

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 507**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2013 PCT/JP2013/062469**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13162021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 13781041 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2870970**

54 Título: **Agente profiláctico o terapéutico para enfermedades hepáticas**

30 Prioridad:

27.04.2012 JP 2012103958

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

18.05.2018

73 Titular/es:

**MIYAZAKI, TORU (100.0%)
2-12-12-1004, Kasuga Bunkyo-ku
Tokyo 112-0003, JP**

72 Inventor/es:

MIYAZAKI, TORU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 668 507 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

Agente profiláctico o terapéutico para enfermedades hepáticas

Campo técnico

La presente invención versa sobre un agente profiláctico o terapéutico para enfermedades hepáticas y similares.

5 Técnica antecedente

El síndrome metabólico es una enfermedad moderna que ha aflorado rápidamente junto con los cambios en el ámbito de vida en años recientes, y se vienen multiplicando como una caída en cadena de fichas de dominó diversos grupos de enfermedades difíciles de controlar, tales como la diabetes de tipo II, la enfermedad arteriosclerótica y similares. En la cadencia de la enfermedad, el hígado graso se marca junto con la obesidad desde la etapa temprana. Se ha aclarado recientemente que varias docenas porcentuales de pacientes con hígado graso acaban desarrollando una enfermedad denominada esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). En la EHNA, una gran extensión del parénquima hepático se vuelve fibrótica de forma independiente del alcohol, y la cirrosis y el cáncer hepático a menudo se desarrollan más. Aunque para el tratamiento de la EHNA se usan sensibilizadores a la insulina, antioxidantes, agentes de soporte hepático, agentes antihiperlipidémicos, depresores y similares, no existe un método establecido de tratamiento, y se ha deseado el desarrollo de un fármaco terapéutico eficaz.

Sigue siendo desconocido el mecanismo preciso de aparición de la EHNA. Aunque se ha propuesto una teoría de doble estímulo en el sentido de que la EHNA se desarrolla cuando la inflamación y la resistencia a la insulina se combinan con el hígado graso, no hay ninguna prueba experimental concluyente. Como modelo animal de la EHNA, puede mencionarse un ratón cebado con una DDM (dieta deficiente en metionina-colina) o tetracloruro de carbono; sin embargo, la fibrosis tras una necrosis del hígado debida a una deficiencia hepática es la regla general con menor peso corporal, y no refleja con precisión la fibrosis hepática en pacientes humanos con síndrome metabólico, que es causado por la obesidad y el hígado graso debido a la sobrenutrición. Una vez pueda generarse un modelo animal de la EHNA capaz de reproducir la patología humana, podrá hacerse una selección para un fármaco terapéutico para la EHNA o evaluarlo.

Aunque el síndrome metabólico está basado en la adquisición de una resistencia a la insulina asociada con la obesidad, se ha aclarado en años recientes que la inflamación crónica del tejido adiposo es importante. La inflamación sostenida del tejido adiposo debida a la obesidad se extiende por todo el cuerpo induciendo resistencia sistémica a la insulina.

Los presentes inventores han aclarado en años recientes que una clave de la patología es el AIM (inhibidor de la apoptosis del macrófago), según se enuncia a continuación (documentos no de patente 1-4). El AIM es específicamente producido por los macrófagos y está presente en la sangre. Debido a la obesidad, aumenta la concentración sanguínea del AIM, el AIM se incorpora en los adipocitos por endocitosis a través de CD36, induce la degradación (lipólisis) de las grasas neutras acumuladas y libera ácidos grasos libres desde los adipocitos (documento no de patente 5). El ácido graso liberado induce y mantiene la inflamación crónica en tejidos adiposos mediante estimulación de un receptor de tipo Toll (documento no de patente 6). De hecho, en ratones con AIM bloqueado (KO), la obesidad no lleva a una inflamación crónica en todo el cuerpo, incluidos los tejidos adiposos y el hígado, y no produce resistencia a la insulina, lo cual, a su vez, suprime el desarrollo de la diabetes y la arteriosclerosis (documentos no de patente 4, 6). Sin embargo, hasta ahora no se ha conocido la implicación del AIM en la aparición y el avance de las enfermedades hepáticas, en particular la EHNA.

40 Lista de documentos*Documentos no de patente*

Documento no de patente 1: *J Exp Med* 189: 413-422, 1999

Documento no de patente 2: *J Biol Chem* 276: 22910-22914, 2001

45 Documento no de patente 3: *Am J Pathol* 162: 837-847, 2003

Documento no de patente 4: *Cell Metab* 1: 201-213, 2005

50 Documento no de patente 5: *Cell Metab* 11: 479-492, 2010

Documento no de patente 6: *PNAS* 108: 12072-12077, 2011

Compendio de la invención

Problema que han de ser resueltos por la invención

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un fármaco profiláctico o terapéutico para enfermedades hepáticas. Además, la presente invención tiene como objetivo proporcionar un nuevo método para la evaluación o la selección de un fármaco profiláctico o terapéutico para enfermedades hepáticas, siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático. Además, otro objeto de la presente invención proporciona un método diagnóstico de dichas enfermedades hepáticas.

Medios de resolución de los problemas

El presente inventor estudió la patología de ratones con AIM bloqueado engordándolos hasta la obesidad cebándolos con una dieta rica en grasa y obtuvo un descubrimiento sumamente interesante de que se produce una patología similar a la patología de la EHNA humana de (1) obesidad, (2) hígado graso precedente, (3) fibrosis del parénquima hepático y (4) carcinogénesis sumamente frecuente en un estado en el que se suprimen tanto la inflamación crónica de todo el cuerpo, incluyendo el hígado, como la resistencia a la insulina. A partir de ello, se considera que la complementación del AIM se convierte en la profilaxis o tratamiento de una serie de enfermedades hepáticas, tales como el hígado graso, la EHNA y el cáncer hepático.

Los presentes inventores realizaron investigaciones ulteriores basadas en estos hallazgos y completaron la presente invención.

En consecuencia, aquí se dan a conocer:

- [1] un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, que comprende AIM o un péptido parcial del mismo, o un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases que codifica el mismo;
- [2] un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, que comprende un fármaco que incluye expresión de AIM o un fármaco que estabiliza el AIM;
- [3] el agente de [1] o [2], siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático;
- [4] un método de selección para un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, que comprende el uso de un animal obtenido cebando a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM con una dieta rica en grasa;
- [5] el método de [4], que comprende las siguientes etapas:
 - (1) una etapa de administración, en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa, de una sustancia de prueba a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM,
 - (2) una etapa de observación de uno o más elementos cualesquiera de las siguientes propiedades del mamífero no humano deficiente en expresión AIM al que se administra la sustancia de prueba:
 - (i) peso del hígado,
 - (ii) cantidad de grasa en el hígado,
 - (iii) fibra en el hígado,
 - (iv) cáncer hepático, y
 - (v) respuesta inflamatoria en el hígado, y
 - (3) una etapa de selección de una sustancia de prueba que mejora las propiedades anteriormente mencionadas por comparación con la falta de administración de la sustancia de prueba;
- [6] el método de [4] o [5], siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático;
- [7] un método de evaluación de un efecto profiláctico o terapéutico de un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, que comprende el uso de un animal obtenido cebando a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM con una dieta rica en grasa;
- [8] el método de [7], que comprende las siguientes etapas:
 - (1) una etapa de administración, en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa, de un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM,

- (2) una etapa de observación de uno o más elementos cualesquiera de las siguientes propiedades del mamífero no humano deficiente en expresión AIM al que se administra el agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática:
- (i) peso del hígado,
 - (ii) cantidad de grasa en el hígado,
 - (iii) fibra en el hígado,
 - (iv) cáncer hepático,
 - (v) respuesta inflamatoria en el hígado,
- (3) una etapa de evaluación del efecto del agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática por comparación de las propiedades anteriormente mencionadas con las de la falta de administración del agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática;
- [9] el método de [7] u [8], siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático;
- [10] un método de diagnosis de una enfermedad hepática, que comprende las siguientes etapas:
- (1) una etapa de medición de la concentración de AIM de una muestra de un sujeto de prueba,
 - (2) una etapa de comparación de la concentración de AIM anteriormente mencionada de la muestra del sujeto de prueba con la concentración de AIM de una muestra de un ser humano sano,
 - (3) una etapa de diagnóstico en el sentido de que el sujeto de prueba tiene una enfermedad hepática o tiene una elevada posibilidad de desarrollar una enfermedad hepática cuando la concentración de AIM anteriormente mencionada de la muestra del sujeto de prueba es inferior a la concentración de AIM de la muestra del ser humano sano;
- [11] el método de [10], siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático;
- [12] un método para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad hepática, que comprende la administración de una cantidad efectiva de AIM o de un péptido parcial del mismo, o de un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases que codifica el mismo a un sujeto;
- [13] un método para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad hepática, que comprende la administración de una cantidad efectiva de un fármaco que induce la expresión del AIM, o de un fármaco que estabiliza el AIM a un sujeto;
- [14] el método de [12] o [13], siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático;
- [15] un AIM o un péptido parcial del mismo, o un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases que codifica el mismo, para ser usados en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad hepática;
- [16] un AIM o un péptido parcial del mismo, o un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases que codifica el mismo of (15), siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático;
- [17] un fármaco que induce la expresión del AIM o un fármaco que estabiliza el AIM, para ser usados en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad hepática; y
- [18] el fármaco de [17], siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático.

