Cambio del factor de multiplicación (exp 1)	Cambio del factor de multiplicación (exp 2)	Cambio del factor de multiplicación (exp 3)
Pim-2	8,4	18,6	8,8

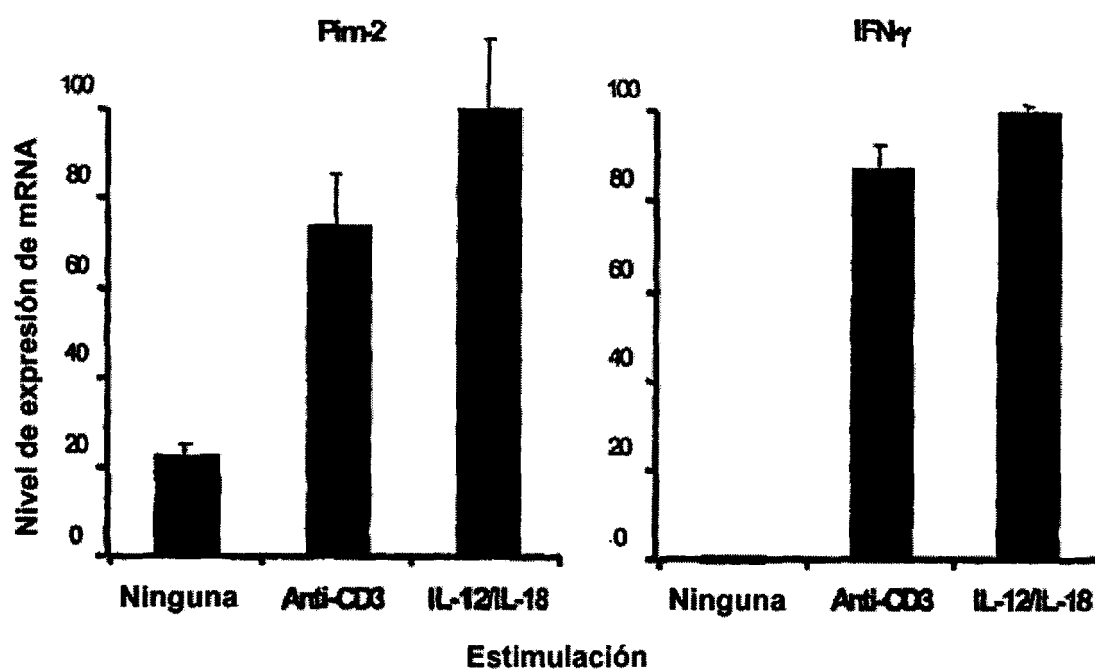