55 Efecto de la invención

La presente invención puede proporcionar un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático, que comprende AIM y similares, como en la presente reivindicación 1, como ingrediente activo. Además, según el método de detección que usa un ratón modelo de enfermedad hepática de la presente invención, puede buscarse una sustancia eficaz para la profilaxis o tratamiento para dichas enfermedades hepáticas. Además, usando el ratón

modelo de enfermedad hepática de la presente invención, pueden evaluarse los efectos de un agente profiláctico o terapéutico conocido para dicha enfermedad hepática. Además, la presente invención puede proporcionar un método para el diagnóstico de una enfermedad hepática midiendo la concentración de AIM en una muestra de un sujeto de prueba, siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra gráficos que indican: A: el peso del hígado, la proporción entre el peso del hígado y el peso corporal, y el peso de las grasas neutras en el hígado de ratones con AIM KO y ratones WT (*wild-type*, o sea de referencia o de forma natural) cebados con una dieta rica en grasa. $media \pm SEM$, ***; $P < 0,001$. B: imágenes, tincionadas con hematoxilina-eosina (HE), de secciones tisulares hepáticas de ratones con AIM KO y ratones WT cebados con una dieta rica en grasa.

La Fig. 2 muestra: A: imágenes, tincionadas con rojo sirio, de secciones tisulares hepáticas de ratones con AIM KO y ratones WT en la semana 20 tras ser cebados con una dieta rica en grasa. B: gráfico que muestra la proporción de fibrosis en secciones tisulares hepáticas de ratones con AIM KO y ratones WT cebados con una dieta rica en grasa durante 0, 6, 12, 20, 45 y 55 semanas. C: gráficos que muestran los niveles de expresión relativa de ARNm de TGFβ1 y αSMA en el hígado de ratones con AIM KO y ratones WT cebados con una dieta rica en grasa.

La Fig. 3 muestra: A: imágenes fotográficas del hígado aislado de ratones con AIM KO (indicados como AIM^{-/-}) y ratones WT (indicados como AIM^{+/+}) cebados con una dieta rica en grasa durante 52 semanas. B: imagen, tincionada con hematoxilina-eosina, de una sección tisular hepática de ratones con AIM KO cebados con una dieta rica en grasa durante 52 semanas. C: gráfico que muestra la frecuencia de aparición de cáncer hepatocelular (CHC) bien diferenciado en secciones tisulares hepáticas de ratones con AIM KO y ratones WT cebados con una dieta rica en grasa durante 0, 6, 12, 20, 45 y 52 semanas.

La Fig. 4 muestra imágenes, tincionadas con anticuerpos anti AFP, de secciones tisulares hepáticas y un gráfico que muestra los niveles de expresión relativa de AFP en el hígado de ratones con AIM KO y ratones WT cebados con una dieta rica en grasa.

La Fig. 5 presenta gráficos que muestran los niveles de expresión relativa de F4/80 (macrófago), TNFα, IL-6, IL-1β en el hígado de ratones con AIM KO y ratones WT cebados con una dieta rica en grasa. $media \pm SEM$, *, $P < 0,05$, **, $P < 0,01$, ***, $P < 0,001$.

La Fig. 6 muestra: A: una imagen de inmunoelectrotransferencia (Western blot, WB) del AIM presente en los sueros de ratones con AIM KO, ratones WT y ratones con RAG KO, y una imagen de inmunoelectrotransferencia del AIM ligado *in vitro* a IgM monoclonal o policlonal, y B: imagen de inmunoelectrotransferencia del AIM presente en el suero de ratones con RAG KO inyectados intravenosamente con IgM.

La Fig. 7 muestra gráficos que indican la correlación entre los niveles de AIM e IgM en los sueros de ratones y seres humanos.

La Fig. 8 muestra imágenes tincionadas con anticuerpos anti AIM e imágenes de inmunoelectrotransferencia de hepatocitos murinos primarios cultivados incubados con AIM.

La Fig. 9 muestra imágenes, tincionadas con rojo aceite O, de hepatocitos murinos primarios cultivados incubados con o sin AIM después de un precultivo con ácido oleico, y un gráfico que muestra el nivel de expresión relativa de FSP27 en la célula.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra el efecto de supresión de la diferenciación adipocítica del AIM o de cada proteína de los dominios SRCR en los preadipocitos 3T3-L1.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra la concentración del AIM del suero en pacientes con EHNA y en pacientes sin EHNA.

La Fig. 12 presenta: A: un gráfico que muestra los cambios en el peso corporal en ratones con AIM KO alimentados con una dieta rica en grasa con AIMr o PBS, y B: imágenes macroscópicas del hígado, una imagen, tincionada con hematoxilina-eosina, de una sección tisular hepática (sitio canceroso, sitio no canceroso), un gráfico que muestra la frecuencia de aparición de cáncer y un gráfico que muestra la cantidad de grasa neutra hepática en ratones con AIM KO alimentados con una dieta rica en grasa con AIMr o PBS.

Descripción de realizaciones

En la presente invención, AIM es una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2.

El AIM puede ser, por ejemplo, una proteína aislada y purificada del macrófago, que es el inmunocito de los animales de sangre caliente (por ejemplo, ser humano, ratón, rata, conejo, oveja, cerdo, bóvido, caballo, gato, perro,

mono, chimpancé, pollo y similares). También puede ser una proteína sintetizada químicamente o sintetizada bioquímicamente en un sistema de traducción *in vitro*. Alternativamente, la proteína puede ser una proteína recombinante producida a partir de un transformante que incorpora un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos anteriormente descrita.

- 5 “Sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2” se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de aproximadamente el 60% o más, preferentemente de aproximadamente el 70% o más, más preferentemente de aproximadamente el 80% o más, siendo particularmente preferente de aproximadamente el 90% o más, siendo lo más preferible de aproximadamente el 95% o más, a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2, y similares. Aquí, “una homología”
10 significa una proporción (%) de residuos de aminoácidos idénticos y residuos de aminoácidos similares con respecto a todos los residuos de aminoácidos superpuestos en el alineamiento óptimo (preferentemente, el algoritmo considera la introducción de huecos a uno o ambos lados de la secuencia para el mejor alineamiento), alineándose dos secuencias de aminoácidos usando un algoritmo matemático conocido en el campo de la técnica. “Aminoácido similar” significa un aminoácido que tiene propiedades fisicoquímicas similares, ejemplos del cual incluyen
15 aminoácidos clasificados en el mismo grupo, tales como aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, Tyr), aminoácidos alifáticos (Ala, Leu, Ile, Val), aminoácidos polares (Gln, Asn), aminoácidos básicos (Lys, Arg, His), aminoácidos ácidos (Glu, Asp), aminoácidos que tienen un grupo hidroxilo (Ser, Thr) y aminoácidos que tienen una pequeña cadena lateral (Gly, Ala, Ser, Thr, Met). Se espera que la sustitución por tales aminoácidos similares no cambie el fenotipo de las proteínas (es decir, una sustitución de aminoácidos conservadora). En el campo técnico se conocen y describen ejemplos específicos de la sustitución de aminoácidos conservadora en diversos documentos (véase, por ejemplo, Bowie et al., *Science*, 247:1306-1310 (1990)).