FIGURA 4

FIGURA 5

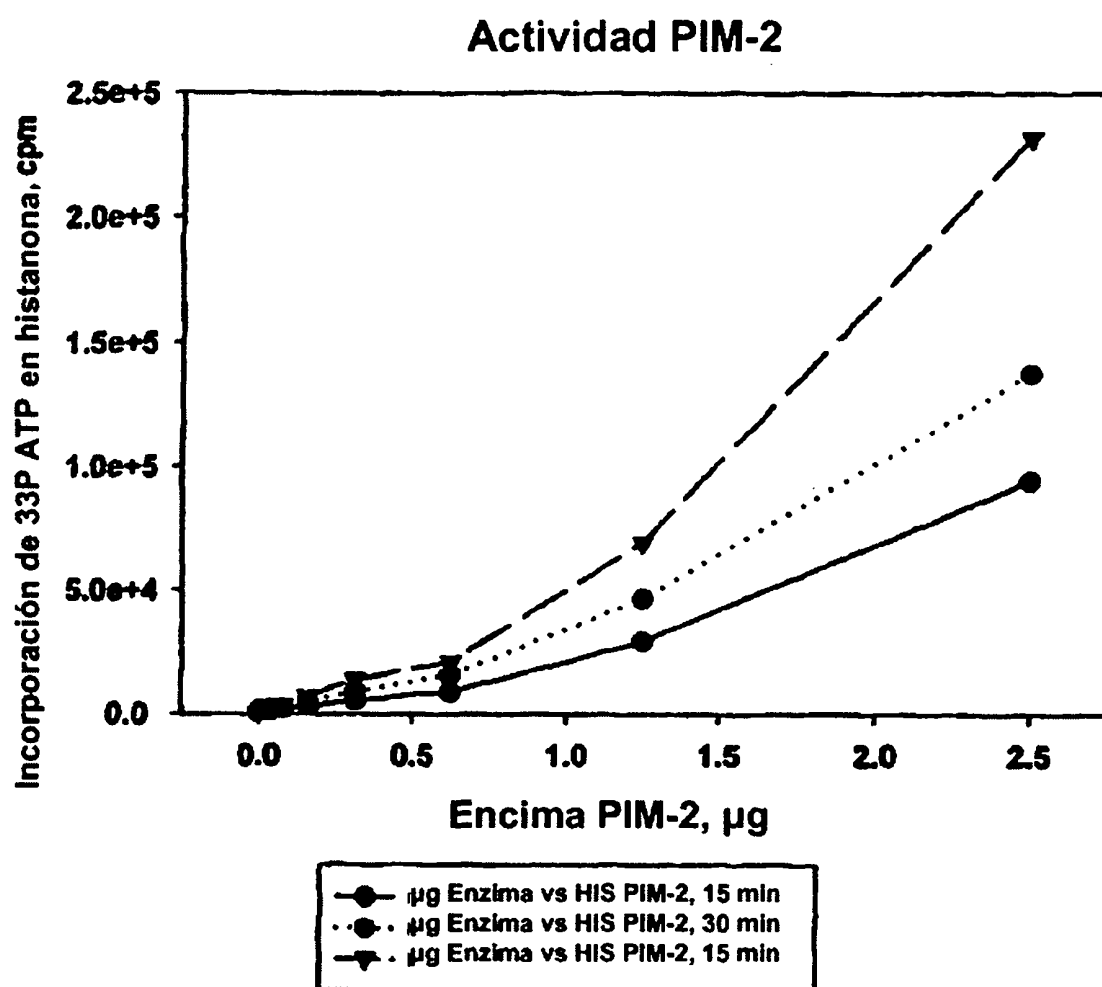
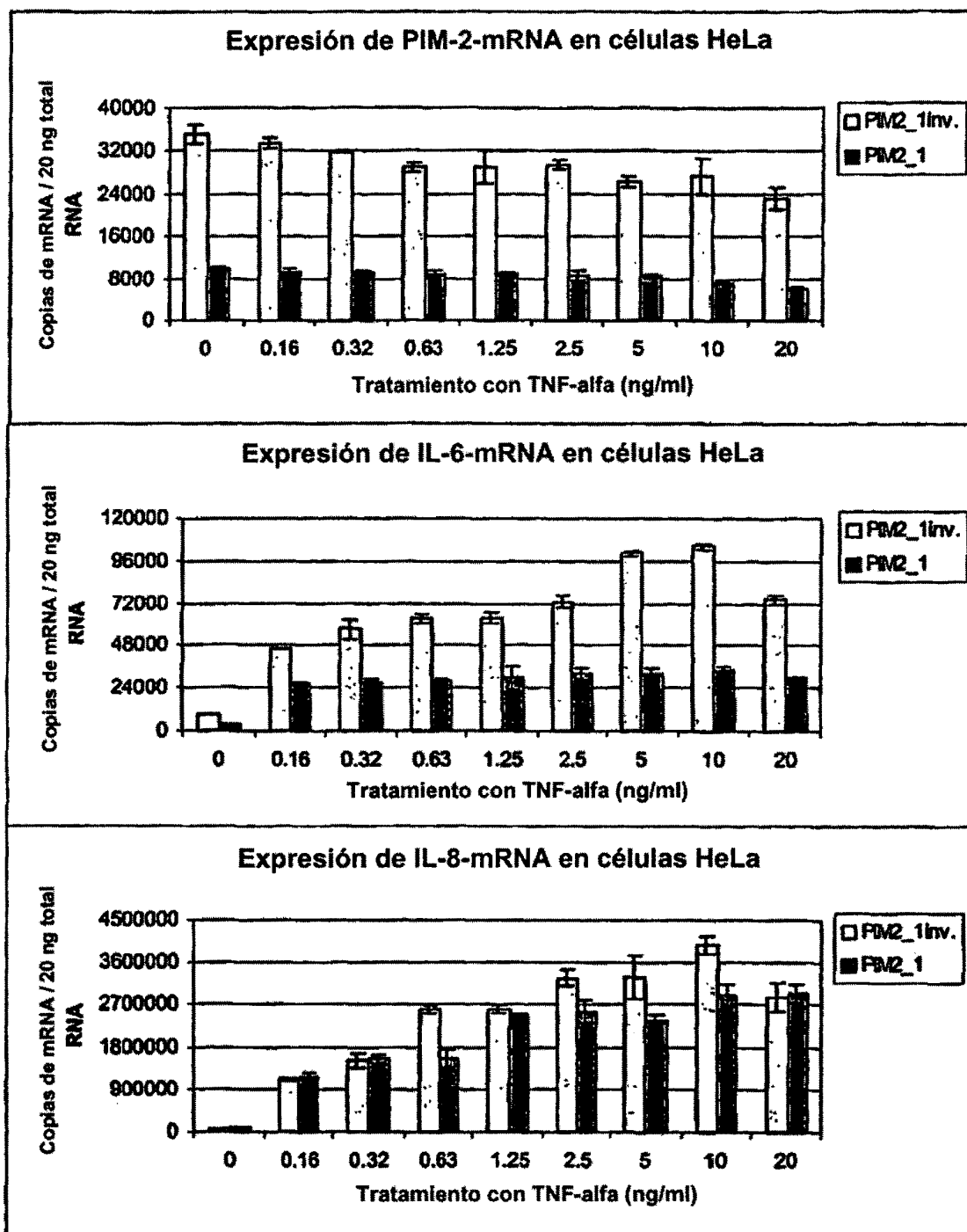


FIGURA 6



ES 2 307 769 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.

<120> Procedimientos y compuestos para la diagnosis de enfermedades inflamatorias e identificación de agentes farmacológicos utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias

<130> 9/206-217

<140> A determinar

<141> 2002-05-23

<150> US 60/292.968

<151> 2001-05-23

<160> 7

<170> PatentIn, version 3.1

<210> 1

<211> 1535

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (185)..(1117)

<223>

<400> 1

```

ggacgcgtgg gcgcgcgcgg cgaatctcaa cgctgcgccg tctgcgggcg cttccggggcc 60
accagttttct ctgctttcca ccttggegcc cccagccct ggctccccag ctgcgctgcc 120
ccgggcgtcc acgccctgcg ggcttagcgg gttcagtggg ctcaatctgc gcagcgccac 180
ctcc atg ttg acc aag cct cta cag ggg cct ccc gcg ccc ccc ggg acc 229
Met Leu Thr Lys Pro Leu Gln Gly Pro Pro Ala Pro Pro Gly Thr
1 5 10 15
ccc acg ccg ccg cca gga ggc aag gat cgg gaa gcg ttc gag gcc gag 277
Pro Thr Pro Pro Pro Gly Gly Lys Asp Arg Glu Ala Phe Glu Ala Glu
20 25 30
tat cga ctc ggc ccc ctc ctg ggt aag ggg ggc ttt ggc acc gtc ttc 325
Tyr Arg Leu Gly Pro Leu Leu Gly Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Phe
35 40 45
gca gga cac cgc ctc aca gat cga ctc cag gtg gcc atc aaa gtg att 373
Ala Gly His Arg Leu Thr Asp Arg Leu Gln Val Ala Ile Lys Val Ile
50 55 60
ccc cgg aat cgt gtg ctg ggc tgg tcc ccc ttg tca gac tca gtc aca 421
Pro Arg Asn Arg Val Leu Gly Trp Ser Pro Leu Ser Asp Ser Val Thr
65 70 75
tgc cca ctc gaa gtc gca ctg cta tgg aaa gtg ggt gca ggt ggt ggg 469
Cys Pro Leu Glu Val Ala Leu Leu Trp Lys Val Gly Ala Gly Gly Gly

```

ES 2 307 769 T3

	80		85		90		95	
5	cac cct ggc gtg atc cgc ctg ctt gac tgg ttt gag aca cag gag ggc							517
	His Pro Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Thr Gln Glu Gly							
			100		105		110	
10	ttc atg ctg gtc ctc gag cgg cct ttg ccc gcc cag gat ctc ttt gac							565
	Phe Met Leu Val Leu Glu Arg Pro Leu Pro Ala Gln Asp Leu Phe Asp							
			115		120		125	
15	tat atc aca gag aag ggc cca ctg ggt gaa ggc cca agc cgc tgc ttc							613
	Tyr Ile Thr Glu Lys Gly Pro Leu Gly Glu Gly Pro Ser Arg Cys Phe							
			130		135		140	
20	ttt ggc caa gta gtg gca gcc atc cag cac tgc cat tcc cgt gga gtt							661
	Phe Gly Gln Val Val Ala Ala Ile Gln His Cys His Ser Arg Gly Val							
			145		150		155	
25	gtc cat cgt gac atc aag gat gag aac atc ctg ata gac cta cgc cgt							709
	Val His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Arg Arg							
			160		165		170	
30	ggc tgt gcc aaa ctc att gat ttt ggt tct ggt gcc ctg ctt cat gat							757
	Gly Cys Ala Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu His Asp							
			180		185		190	
35	gaa ccc tac act gac ttt gat ggg aca agg gtg tac agc ccc cca gag							805
	Glu Pro Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu							
			195		200		205	
40	tgg atc tct cga cac cag tac cat gca ctc ccg gcc act gtc tgg tca							853
	Trp Ile Ser Arg His Gln Tyr His Ala Leu Pro Ala Thr Val Trp Ser							
			210		215		220	
45	ctg ggc atc ctc ctc tat gac atg gtg tgt ggg gac att ccc ttt gag							901
	Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu							
			225		230		235	
50	agg gac cag gag att ctg gaa gct gag ctc cac ttc cca gcc cat gtc							949
	Arg Asp Gln Glu Ile Leu Glu Ala Glu Leu His Phe Pro Ala His Val							
			240		245		250	
55	tcc cca gac tgc tgt gcc cta atc cgc cgg tgc ctg gcc ccc aaa cct							997
	Ser Pro Asp Cys Cys Ala Leu Ile Arg Arg Cys Leu Ala Pro Lys Pro							
			260		265		270	
60	tct tcc cga ccc tca ctg gaa gag atc ctg ctg gac ccc tgg atg caa							1045
	Ser Ser Arg Pro Ser Leu Glu Glu Ile Leu Leu Asp Pro Trp Met Gln							
			275		280		285	
65	aca cca gcc gag gat gta ccc ctc aac ccc tcc aaa gga ggc cct gcc							1093
	Thr Pro Ala Glu Asp Val Pro Leu Asn Pro Ser Lys Gly Gly Pro Ala							
			290		295		300	
70	cct ttg gcc tgg tcc ttg cta ccc taagcctggc ctggcctggc ctggccccc							1147
	Pro Leu Ala Trp Ser Leu Leu Pro							
			305		310			
75	atggtcagaa gagccatccc atggccatgt cacagggata gatggacatt tgttgacttg							1207