La homología de secuencias de aminoácidos en la presente descripción puede calcularse usando el algoritmo de cálculo de la homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool, herramienta básica de búsqueda de alineamiento local del Centro Nacional Estadounidense de Información
25 Biotecnológica) en las condiciones siguientes: expectativa=10; huecos permitidos; matriz=BLOSUM62; filtrado=DESACTIVADO. Como ejemplos de otros algoritmos para la determinación de la homología de secuencias de aminoácidos, pueden mencionarse el algoritmo descrito en Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5877 (1993) [el algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997))], el algoritmo descrito en Needleman et al., *J. Mol. Biol.*, 48:444-453 (1970) [el algoritmo está incorporado en el programa GAP del paquete de soporte lógico GCG], el algoritmo descrito en Myers y Miller, *CABIOS*, 4:11-17 (1988) [el algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de soporte lógico de alineamiento de secuencias CGC], el algoritmo descrito en Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448 (1988) [el algoritmo está incorporado en el programa FASTA del paquete de soporte lógico GCG] y similares, los cuales pueden asimismo ser usados de forma preferente.

- 35 Más preferentemente, “sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2” es una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de aproximadamente el 60% o más, preferentemente de aproximadamente el 70% o más, más preferentemente de aproximadamente el 80% o más, siendo particularmente preferente de aproximadamente el 90% o más, y siendo lo más preferible de aproximadamente el 95% o más, con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2.

40 Como proteína que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2, por ejemplo, son preferibles una proteína que comprenda sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada mostrada en la SEC ID N°:2 y que tenga una actividad sustancialmente de la misma cualidad que la de una proteína que comprenda la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2 y similares. Aquí, la “actividad” se refiere, por ejemplo, a
45 una actividad de supresión de la apoptosis del macrófago en placa aterosclerótica, a una actividad de mantenimiento o promoción de la arteriosclerosis, a una actividad de supresión de la diferenciación de adipocitos, a una actividad de fusión de las gotitas lipídicas de los adipocitos, a una actividad de reducción de los adipocitos, a una actividad de enlace a CD36, a una actividad de endocitosis para el adipocito, a una actividad de enlace a FAS, a una actividad de supresión de la función FAS, a una actividad antiobesidad o similares. Ser “sustancialmente de la misma cualidad”
50 significa que la actividad de la misma es cualitativamente (por ejemplo, fisiológica o farmacológicamente) la misma. Por lo tanto, es preferible que las actividades anteriormente mencionadas sean equivalentes entre sí, pero los factores cuantitativos de estas actividades, tales como el grado de la actividad (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 veces, preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 veces) y el peso molecular de la proteína pueden ser diferentes.

- 55 Las actividades anteriormente mencionadas pueden ser medidas mediante un método conocido independientemente.

Ejemplos del AIM aquí dado a conocer también incluyen proteínas que comprenden (1) una secuencia de aminoácidos que tiene 1 o 2 o más (preferentemente de aproximadamente 1 a 100, preferentemente de aproximadamente 1 a 50, más preferentemente de aproximadamente 1 a 10, siendo particularmente preferible de 1 a varios (2, 3, 4 o 5)) aminoácidos delecionados de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2, (2)
60 una secuencia de aminoácidos que tiene 1 o 2 o más (preferentemente de aproximadamente 1 a 100,

preferentemente de aproximadamente 1 a 50, más preferentemente de aproximadamente 1 a 10, siendo particularmente preferible de 1 a varios (2, 3, 4 o 5)) aminoácidos añadidos a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2, (3) una secuencia de aminoácidos que tiene 1 o 2 o más (preferentemente de aproximadamente 1 a 50, preferentemente de aproximadamente 1 a 10, más preferentemente de 1 a varios (2, 3, 4 o 5)) aminoácidos insertados en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2, (4) una secuencia de aminoácidos que tiene 1 o 2 o más (preferentemente de aproximadamente 1 a 50, preferentemente de aproximadamente 1 a 10, más preferentemente de 1 a varios (2, 3, 4 o 5)) aminoácidos sustituidos por otros aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2, o (5) una secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de las mismas.

10 Cuando una secuencia de aminoácidos ha sido insertada, delecionada o sustituida según acaba de describirse, la posición de la inserción, la deleción o la sustitución no está limitada en particular, siempre y cuando se mantenga la actividad de la proteína.

El AIM de la presente invención es, preferentemente, una proteína AIM humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2 (n° de entrada en GenBank: AAD01446), o una homóloga de la misma en otros mamíferos [por ejemplo, el homólogo murino registrado en GenBank como n° de entrada AAD01445, y similares].

En la presente memoria, las proteínas y los péptidos son descritos según la práctica común de designación de péptidos, en la que el extremo izquierdo indica el N-terminal (amino-terminal) y el extremo derecho indica el C-terminal (carboxilo-terminal). En el AIM de la presente invención, que incluye una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2, el C-terminal puede ser cualquiera de un grupo carboxilo (-COOH), carboxilato (-COO⁻), amida (-CONH₂) y éster (-COOR).

Aquí, como R en el éster, pueden usarse un grupo alquilo C₁₋₆ —por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y n-butilo—, un grupo cicloalquilo C₃₋₈ —por ejemplo, ciclopentilo y ciclohexilo—, un grupo arilo C₆₋₁₂ —por ejemplo, fenilo y α-naftilo—, un grupo alquil fenílico C₁₋₂ —por ejemplo, bencilo y fenetilo—, un grupo aralquilo C₇₋₁₄ —por ejemplo, un grupo alquilo α-naftílico C₁₋₂; por ejemplo, α-naftilmetilo, un grupo pivaloiloximetilo— y similares.

Quando el AIM de la presente invención tiene un grupo carboxilo (o carboxilato) en una posición distinta del C-terminal, en la proteína de la presente invención también se incluye una proteína en la que el grupo carboxilo está amidado o esterificado. En este caso, como éster se usan, por ejemplo, el éster anteriormente descrito en el C-terminal y similares.

Además, el AIM de la presente invención también incluye una proteína en la que el grupo amino del residuo de aminoácido del N-terminal está protegido por un grupo protector (por ejemplo, grupos acilo C₁₋₆, tales como alcanóilos C₁₋₆ tales como el grupo formilo y el grupo acetilo, y similares); una proteína en la que el residuo de glutamina que puede producirse tras la escisión en el N-terminal *in vivo* ha sido convertido en ácido piroglutámico; una proteína en la que un sustituyente (por ejemplo, -OH, -SH, un grupo amino, un grupo imidazol, un grupo indol, un grupo guanidino y similares) de una cadena lateral de un aminoácido en la molécula está protegido por un grupo protector adecuado (por ejemplo, grupos acilo C₁₋₆ tales como grupos alcanóilo C₁₋₆ tales como el grupo formilo y el grupo acetilo, y similares); un péptido conjugado tal como lo que se denomina glicopéptido, que tiene una cadena azucarada unida al mismo, y similares.

El péptido parcial del AIM (que en lo sucesivo a veces ha de ser abreviado simplemente a “el péptido parcial de la presente invención”) puede ser cualquiera, siempre y cuando sea un péptido que tenga la secuencia parcial de aminoácidos de AIM anteriormente mencionada, y tenga una actividad sustancialmente de la misma cualidad que el AIM. Aquí, la “actividad sustancialmente de la misma cualidad” es como se ha definido anteriormente. Además, la “actividad sustancialmente de la misma cualidad” puede ser medida de la misma manera que en el caso del AIM.

Dado que el AIM comprende 3 dominios SRCR (ricos en cisteína de receptor depurador) que comprenden una gran cantidad de cisteína, los respectivos dominios SRCR pueden ser usados como el péptido parcial de la presente invención. Siendo específicos, por ejemplo, de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2, pueden usarse secuencias parciales de aminoácidos que comprenden, respectivamente, el dominio SRCR1 (aminoácidos n^{os} 24 - 125 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2), el dominio SRCR2 (aminoácidos n^{os} 138 - 239 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2), y el dominio SRCR3 (aminoácidos n^{os} 244 - 346 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:2), una secuencia parcial de aminoácidos que comprenda cualquier combinación de dominios SRCR y similares. El tamaño del péptido parcial de la presente invención no está limitado en particular, siempre y cuando comprenda el dominio funcional anteriormente mencionado. Preferentemente, el péptido parcial comprende no menos de 50 secuencias parciales de aminoácidos, más preferentemente no menos de 100 secuencias parciales de aminoácidos, más preferentemente no menos de 200 secuencias parciales de aminoácidos. Las secuencias parciales de aminoácidos pueden ser una sola secuencia parcial de aminoácidos continua, o múltiples secuencias parciales de aminoácidos no contiguas ligadas entre sí.

Además, el C-terminal del péptido parcial de la presente invención puede ser cualquiera de un grupo carboxilo (-COOR), carboxilato (-COO⁻), amida (-CONH₂) y éster (-COOR). Aquí, los ejemplos de la R en el éster incluyen los

similares a los ejemplos enumerados anteriormente para el AIM. Cuando el péptido parcial de la presente invención tiene un grupo carboxilo (o carboxilato) en una posición distinta del C-terminal, el grupo carboxilo puede estar amidado o esterificado, lo cual también está abarcado en el péptido parcial de la presente invención. En este caso, como éster se usan, por ejemplo, los similares al éster en el C-terminal y similares.

- 5 Además, en el péptido parcial de la presente invención, de la misma manera que en el AIM anteriormente mencionado, el grupo amino del residuo de aminoácido del N-terminal puede ser protegido con un grupo protector, el residuo de glutamina en el N-terminal puede ser convertido en ácido piroglutámico, un sustituyente en la cadena lateral del aminoácido en una molécula puede ser protegido con un grupo protector adecuado, o el péptido parcial puede ser un péptido compuesto en el que hay unida una cadena azucarada (denominado glicopéptido), y similares.
- 10 El AIM o un péptido parcial del mismo para ser usado en la presente invención puede estar en forma de sal. Se usan, por ejemplo, sales con un ácido fisiológicamente aceptable (por ejemplo, un ácido inorgánico o un ácido orgánico), una base (por ejemplo, una sal de metal alcalino) y similares, y son preferibles las sales de adición de ácido fisiológicamente aceptables. Las sales útiles incluyen, por ejemplo, sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico) o sales con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico) y similares.

El AIM puede ser producido a partir de un macrófago de los mamíferos anteriormente mencionados mediante un método de purificación de proteínas conocido independientemente. Siendo específicos, el AIM o una sal del mismo puede ser preparado homogeneizando un macrófago de mamífero, eliminando los restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad, centrifugando el sobrenadante a alta velocidad para precipitar una fracción que comprende la membrana celular, y sometiendo al sobrenadante a cromatografía —tal como cromatografía en fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares— y similares.

El AIM o un péptido parcial del mismo también puede ser producido según un método de conocimiento público de síntesis de péptidos (en lo sucesivo, el AIM de longitud máxima y un péptido parcial del mismo son denominados de forma conjunta simplemente como AIM en la explicación de la síntesis química del mismo, a no ser que se especifique algo distinto).

El método de síntesis de péptidos puede ser, por ejemplo, cualquiera de un proceso de síntesis en fase sólida y un proceso de síntesis en fase líquida. Puede producirse una proteína deseada condensando un péptido parcial o aminoácido capaz de constituir el AIM con la porción restante, y eliminando cualquier grupo protector que el producto resultante pueda tener.

Aquí, la condensación y la eliminación del grupo protector se llevan a cabo según métodos conocidos independientemente; por ejemplo, los métodos indicados en las referencias (1) y (2) siguientes:

- (1) M. Bodanszky y M.A. Ondetti: *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, Nueva York (1966)
 (2) Schroeder y Luebke: *The Peptide*, Academic Press, Nueva York (1965).

35 El AIM así obtenido puede ser purificado o aislado por un método de purificación conocido. Aquí, como ejemplos del método de purificación, pueden mencionarse la extracción con disolventes, la destilación, la cromatografía en columna, la cromatografía líquida, la recristalización, combinaciones de las mismas y similares.

40 Cuando el AIM así obtenido está en forma libre, la forma libre puede ser convertida en una forma salina adecuada por un método conocido o un análogo del mismo y, por otro lado, cuando el AIM es obtenido en forma de sal, puede ser convertido en la forma libre o en forma de una sal diferente mediante un método conocido o un análogo del mismo.

Además, el AIM también puede ser producido cultivando un transformante que comprende un ácido nucleico que codifica el mismo, y separando y purificando el AIM del cultivo obtenido. El ácido nucleico que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo puede ser ADN o ARN, o una quimera ADN/ARN, preferentemente ADN. Además, el ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario. En el caso de un ácido nucleico bicatenario, puede ser un ADN bicatenario, un ARN bicatenario, o un híbrido ADN:ARN. En el caso de una única cadena, puede ser una cadena sentido (es decir, una cadena codificante), o una cadena antisentido (es decir, una cadena no codificante).

Ejemplos del ADN que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo incluyen ADN genómico, ADNc derivado de macrófago de un animal de sangre caliente (por ejemplo, ser humano, bóvido, mono, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, cobaya, rata, ratón, conejo, hámster, pollo y similares), ADN sintético y similares. El ADN genómico que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo puede ser directamente amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (abreviada en lo sucesivo como "método PCR") usando como plantilla una fracción de ADN genómico preparada a partir de cualquier célula de los animales mencionados anteriormente [por ejemplo, un hepatocito, un esplenocito, una célula nerviosa, una célula glial, célula β pancreática, un mielocito, una célula mesangial, una célula de Langerhans, una célula epidérmica, una célula epitelial, una célula calciforme, una célula endotelial, un fibroblasto celular de músculo liso, un fibrocito, un miocito, un adipocito, un inmunocito (por ejemplo, macrófago, célula T, célula B, célula asesina natural, mastocito, neutrófilo, basófilo, eosinófilo, monocito), un megacariocito, una célula sinovial,

un condrocito, una célula ósea, un osteoblasto, un osteoclasto, una célula de glándula mamaria, un hepatocito o una célula intersticial, o la correspondiente célula progenitora, célula madre o célula cancerosa de los mismos, y similares] de un ser humano o de otro animal de sangre caliente (por ejemplo, mono, bóvido, caballo, cerdo, oveja, cabra, ratón, rata, cobaya, hámster, pollo y similares), o cualquier tejido en el que estén presentes tales células [por ejemplo, el cerebro o cualquier porción del cerebro (por ejemplo, el bulbo olfatorio, el núcleo amigdalóide, los ganglios basales, el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo, el núcleo subtalámico, la corteza cerebral, el bulbo raquídeo, el cerebelo), la médula espinal, la hipófisis, el estómago, el páncreas, el riñón, el hígado, una gónada, la glándula tiroidea, la vesícula biliar, la médula ósea, una glándula suprarrenal, la piel, un pulmón, el tracto gastrointestinal (por ejemplo, el intestino grueso, el intestino delgado), un vaso sanguíneo, el corazón, el timo, el bazo, la glándula submandibular, sangre periférica, la próstata, un testículo, un ovario, la placenta, el útero, un hueso, una articulación, tejido adiposo (por ejemplo, grasa parda, grasa blanca), músculo esquelético y similares], y ADNc que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo también puede ser amplificado directamente por el método PCR y por PCR con transcriptasa inversa (abreviada en lo sucesivo como “método RT-PCR”) usando como plantilla una fracción total de ARN o ARNm preparada a partir de un macrófago, respectivamente. Alternativamente, el ADN genómico y ADNc que codifican el AIM o un péptido parcial del mismo también pueden ser clonados por el método de hibridación de colonias o placas o el método PCR y similares a partir de una biblioteca de ADN genómico y una biblioteca de ADNc preparada insertando el ADN genómico anteriormente mencionado y el ARN total o un fragmento de ARNm en un vector adecuado. El vector usado para la biblioteca puede ser cualquiera entre un bacteriófago, un plásmido, un cósmido, un fagémido y similares.

Ejemplos del ADN que codifica el AIM incluyen un ADN que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de bases que la secuencia de bases mostrada por las bases n^{os} 64 a 1107 de la SEC ID N^o: 1 y similares.