ES 2 307 769 T3

gttttacagg tcattaccag tcattaaagt ccagtattac taaggtaagg gattgaggat 1267
 cagggggttag aagacataaa ccaagtctgc ccagttccct tcccaatcct acaaaggagc 1327
 5 cttcctccca gaacctgtgg tccctgattc tggaggggga acttcttgct tctcattttg 1387
 ctaaggaagt ttattttggt gaagttgttc ccattctgag ccccgggact cttattctga 1447
 10 tgatgtgtca cccacattg gcacctccta ctaccaccac acaaacttag ttcatatgct 1507
 cttacttggg caaggggtgct ttccttcc 1535

<210> 2

<211> 311

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Leu Thr Lys Pro Leu Gln Gly Pro Pro Ala Pro Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Pro Pro Pro Gly Gly Lys Asp Arg Glu Ala Phe Glu Ala Glu Tyr
 20 25 30

Arg Leu Gly Pro Leu Leu Gly Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Phe Ala
 35 40 45

Gly His Arg Leu Thr Asp Arg Leu Gln Val Ala Ile Lys Val Ile Pro
 50 55 60

Arg Asn Arg Val Leu Gly Trp Ser Pro Leu Ser Asp Ser Val Thr Cys
 65 70 75 80

Pro Leu Glu Val Ala Leu Leu Trp Lys Val Gly Ala Gly Gly Gly His
 85 90 95

Pro Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Thr Gln Glu Gly Phe
 100 105 110

Met Leu Val Leu Glu Arg Pro Leu Pro Ala Gln Asp Leu Phe Asp Tyr
 115 120 125

Ile Thr Glu Lys Gly Pro Leu Gly Glu Gly Pro Ser Arg Cys Phe Phe
 130 135 140

Gly Gln Val Val Ala Ala Ile Gln His Cys His Ser Arg Gly Val Val
 145 150 155 160

ES 2 307 769 T3

His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Arg Arg Gl
 165 170 175
 5 Cys Ala Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu His Asp Gl
 180 185 190
 10 Pro Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Tr
 195 200 205
 15 Ile Ser Arg His Gln Tyr His Ala Leu Pro Ala Thr Val Trp Ser Le
 210 215 220
 20 Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu Ar
 225 230 235 24
 25 Asp Gln Glu Ile Leu Glu Ala Glu Leu His Phe Pro Ala His Val Se
 245 250 255
 30 Pro Asp Cys Cys Ala Leu Ile Arg Arg Cys Leu Ala Pro Lys Pro Se
 260 265 270
 35 Ser Arg Pro Ser Leu Glu Glu Ile Leu Leu Asp Pro Trp Met Gln Th
 275 280 285
 40 Pro Ala Glu Asp Val Pro Leu Asn Pro Ser Lys Gly Gly Pro Ala Pr
 290 295 300
 45 Leu Ala Trp Ser Leu Leu Pro
 305 310
 <210> 3
 <211> 2088
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 50 <220>
 <221> CDS
 <222> (186)..(1187)
 55 <223>
 <300>
 <301> Baytel, D. *et al.*
 60 <302> El proto-oncogén humano Pim-2 y su expresión testicular
 <303> Biochim. Biophys. Acta
 <304> 2
 <305> 1442
 65 <306> 274-285
 <307> 1998

ES 2 307 769 T3

<308> NM_006875

<309> 2000-11-02

<313> (1)..(2088)