Como ADN que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de bases que la secuencia de bases mostrada por las bases n^{os} 64 a 1107 de la SEC ID N^o: 1, se usan un ADN que comprende una secuencia de bases que tiene una homología no menor de aproximadamente el 60%, preferentemente no menor de aproximadamente el 70%, más preferentemente no menor de aproximadamente el 80%, siendo particularmente preferible no menor de aproximadamente el 90%, con la secuencia de bases mostrada por las bases n^{os} 64 a 1107 de la SEC ID N^o: 1, y que codifica una proteína que tiene una actividad sustancialmente de la misma cualidad que el AIM mencionado anteriormente y similares.

La homología de secuencias de bases en la presente descripción puede ser calculada usando el algoritmo de cálculo de la homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool, herramienta básica de búsqueda de alineamiento local del Centro Nacional Estadounidense de Información Biotecnológica) en las condiciones siguientes: expectativa=10; huecos permitidos; filtrado=ACTIVADO; puntuación de coincidencia=1; puntuación de discrepancia=-3. Como ejemplos preferentes de otros algoritmos para la determinación de la homología de secuencias de bases, también puede mencionarse el algoritmo de cálculo de la homología de secuencias de aminoácidos anteriormente descrito.

Preferentemente, el ADN que codifica el AIM es un ADN que comprende una secuencia de bases que codifica la proteína AIM humana mostrada por la secuencia de bases mostrada por las bases n^{os} 64 a 1107 de la SEC ID N^o: 1 (n^o de entrada de GenBank: AF011429), o una homóloga de la misma en otros mamíferos [por ejemplo, el homólogo murino registrado en GenBank como n^o de entrada AF011428, y similares].

El ADN que codifica el péptido parcial de la presente invención puede ser cualquiera, siempre y cuando comprenda una secuencia de bases que codifique un péptido que comprenda una secuencia de aminoácidos igual o sustancialmente igual que una parte de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N^o:2. Específicamente, como ADN que codifica el péptido parcial de la presente invención, se usan (1) un ADN que comprende una secuencia parcial de bases mostrada por la secuencia de bases mostrada por las bases n^{os} 64 a 1107 de la SEC ID N^o: 1, o (2) un ADN que comprende una secuencia de bases que tiene una homología no menor de aproximadamente el 60%, preferentemente no menor de aproximadamente el 70%, más preferentemente no menor de aproximadamente el 80%, siendo particularmente preferible no menor de aproximadamente el 90%, con un ADN que comprende una secuencia parcial de bases mostrada por las bases n^{os} 64 a 1107 de la SEC ID N^o: 1, y que codifica una proteína que tiene una actividad sustancialmente de la misma cualidad que el AIM mencionado anteriormente y similares.

Un ADN que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo puede ser clonado amplificando un cebador de ADN sintetizado que tiene una parte de una secuencia de bases que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo mediante el método PCR, o hibridando un ADN incorporado en un vector adecuado de expresión con un fragmento de ADN marcado o un ADN sintético que codifica una región parcial o total del AIM. La hibridación se puede llevar a cabo según un método conocido independientemente o un método basado en el mismo; por ejemplo, un método descrito en *Molecular Cloning*, 2^a edición (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) y similares. Cuando se usa una biblioteca comercialmente disponible, la hibridación puede llevarse a cabo según el método descrito en el manual de instrucción adjunto a la misma. Preferentemente, la hibridación puede llevarse a cabo en condiciones sumamente estrictas.

Como ejemplos de condiciones sumamente estrictas, pueden mencionarse las condiciones de una reacción de

- 5 hibridación en 6×SSC (cloruro sódico/citrato sódico) a 45°C seguida por lavado en 0,2×SSC/SDS al 0,1% a 65°C una vez o más y similares. Los expertos en la técnica son capaces de obtener fácilmente el rigor deseado cambiando la concentración salina de la solución de hibridación, la temperatura de la reacción de hibridación, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda, el número de discrepancias, el tiempo de la reacción de hibridación, la concentración salida de la solución de lavado, la temperatura de lavado y similares, según proceda. Cuando se usa una biblioteca comercialmente disponible, la hibridación puede llevarse a cabo según el método descrito en el manual de instrucción adjunto a la biblioteca.
- 10 Se puede producir un vector de expresión que comprende ADN que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo, por ejemplo, cortando un fragmento de ADN deseado del ADN que codifica el AIM, y uniendo el fragmento de ADN corriente abajo de un promotor en un vector apropiado de expresión.
- Como vector de expresión, se usan un plásmido derivado de *Escherichia coli* (por ejemplo, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13); un plásmido de expresión en células animales (por ejemplo, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo); vectores de virus de animales tales como retrovirus, *vaccinia virus*, adenovirus y similares; y similares.
- 15 El promotor puede ser cualquier promotor, siempre y cuando sea apropiado para el anfitrión usado para expresar el gen.
- Por ejemplo, cuando el anfitrión es una célula animal, se usan el promotor SR α , el promotor SV40, el promotor LTR, el promotor CMV (citomegalovirus), el promotor RSV (virus del sarcoma de Rous), la LTR MoMuLV (virus de la leucemia murina de Moloney), el promotor HSV-TK (timidina quinasa del virus del herpes simple) y similares. De estos, son preferibles el promotor CMV, el promotor SR α y similares.
- 20 Cuando el anfitrión es una bacteria del género *Escherichia*, se prefieren el promotor trp, el promotor lac, el promotor recA, el promotor λ P_L, el promotor lpp, el promotor T7 y similares.
- 25 Vectores de expresión útiles incluyen, además de los anteriores, los que opcionalmente albergan un potenciador, una señal de empalme, una señal de adición de poliA, un marcador de selección, un origen de duplicación del SV40 (también abreviado en lo sucesivo SV40ori) y similares. Como ejemplos del marcador de selección, pueden mencionarse el gen de la dihidrofolato reductasa (también abreviada en lo sucesivo dhfr) [resistencia al metotrexato (MTX)], el gen de la resistencia a la ampicilina (también abreviada en lo sucesivo Amp^r), el gen de la resistencia a la neomicina (también abreviada en lo sucesivo Amp^r), el gen de la resistencia a la neomicina (también abreviada en lo sucesivo resistencia Neo^r, G418) y similares. En particular, cuando se usa una célula de hámster chino que carece del gen dhfr en combinación con el gen dhfr como marcador de selección, también se puede seleccionar un gen
- 30 diana usando un caldo carente de timidina.
- 35 Cuando sea necesario, una secuencia de bases que codifique una secuencia de señales (codón señal) adecuada para un anfitrión puede ser añadida (o sustituida con un codón señal nativo) al lado 5'-terminal de un ADN que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo. Por ejemplo, cuando el anfitrión es del género *Escherichia*, se usan la secuencia de señales PhoA, la secuencia de señales OmpA y similares; cuando el anfitrión es una célula animal, se usan la secuencia de señales de la insulina, la secuencia de señales del interferón α , la secuencia de señales de moléculas de anticuerpos y similares.
- El AIM o un péptido parcial del mismo puede ser producido transformando un anfitrión con un vector de expresión que comprenda el ADN anteriormente mencionado que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo, y cultivando del transformante obtenido.
- 40 Como anfitrión, se usan el género *Escherichia*, una célula animal y similares.
- Como género *Escherichia*, se usan, por ejemplo, *Escherichia coli* K12-DH1 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 60, 160 (1968)], *Escherichia coli* JM103 [*Nucleic Acids Research*, vol. 9, 309 (1981)], *Escherichia coli* JA221 [*Journal of Molecular Biology*, vol. 120, 517 (1978)], *Escherichia coli* HB101 [*Journal of Molecular Biology*, vol. 41, 459 (1969)], *Escherichia coli* C600 [*Genetics*, vol. 39, 440 (1954)] y similares.
- 45 Como célula animal se usan, por ejemplo, una célula COS-7 de mono, una célula Vero de mono, una célula de ovario de hámster chino (abreviada en lo sucesivo célula CHO), una célula CHO carente del gen dhfr (abreviada en lo sucesivo célula CHO(dhfr⁻)), una célula L de ratón, una célula AtT-20 de ratón, una célula de mieloma de ratón, una célula ratGH3, una célula de LF humano y similares.
- La transformación se puede llevar a cabo según el tipo de anfitrión según un método de conocimiento público.
- 50 El género *Escherichia* puede ser transformado, por ejemplo, según los métodos descritos en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 69, 2110 (1972), *Gene*, vol. 17, 107 (1982) y similares.
- Una célula animal puede ser transformada, por ejemplo, según un método descrito en *Saibo Kogaku* (Ingeniería celular), número extra 8, *Shin Saibo Kogaku Jikken Protocol* (Nuevo protocolo experimental de ingeniería celular), 263-267 (1995), publicado por Shujunsha, o *Virology*, Vol. 52, 456 (1973).

El cultivo de un transformante puede llevarse a cabo según el tipo de anfitrión según un método de conocimiento público.

5 Como ejemplo de caldo usado para cultivar un transformante cuyo anfitrión es una bacteria del género *Escherichia*, es preferible un caldo M9 complementado con glucosa y un casaminoácido [Miller, *Journal of Experiments in Molecular Genetics*, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1972]. Según se requiera, para aumentar la eficacia del promotor, puede añadirse al caldo un agente químico tal como ácido 3 β -indolilacrilico.

El cultivo de un transformante cuyo anfitrión es una bacteria del género *Escherichia* se lleva a cabo normalmente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 43°C durante entre aproximadamente 3 y aproximadamente 24 horas. Según sea necesario, el cultivo puede ser aireado o agitado.

10 Caldos útiles para cultivar a un transformante cuyo anfitrión sea una célula animal incluyen, por ejemplo, el medio esencial mínimo (MEM), que comprende entre aproximadamente un 5 y aproximadamente un 20% de suero fetal bovino [*Science*, vol. 122, 501 (1952)], el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) [*Virology*, vol. 8, 396 (1959)], el caldo RPMI1640 [*The Journal of the American Medical Association*, vol. 199, 519 (1967)], caldo 199 [*Proceeding of the Society for the Biological Medicine*, vol. 73, 1 (1950)] y similares. Preferentemente el pH del caldo se encuentra entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. El cultivo se lleva a cabo normalmente a entre
15 aproximadamente 30°C y aproximadamente 40°C durante de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 horas. Según sea necesario, el cultivo puede ser aireado o agitado.

Según se ha descrito anteriormente, el AIM puede producirse en una célula del transformante o fuera de la célula.

20 El AIM o un péptido parcial del mismo pueden ser separados y purificados a partir del cultivo obtenido cultivando el transformante anteriormente mencionado según un método conocido independientemente.

Por ejemplo, cuando se extrae el AIM o un péptido parcial del mismo de una bacteria cultiva o del citoplasma de una célula, se usa un método apropiado en el que se recogen bacterias o células mediante un medio conocido, se las suspende en una solución tampón apropiada y se las altera mediante ultrasonidos, lisozimas y/o congelación-descongelación y similares, después de lo cual se obtiene por centrifugación o filtración un extracto no tratado de
25 proteína soluble. La solución tampón puede comprender un desnaturizante de proteínas, tal como clorhidrato de urea o de guanidina, y un tensioactivo tal como Triton X-100™. Además, cuando el AIM o un péptido parcial del mismo es segregado fuera del hongo (célula), se usan un método de separación del sobrenadante de cultivo de un cultivo por centrifugación, filtración o similares, y similares.

30 El aislamiento y la purificación del AIM o de un péptido parcial del mismo contenido en la fracción soluble así obtenida y el sobrenadante del cultivo puede llevarse a cabo según un método conocido independientemente. Métodos útiles incluyen métodos basados en la solubilidad, tales como la salazón y la precipitación por disolventes, métodos basados principalmente en diferencias en el peso molecular, tales como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida; métodos basados en diferencias de carga, tales como la cromatografía de intercambio iónico; métodos basados en la afinidad específica, tales como la cromatografía de
35 afinidad; métodos basados en diferencias de hidrofobicidad, tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa; y métodos basados en diferencias de puntos isoeléctricos, tales como el isoelectroenfoque. Estos métodos pueden ser combinados según resulte apropiado.

La presencia del AIM o de un péptido parcial del mismo así obtenidos puede ser confirmada mediante inmunoensayo enzimático, inmunoelctrotransferencia y similares usando un anticuerpo contra AIM.

40 El AIM o un péptido parcial del mismo o una sal de los mismos en un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases que codifica el AIM o un péptido parcial del mismo (a veces indicados aquí como AIM) obtenidos según se ha mencionado anteriormente pueden ser proporcionados como un agente para la profilaxis de la aparición de enfermedades hepáticas o para su tratamiento.

45 En la presente divulgación, en lugar de los AIM, también pueden ser usados un fármaco que induzca la expresión del AIM y un fármaco que estabilice el AIM.

Ejemplos del fármaco que induce la expresión del AIM incluyen un compuesto que tiene una actividad transcritora del AIM y similares, y ejemplos del compuesto incluyen un factor de transcripción capaz de unirse a la región promotora del gen AIM y similares. El presente inventor también ha descubierto que el AIM es expresado en el macrófago. Por lo tanto, como fármaco inductor de la expresión del AIM, puede mencionarse un inductor de la
50 diferenciación de macrófagos. El inductor de la diferenciación de macrófagos no está limitado en particular, siempre y cuando pueda inducir una diferenciación de macrófagos a partir de células progenitoras tales como una célula formadora de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM), una célula formadora de colonias de macrófagos (CFU-M) y similares, y pueden usarse un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), un factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y similares. El factor de transcripción, GM-CSF y M-CSF
55 pueden ser proteínas aisladas y purificadas a partir de tejidos de mamífero mediante medios conocidos mencionados anteriormente, o pueden ser proteínas sintetizadas químicamente o sintetizadas bioquímicamente en un sistema de traducción *in vitro*. Alternativamente, pueden ser proteínas recombinantes producidas a partir de

transformantes introducidos con un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases que codifique las proteínas anteriormente mencionadas.

5 Ejemplos del fármaco que estabiliza el AIM incluyen un compuesto que inhibe la degradación del AIM, un compuesto que inhibe la excreción a la orina y similares. Ejemplos del compuesto que inhibe la degradación incluyen un inhibidor de la proteasa, un inhibidor del proteasoma y similares. Ejemplos de inhibidores de la proteasa incluyen el clorhidrato de fluoruro de (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo (AEBSGF) inhibidor de la serina proteasa, la aprotinina, el inhibidor de la tripsina y similares, el inhibidor de la cisteína proteasa (E-64, leupeptina y similares) y similares. Ejemplos de inhibidores del proteasoma incluyen lactacistina, MG-115, MG-132, inhibidor I del proteasoma y similares. Ejemplos del compuesto que inhibe la excreción a la orina incluyen un compuesto que confiere al AIM un peso molecular que le impide atravesar la membrana basal glomerular. Según se muestra en los Ejemplos mencionados más abajo, dado que podría confirmarse la unión de la IgM con el AIM, puede mencionarse la IgM como un compuesto que inhibe la excreción del AIM a la orina. Sin embargo, dado que se teme que la administración IgM sola cause efectos secundarios en el sistema inmunitario, se usa preferentemente una proteína de fusión obtenida por la fusión del fragmento Fc de la IgM que es un sitio de unión al AIM y una proteína que tenga un peso molecular del nivel que impide la filtración por un túbulo renal y su excreción a la orina. Aunque la proteína que haya de fusionarse no está limitada, es preferible una proteína de la que haya menos temor de efectos secundarios y puede usarse, por ejemplo, albúmina. La unión puede ser directa o a través de una región bisagra. Ejemplos de la región bisagra incluyen etiquetas FLAG en tándem. Tal molécula puede ser producida ligando un gen que codifique cada una y como una sola proteína recombinante mediante un método convencional.

20 En los Ejemplos de la presente invención mencionados más abajo, ratones con AIM bloqueado presentaron una aparición provocada de enfermedades hepáticas en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa en comparación con la del ratón de referencia (WT). En particular, las enfermedades hepáticas son similares a la patología de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), y se confirmó que era reproducible el avance a cirrosis y cáncer hepatocelular, que son las características de la enfermedad. Por los AIM anteriores, se sugiere un fármaco que induce la expresión del AIM o un fármaco que estabiliza el AIM, o un compuesto capaz de sustituir la función del AIM, que puede ser buscado mediante el método de detección mencionado posteriormente, para prevenir la aparición y el avance de enfermedades hepáticas y para tratar enfermedades hepáticas.