5

<400> 3

	gaattcgggca cgagcgcgcg gcgaattctca acgctgcgcc gtctgcgggc gcttcggggc	60
10	caccagtttc tctgctttcc accctggcgc cccccagccc tggctcccca gctgcgctgc	120
	cccgggcgtc cagccctgc gggcttagcg ggttcagtg gctcaatctg cgcagcgcca	180
15	cctcc atg ttg acc aag cct cta cag ggg cct ccc gcg ccc ccc ggg acc	230
	Met Leu Thr Lys Pro Leu Gln Gly Pro Pro Ala Pro Pro Gly Thr	
	1 5 10 15	
	ccc acg ccg ccg cca gga ggc aag gat cgg gaa gcg ttc gag gcc gag	278
20	Pro Thr Pro Pro Pro Gly Gly Lys Asp Arg Glu Ala Phe Glu Ala Glu	
	20 25 30	
	tat cga ctc ggc ccc ctc ctg ggt aag ggg ggc ttt ggc acc gtc ttc	326
25	Tyr Arg Leu Gly Pro Leu Leu Gly Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Phe	
	35 40 45	
	gca gga cac cgc ctc aca gat cga ctc cag gtg gcc atc aaa gtg att	374
30	Ala Gly His Arg Leu Thr Asp Arg Leu Gln Val Ala Ile Lys Val Ile	
	50 55 60	
	ccc cgg aat cgt gtg ctg ggc tgg tcc ccc ttg tca gac tca gtc aca	422
	Pro Arg Asn Arg Val Leu Gly Trp Ser Pro Leu Ser Asp Ser Val Thr	
	65 70 75	
35	tgc cca ctc gaa gtc gca ctg cta tgg aaa gtg ggt gca ggt ggt ggg	470
	Cys Pro Leu Glu Val Ala Leu Leu Trp Lys Val Gly Ala Gly Gly Gly	
	80 85 90 95	
	cac cct ggc gtg atc cgc ctg ctt gac tgg ttt gag aca cag gaa ggc	518
40	His Pro Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Thr Gln Glu Gly	
	100 105 110	
	ttc atg ctg gtc ctc gag cgg cct ttg ccc gcc cag gat ctc ttt gac	566
45	Phe Met Leu Val Leu Glu Arg Pro Leu Pro Ala Gln Asp Leu Phe Asp	
	115 120 125	
	tat atc aca gag aag ggc cca ctg ggt gaa ggc cca agc cgc tgc ttc	614
	Tyr Ile Thr Glu Lys Gly Pro Leu Gly Glu Gly Pro Ser Arg Cys Phe	
	130 135 140	
50	ttt ggc caa gta gtg gca gcc atc cag cac tgc cat tcc cgt gga gtt	662
	Phe Gly Gln Val Val Ala Ala Ile Gln His Cys His Ser Arg Gly Val	
	145 150 155	
55	gtc cat cgt gac atc aag gat gag aac atc ctg ata gac cta cgc cgt	710
	Val His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Arg Arg	
	160 165 170 175	
	ggc tgt gcc aaa ctc att gat ttt ggt tct ggt gcc ctg ctt cat gat	758
60	Gly Cys Ala Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu His Asp	
	180 185 190	
	gaa ccc tac act gac ttt gat ggg aca agg gtg tac agc ccc cca gag	806
65	Glu Pro Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu	
	195 200 205	