30 Las enfermedades hepáticas que han de ser la diana de aplicación de la composición farmacéutica de la presente invención que comprende AIM, un fármaco que induce la expresión de AIM o un fármaco que estabiliza el AIM son: hígado graso, EHNA, cirrosis y cáncer hepático. En otro aspecto, las enfermedades hepáticas que han de ser la diana de aplicación de la composición farmacéutica de la presente divulgación que comprende AIM, un fármaco que induce la expresión de AIM o un fármaco que estabiliza el AIM son, por ejemplo, enfermedades hepáticas asociadas con la activación de las células estrelladas hepáticas. Un índice de la activación de las células estrelladas hepáticas es, por ejemplo, la expresión del ARNm de la α SMA (α -actina de músculo liso). Por lo tanto, la enfermedad hepática puede ser una enfermedad hepática en la que el ARNm de la α SMA esté expresado de forma significativamente más elevada que en los tejidos hepáticos normales. En otro aspecto adicional, la enfermedad hepática puede ser una enfermedad hepática en la que el TGF β 1 o colágeno 4A1 esté expresado de forma significativamente más elevada que en los tejidos hepáticos normales.

40 En la composición farmacéutica de la presente divulgación que comprende AIM, un fármaco que induce la expresión de AIM o un fármaco que estabiliza el AIM es de baja toxicidad, y puede ser administrado como líquido tal cual, o como una forma posológica apropiada de composición farmacéutica, a seres humanos u otros mamíferos de sangre caliente (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas, cerdos, bóvidos, gatos, perros, monos y similares) oral o parenteralmente (por ejemplo, administración intravascular, administración subcutánea y similares).

45 Como ejemplos de la composición para la administración parenteral, se usan inyecciones, supositorios y similares; las inyecciones pueden incluir formas posológicas tales como inyecciones intravenosas, inyecciones subcutáneas, inyecciones intracutáneas, inyecciones intramusculares e inyecciones de perfusión por goteo. Tal inyección puede ser preparada según un método de conocimiento público. Se puede preparar una inyección, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando los AIM anteriormente descritos, un fármaco que induzca la expresión del AIM o un fármaco que estabilice el AIM de la presente invención en una solución estéril acuosa u oleosa en uso común para inyecciones. Como ejemplos de soluciones acuosas para inyección, pueden usarse suero fisiológico, una solución isotónica que comprenda glucosa u otro fármaco auxiliar, y similares, los cuales pueden ser usados en combinación con un solubilizante apropiado; por ejemplo, alcohol (por ejemplo, etanol), polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no tóxico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (polioxitileno (50 mol) aducto de aceite de ricino hidrogenado)] y similares. Como ejemplos de soluciones oleosas, pueden usarse aceite de ajonjolí, aceite de soja y similares, los cuales pueden ser usados en combinación con benzoato bencílico, alcohol bencílico y similares como solubilizantes. La solución preparada para la inyección se carga preferentemente en una ampolla apropiada. Pueden prepararse supositorios usados para la administración rectal mezclando los AIM anteriormente descritos, un fármaco que induzca la expresión del AIM o un fármaco que estabilice el AIM de la presente invención con una base ordinaria de supositorio.

60 Como composición para la administración oral, pueden mencionarse formas posológicas sólidas o líquidas, específicamente comprimidos (incluyendo comprimidos recubiertos de azúcar y comprimidos recubiertos con

película), píldoras, gránulos, polvos, cápsula (incluyendo cápsulas blandas), jarabes, emulsiones, suspensiones y similares. Tal composición es producida mediante un método de conocimiento público, y puede comprender un vehículo, diluyente o excipiente en uso común en el campo de la fabricación farmacéutica. Como ejemplos del vehículo o excipiente para comprimidos, pueden usarse lactosa, almidón, sacarosa, estearato de magnesio y similares.

La composición farmacéutica anteriormente mencionada para la administración parenteral u oral es convenientemente preparada en una forma posológica medicamentosa unitaria adecuada para la dosificación del ingrediente activo. Como ejemplos de tal forma posológica medicamentosa unitaria, pueden mencionarse comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas) y supositorios. Es preferible que los AIM anteriormente mencionados, un fármaco que induzca la expresión del AIM o un fármaco que estabilice el AIM de la presente invención estén contenidos, por ejemplo, normalmente a razón de entre 5 y 500 mg, en particular a entre 5 y 100 mg para inyecciones, o a entre 10 y 250 mg para otras formas posológicas, por cada forma posológica medicamentosa unitaria.

Aunque la dosis del agente profiláctico o terapéutico de la presente invención anteriormente mencionado que comprende AIM, de un fármaco que induce la expresión del AIM o de un fármaco que estabiliza el AIM varía dependiendo del sujeto de administración, de la enfermedad diana, de los síntomas, de la vía de administración y similares —por ejemplo, cuando el agente se usa para el tratamiento o la prevención de enfermedades hepáticas en un adulto—, es conveniente administrar los AIM de la presente invención habitualmente a razón de entre aproximadamente 0,01 y 20 mg/kg de peso corporal, preferentemente de entre aproximadamente 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal, y más preferentemente de entre aproximadamente 0,1 y 5 mg/kg de peso corporal, en función de una única dosis, aproximadamente de 1 a 5 veces al día, preferentemente de aproximadamente 1 a 3 veces al día, mediante inyección intravenosa. En el caso de otros modos de la administración parenteral y la administración oral, pueden administrarse dosis similares. En caso de que el síntoma sea particularmente severo, la dosis puede ser aumentada según el síntoma.

Cada una de las composiciones anteriormente mencionadas puede comprender otros ingredientes activos cualesquiera que no produzcan una interacción no deseada cuando se formulan con los AIM anteriormente mencionados, un fármaco que induzca la expresión del AIM o un fármaco que estabilice el AIM.

Además, los AIM, el fármaco que induce la expresión del AIM o el fármaco que estabiliza el AIM de la presente invención pueden ser usados en combinación con otros fármacos útiles para el tratamiento de enfermedades hepáticas, tales como sensibilizadores a la insulina (por ejemplo, derivados de la tiazolidina, tales como rosiglitazona, pioglitazona y similares), y similares, biguanidas tales como metformina, buformina y similares); antioxidantes (por ejemplo, vitamina E, vitamina C, betaína, EPL (polienofosfatidilcolina) etc.); agentes de soporte hepático (por ejemplo, ácido ursodesoxicólico (UDCA) etc.); agentes antihiperlipidémicos (por ejemplo, fármacos de fibratos, probucol, fármacos de estatina, etc.); depresores (por ejemplo, antagonistas de los receptores de angiotensina II, etc.); una preparación de glicirricina; hierbas medicinales chinas (por ejemplo, *shosaikoto*, etc.); agentes anticancerosos y similares. Los AIM, el fármaco que induce la expresión del AIM o el fármaco que estabiliza el AIM aquí dados a conocer y los fármacos anteriormente descritos pueden ser administrados al paciente una sola vez o en diferentes ocasiones.

Según se ha mencionado anteriormente, se confirmó que un ratón con AIM bloqueado desarrolla con muchísima frecuencia enfermedades hepáticas similares a la patología de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa, en comparación con un ratón de referencia, y que, además, avanza a cirrosis y cáncer hepatocelular. Esto sugiere que se puede proporcionar el ratón con AIM bloqueado en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa como nuevo ratón modelo de enfermedades hepáticas. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de detección para un agente para la profilaxis o tratamiento de enfermedades hepáticas, que usa un animal obtenido cebando a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM con una dieta rica en grasa.

Mamífero no humano deficiente en expresión AIM significa un mamífero no humano que tiene inactivada en su interior la expresión del AIM endógeno, incluyendo animales con AIM KO preparados a partir de una célula ES que tiene bloqueado (KO) en su interior el AIM, así como animales génicamente silenciados (KD) que tienen inactivada en los mismos la expresión del AIM mediante tecnología antisentido o iARN, y similares. Aquí, “bloqueado (KO)” significa que se impide la producción de ARNm completo al destruir o eliminar el gen endógeno, mientras que “silenciado génicamente (KD)” significa que la traducción de ARNm a proteína es inhibida para inactivar la expresión del gen endógeno. En lo sucesivo, el animal con AIM KO/KD de la presente invención es denominado a veces sencillamente como “el animal KO/KD de la presente invención”. El animal con AIM KO de la presente invención es divulgado en Miyazaki T. et al. (*J. Exp. Med.*, 189, 413-422, 1999).