ES 2 307 769 T3

	tgg atc tct cga cac cag tac cat gca ctc ccg gcc act gtc tgg tca	854
	Trp Ile Ser Arg His Gln Tyr His Ala Leu Pro Ala Thr Val Trp Ser	
	210 215 220	
5	ctg ggc atc ctc ctc tat gac atg gtg tgt ggg gac att ccc ttt gag	902
	Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu	
	225 230 235	
10	agg gac cag gag att ctg gaa gct gag ctc cac ttc cca gcc cat gtc	950
	Arg Asp Gln Glu Ile Leu Glu Ala Glu Leu His Phe Pro Ala His Val	
	240 245 250 255	
15	tcc cca gac tgc tgt gcc cta atc cgc cgg tgc ctg gcc ccc aaa cct	998
	Ser Pro Asp Cys Cys Ala Leu Ile Arg Arg Cys Leu Ala Pro Lys Pro	
	260 265 270	
20	tct tcc cga ccc tca ctg gaa gag atc ctg ctg gac ccc tgg atg caa	1046
	Ser Ser Arg Pro Ser Leu Glu Glu Ile Leu Leu Asp Pro Trp Met Gln	
	275 280 285	
25	aca cca gcc gag gat gtt acc cct caa ccc ctc caa agg agg ccc tgc	1094
	Thr Pro Ala Glu Asp Val Thr Pro Gln Pro Leu Gln Arg Arg Pro Cys	
	290 295 300	
30	ccc ttt ggc ctg gtc ctt gct acc cta agc ctg gcc tgg cct ggc ctg	1142
	Pro Phe Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Ser Leu Ala Trp Pro Gly Leu	
	305 310 315	
35	gcc ccc aat ggt cag aag agc cat ccc atg gcc atg tca cag gga	1187
	Ala Pro Asn Gly Gln Lys Ser His Pro Met Ala Met Ser Gln Gly	
	320 325 330	
40	tagatggaca tttgttgact tggttttaca ggtcattacc agtcattaaa gtccagtatt	1247
	actaaggtaa gggattgagg atcaggggtt agaagacata aaccaagttt gccagttcc	1307
45	cttcccaatc ctacaaagga gccttcctcc cagaacctgt ggccctgat tttggagggg	1367
	gaacttcttg cttctcattt tgctaaggaa gtttattttg gtgaagttgt tcccattttg	1427
	agccccggga ctcttatttt gatgatgtgt caccacacat tggcacctcc tactaccacc	1487
50	acacaaactt agttcatatg cttttacttg ggcaagggtg ctttccttcc aataccccag	1547
	tagcttttat tttagtaaag ggacccttcc ccctagccta gggccccata ttgggtcaag	1607
	ctgcttacct gcctcagccc aggatttttt attttggggg aggtaatgcc ctgtttgttac	1667
	cccaaggctt cttttttttt tttttttttt ttgggtgagg ggaccctact ttgttatccc	1727
55	aagtgtctctt attctggtga gaagaacctt aattccataa tttgggaagg aatggaagat	1787
	ggacaccacc ggacaccacc agacaatagg atgggatgga tggttttttg ggggatgggc	1847
	taggggaaat aaggcttgct gtttgttttc ctggggcgct ccctccaatt ttgcagattt	1907
60	ttgcaacctc ctctgagcc gggattgtcc aattactaaa atgtaaataa tcacgtattg	1967
	tggggagggg agttccaagt gtgccctcct ttttttccct gcctggatta tttaaaaagc	2027
65	catgtgtgga aaccactat ttaataaaag taatagaatc agaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2087
	a	2088

ES 2 307 769 T3

<210> 4

<211> 334

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

10  Met Leu Thr Lys Pro Leu Gln Gly Pro Pro Ala Pro Pro Gly Thr Pro
    1          5          10          15

15  Thr Pro Pro Pro Gly Gly Lys Asp Arg Glu Ala Phe Glu Ala Glu Tyr
    20          25          30

20  Arg Leu Gly Pro Leu Leu Gly Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Phe Ala
    35          40          45

25  Gly His Arg Leu Thr Asp Arg Leu Gln Val Ala Ile Lys Val Ile Pro
    50          55          60

30  Arg Asn Arg Val Leu Gly Trp Ser Pro Leu Ser Asp Ser Val Thr Cys
    65          70          75          80

35  Pro Leu Glu Val Ala Leu Leu Trp Lys Val Gly Ala Gly Gly Gly His
    85          90          95

40  Pro Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Thr Gln Glu Gly Phe
    100          105          110

45  Met Leu Val Leu Glu Arg Pro Leu Pro Ala Gln Asp Leu Phe Asp Tyr
    115          120          125

50  Ile Thr Glu Lys Gly Pro Leu Gly Glu Gly Pro Ser Arg Cys Phe Phe
    130          135          140

55  Gly Gln Val Val Ala Ala Ile Gln His Cys His Ser Arg Gly Val Val
    145          150          155          160

60  His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Arg Arg Gly
    165          170          175

65  Cys Ala Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu His Asp Glu
    180          185          190

```

ES 2 307 769 T3

Pro Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp
 195 200 205

5 Ile Ser Arg His Gln Tyr His Ala Leu Pro Ala Thr Val Trp Ser Leu
 210 215 220

10 Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu Arg
 225 230 235 240

15 Asp Gln Glu Ile Leu Glu Ala Glu Leu His Phe Pro Ala His Val Ser
 245 250 255

20 Pro Asp Cys Cys Ala Leu Ile Arg Arg Cys Leu Ala Pro Lys Pro Ser
 260 265 270

25 Ser Arg Pro Ser Leu Glu Glu Ile Leu Leu Asp Pro Trp Met Gln Thr
 275 280 285

30 Pro Ala Glu Asp Val Thr Pro Gln Pro Leu Gln Arg Arg Pro Cys Pro
 290 295 300

35 Phe Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Ser Leu Ala Trp Pro Gly Leu Ala
 305 310 315 320

35 Pro Asn Gly Gln Lys Ser His Pro Met Ala Met Ser Gln Gly
 325 330

<210> 5
 40 <211> 311
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 45 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(311)
 <223>
 50 <300>
 <308> AB042425
 <309> 2000-05-11
 55 <313> (1)..(311)
 <400> 5

60 Met Leu Thr Lys Pro Leu Gln Gly Pro Pro Ala Pro Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

65 Thr Pro Pro Pro Gly Gly Lys Asp Arg Glu Ala Phe Glu Ala Glu Tyr
 20 25 30

ES 2 307 769 T3

Arg Leu Gly Pro Leu Leu Gly Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Phe Ala
 35 40 45
 5
 Gly His Arg Leu Thr Asp Arg Leu Gln Val Ala Ile Lys Val Ile Pro
 50 55 60
 10
 Arg Asn Arg Val Leu Gly Trp Ser Pro Leu Ser Asp Ser Val Thr Cys
 65 70 75 80
 15
 Pro Leu Glu Val Ala Leu Leu Trp Lys Val Gly Ala Gly Gly Gly His
 85 90 95
 20
 Pro Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Thr Gln Glu Gly Phe
 100 105 110
 25
 Met Leu Val Leu Glu Arg Pro Leu Pro Ala Gln Asp Leu Phe Asp Tyr
 115 120 125
 30
 Ile Thr Glu Lys Gly Pro Leu Gly Glu Gly Pro Ser Arg Cys Phe Phe
 130 135 140
 35
 Gly Gln Val Val Ala Ala Ile Gln His Cys His Ser Arg Gly Val Val
 145 150 155 160
 40
 His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Arg Arg Gly
 165 170 175
 45
 Cys Ala Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu His Asp Glu
 180 185 190
 50
 Pro Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp
 195 200 205
 55
 Ile Ser Arg His Gln Tyr His Ala Leu Pro Ala Thr Val Trp Ser Leu
 210 215 220
 60
 Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu Arg
 225 230 235 240
 65
 Asp Gln Glu Ile Leu Glu Ala Glu Leu His Phe Pro Ala His Val Ser
 245 250 255
 Pro Asp Cys Cys Ala Leu Ile Arg Arg Cys Leu Ala Pro Lys Pro Ser
 260 265 270

ES 2 307 769 T3

Ser Arg Pro Ser Leu Glu Glu Ile Leu Leu Asp Pro Trp Met Gln Thr
275 280 285

Pro Ala Glu Asp Val Pro Leu Asn Pro Ser Lys Gly Gly Pro Ala Pro
290 295 300

Leu Ala Trp Ser Leu Leu Pro
305 310

<210> 6

<211> 2055

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<300>

<308> XM_010208

<309> 2001-04-17

<313> (1)..(2055)

<400> 6

30	gcgcgcggcg aatctcaacg ctgcgccgtc tgcgggcgct tccgggccac cagtttctct	60
	gctttccacc ctggcgcccc ccagccctgg ctccccagct gcgctgcccc gggcgctccac	120
	gccctgcggg cttagcgggt tcagtgggt caatctgcgc agcgccaect ccatgttgac	180
35	caagcctcta caggggcctc ccgcgcccc cggaaccccc acgcccgcgc caggaggcaa	240
	ggatcgggaa gcgttcgagg ccgagtatcg actcggcccc ctcttgggta aggggggctt	300
40	tggcaccgtc ttgcaggac accgcctcac agatcgactc caggtggcca tcaaagtgat	360
	tccccggaat cgtgtgctgg gctgggtccc ctgttcagac tcagtcacat gccactcga	420
	agtcgcactg ctatggaaag tgggtgcagg tgggtggcac cctggcgtga tccgcctgct	480
45	tgactggttt gagacacagg agggcttcat gctggtcctc gagcggcctt tgcccgccca	540
	ggatctcttt gactatatca cagagaaggg cccactgggt gaaggcccaa gccgctgctt	600
50	ctttggccaa gtagtggcag ccatccagca ctgccattcc cgtggagttg tccatcgtga	660
	catcaaggat gagaacatcc tgatagacct acgcctggc tgtgccaaac tcattgattt	720
	tggttcttgt gccctgcttc atgatgaacc ctacactgac tttgatggga caaggggtga	780
55	cagcccccca gagtggatct ctgcacacca gtaccatgca ctcccggcca ctgtctggtc	840
	actgggcata ctctctatg acatgggtgtg tggggacatt ccctttgaga gggaccagga	900
60	gattctggaa gctgagctcc acttcccagc ccatgtctcc ccagaactgct gtgccctaata	960
	ccgccggtgc ctggcccca aaccttcttc ccgacctca ctggaagaga tcctgctgga	1020
65	cccctggatg caaacaccag ccgaggatgt accctcaaac ccctocaaag gagggcctgc	1080

ES 2 307 769 T3

5 ccccttggcc tggtccttgc taccctaagc ctggcctggc ctggcctggc cccaatggt 1140
 cagaagagcc atcccatggc catgtcacag ggatagatgg acatttggtg acttggtttt 1200
 acaggtcatt accagtcatt aaagtccagt attactaagg taagggattg aggatcaggg 1260
 gttagaagac ataaaccaag tctgccagc tcccttccca atcctacaaa ggagccttcc 1320
 10 tcccagaacc tgtggtcctt gattctggag ggggaacttc ttgcttctca ttttgctaag 1380
 gaagtttatt ttggtgaagt tgttcccat ctgagccccg ggactcttat tctgatgatg 1440
 tgtcacccca cattggcacc tcctactacc accacacaaa cttagtcat atgctcttac 1500
 15 ttgggcaagg gtgctttcct tccaataccc cagtagcttt tatttttagta aagggaccct 1560
 tccccctagc ctagggctcc atattgggtc aagctgctta cctgcctcag cccaggattc 1620
 20 tttattctgg gggaggtaat gccctgttgt taccccaagg cttctttttt tttttttttt 1680
 ttttgggtga ggggacccta ctctgttatc ccaagtgtc ttattctggt gagaagaacc 1740
 ttacttccat aatttgggaa ggaatggaag atggacacca ccggacacca ccagacacta 1800
 25 ggatgggatg gatgggtttt tgggggatgg gctaggggaa ataaggcttg ctgtttgttc 1860
 tcctggggcg ctccctccaa cttttgcaga ttcttgcaac ctctcctga gccgggattg 1920
 30 tccaattact aaaatgtaaa taatcacgta ttgtggggag gggagtcca agtgtgccct 1980
 cctctcttct cctgcctgga ttatttaaaa agccatgtgt ggaaaccac tatttaataa 2040
 35 aagtaataga atcag 2055

<210> 7

<211> 311

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<300>

45 <308> XP_010208

<309> 2001-07-12

<313> (1)..(311)

50 <400> 7

55 Met Leu Thr Lys Pro Leu Gln Gly Pro Pro Ala Pro Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

60 Thr Pro Pro Pro Gly Gly Lys Asp Arg Glu Ala Phe Glu Ala Glu Tyr
 20 25 30

65 Arg Leu Gly Pro Leu Leu Gly Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Phe Ala
 35 40 45

ES 2 307 769 T3

Gly His Arg Leu Thr Asp Arg Leu Gln Val Ala Ile Lys Val Ile Pro
 50 55 60
 5
 Arg Asn Arg Val Leu Gly Trp Ser Pro Leu Ser Asp Ser Val Thr Cys
 65 70 75 80
 10
 Pro Leu Glu Val Ala Leu Leu Trp Lys Val Gly Ala Gly Gly Gly His
 85 90 95
 15
 Pro Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Thr Gln Glu Gly Phe
 100 105 110
 20
 Met Leu Val Leu Glu Arg Pro Leu Pro Ala Gln Asp Leu Phe Asp Tyr
 115 120 125
 25
 Ile Thr Glu Lys Gly Pro Leu Gly Glu Gly Pro Ser Arg Cys Phe Phe
 130 135 140
 30
 Gly Gln Val Val Ala Ala Ile Gln His Cys His Ser Arg Gly Val Val
 145 150 155 160
 35
 His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Arg Arg Gly
 165 170 175
 40
 Cys Ala Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu His Asp Glu
 180 185 190
 45
 Pro Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp
 195 200 205
 50
 Ile Ser Arg His Gln Tyr His Ala Leu Pro Ala Thr Val Trp Ser Leu
 210 215 220
 55
 Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu Arg
 225 230 235 240
 60
 Asp Gln Glu Ile Leu Glu Ala Glu Leu His Phe Pro Ala His Val Ser
 245 250 255
 65
 Pro Asp Cys Cys Ala Leu Ile Arg Arg Cys Leu Ala Pro Lys Pro Ser
 260 265 270
 Ser Arg Pro Ser Leu Glu Glu Ile Leu Leu Asp Pro Trp Met Gln Thr
 275 280 285

ES 2 307 769 T3

Pro Ala Glu Asp Val Pro Leu Asn Pro Ser Lys Gly Gly Pro Ala Pro
290 295 300

5 Leu Ala Trp Ser Leu Leu Pro
305 310

<210> 8

10 <211> 21

<212> RNA

<213> *Homo sapiens*

15 <313> (1)..(21)

<400> 8

20 guguauccccc ggaaucguct t

21

<210> 9

<211> 21

25 <212> RNA

<213> *Homo sapiens*

30 <313> (1)..(21)

<400> 9

35 cacgauuccg gggaaucact t

21

<210> 10

<211> 21

40 <212> RNA

<213> *Homo sapiens*

<313> (1)..(21)

45 <400> 10

gugcuaaggc ccuuagugt t

21

50 <210> 11

<211> 21

<212> RNA

55 <213> *Homo sapiens*

<313> (1)..(21)

60 <400> 11

cacuaagggg ccuuagcact t

21

65