“Un mamífero no humano” que pueda ser un sujeto de la presente invención no está limitado en particular, siempre y cuando sea un mamífero no humano para el cual se haya establecido un sistema transgénico; ejemplos incluyen ratones, ratas, bóvidos, monos, cerdos, ovejas, cabras, conejos, perros, gatos, cobayas, hámsteres, ratas, ratones y similares. Son preferibles conejos, perros, gatos, cobayas, hámsteres y similares; en particular, desde el punto de vista de la preparación de animales modelo de la enfermedad, los roedores, que tienen periodos de ontogenia y

ciclos vitales relativamente cortos y que son de fácil propagación, son más preferibles; en particular, son preferibles los ratones (por ejemplo, la cepa C57BL/6, la cepa BALB/c, la cepa DBA2 y similares como cepas puras; la cepa B6C3F₁, la cepa BDF₁, la cepa B6D2F₁, la cepa ICR y similares como cepas híbridas) y las ratas (por ejemplo, Wistar, SD y similares).

- 5 Además de mamíferos, pueden usarse aves tales como pollos con el mismo fin que el de los “mamíferos no humanos” que son sujetos de la presente invención.

En Miyazaki T. et al. (*J. Exp. Med.*, 189, 413-422, 1999), mencionado anteriormente, se da a conocer un medio específico para bloquear el AIM. Como otros métodos generales conocidos, se puede usar preferentemente un método que comprende aislar el AIM (ADN genómico) derivado del mamífero sujeto no humano mediante un método convencional, e integrar una cadena de ADN que tiene una secuencia de ADN construida para inactivar en consecuencia el gen, por ejemplo, (1) destruyendo la función del exón o del promotor insertando otro fragmento de ADN (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos, un gen indicador y similares) en la porción del exón o la región del promotor, o (2) cortando la totalidad o una porción del AIM usando el sistema Cre-loxP o el sistema Flp-frt para delecionar el gen, o (3) insertando un codón de parada en la región de codificación de proteína para impedir la traducción a una proteína completa, o (4) insertando una secuencia de ADN que detiene la transcripción del gen (por ejemplo, una señal de adición de poliA y similares) en la región de transcripción para impedir la síntesis del ARNm completo (abreviado en lo sucesivo como vector de acceso), en el locus del gen AIM del mamífero sujeto no humano mediante recombinación homóloga, y similares.

El recombinante homólogo puede ser obtenido, por ejemplo, introduciendo vector de acceso anteriormente descrito en una célula madre embrionaria (célula ES).

Célula ES se refiere a una célula derivada de una masa celular interna (ICM) de un óvulo fertilizado en la fase de blastocisto, y puede ser cultivada y mantenida *in vitro* mientras se mantiene el estado indiferenciado. Las células de la ICM están destinadas a formar el cuerpo del embrión, siendo células madre en las que están basados todos los tejidos, incluidas las células germinales. La célula ES usada puede ser de una línea celular establecida, o de una línea celular recién establecida según el método de Evans y Kaufman (*Nature*, vol. 292, p. 154, 1981). Por ejemplo, en el caso de células ES murinas, actualmente se usan generalmente células ES derivadas de una cepa murina 129, pero el antecedente inmunológico de la misma es poco claro; en vez de ello, con fines de obtener células ES de una cepa pura con antecedentes genéticos inmunológicamente claros y similares, también puede usarse de forma adecuada una célula ES establecida a partir de un ratón C57BL/6 o a partir de un ratón BDF₁ (F₁ de C57BL/6 y DBA/2), en la que el pequeño número de óvulos retirables del C57BL/6 se ha mejorado mediante cruce con el DBA/2, y similares. Además de ser ventajosos, porque el número de óvulos retirables es elevado, y porque los óvulos son robustos, los ratones BDF₁ tienen al ratón C57BL/6 como antecedente de los mismos; por lo tanto, las células ES derivadas de los mismos pueden ser usadas ventajosamente porque, cuando se prepara un ratón modelo de enfermedad, los antecedentes genéticos pueden ser sustituidos con los del ratón C57BL/6 por cruzamiento retrógrado con un ratón C57BL/6. Las células ES pueden ser diferenciados en una amplia variedad de tipos de célula, incluyendo el músculo parietal, los músculos viscerales y el músculo cardíaco, mediante un cultivo monocapa hasta que alcancen una alta densidad, o mediante un cultivo en suspensión hasta la formación de agregados celulares, en condiciones apropiadas [M. J. Evans y M. H. Kaufman, *Nature* vol. 292, p. 154, 1981; G. R. Martin, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)*, vol. 78, p. 7634, 1981; T. C. Doetschman et al., *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, vol. 87, p. 27, 1985]; la célula de un mamífero no humano deficiente en expresión AIM, que es obtenida diferenciando una célula ES incorporando un vector de acceso, es útil en investigaciones biológicas celulares de AIM *in vitro*.

Por ejemplo, si un vector de acceso está diseñado para destruir la función de un exón o un promotor insertando otro fragmento de ADN en la porción del exón o en la región del promotor del gen AIM, el vector puede adoptar, por ejemplo, la constitución mostrada a continuación.

En primer lugar, para garantizar que se inserta otro fragmento de ADN en la porción del exón o el promotor del AIM por recombinación homóloga, es preciso que el vector de acceso comprenda secuencias homólogas a los respectivos sitios diana (brazo 5' y brazo 3') corriente arriba del 5' y corriente abajo del 3' del otro fragmento de ADN.

Aunque el otro fragmento de ADN insertado no está limitado en particular, es posible seleccionar como índice células ES que tengan un vector de acceso integrado en un cromosoma del mismo con resistencia a fármacos o actividad indicadora, usando un gen de resistencia a fármacos o un gen indicador. Aquí, ejemplos del gen con resistencia a fármacos y ejemplos del gen indicador incluyen, sin limitación, el gen neomicina fosfotransferasa II (nptII), el gen higromicina fosfotransferasa (hpt) y similares, y el gen β-galactosidasa (lacZ), el gen cloranfenicol acetiltransferasa (cat) y similares, respectivamente.

El gen de resistencia a fármacos o el indicador está, preferentemente, bajo el control de un promotor escogido opcionalmente capaz de funcionar en células de mamíferos. Por ejemplo, pueden mencionarse promotores virales tales como el promotor temprano SV40, la repetición terminal larga (LTR) del citomegalovirus (CMV), la LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), la LTR del virus de la leucemia murina (MoMuLV), y el promotor temprano derivado del adenovirus (AdV), y promotores de los genes de proteínas constitutivas de mamíferos, tales como el

promotor del gen β -actina, el promotor del gen PGK y el promotor del gen transferrina y similares. Sin embargo, si el gen de resistencia a fármacos o el indicador se inserta en el AIM para que esté puesto bajo el control de un promotor endógeno del AIM, no es preciso que haya presente en el vector de acceso un promotor que controle la transcripción del gen.

- 5 Preferentemente, el vector de acceso tiene una secuencia que termina la transcripción del ARNm procedente del gen (señal de poliadenilación (poliA), también llamada terminadora) corriente abajo del gen de resistencia a fármacos o del gen indicador; por ejemplo, pueden usarse secuencias terminadoras derivadas de genes de virus, o de diversos genes de mamíferos o aves. Preferentemente, pueden usarse un terminador SV40 y similares.

10 Habitualmente, la recombinación génica en un mamífero se produce fundamentalmente de forma no homóloga; el ADN introducido es insertado de forma aleatoria en una posición escogida opcionalmente en el cromosoma. Por lo tanto, no es posible seleccionar con eficacia únicamente los clones dirigidos al AIM endógeno objeto de acceso por recombinación homóloga por selección en función de la detección de la expresión de un gen de resistencia a fármacos o uno indicador y similares (selección positiva); es necesario confirmar el sitio de integración mediante hibridación Southern o PCR para todos los clones seleccionados. Por ende, siempre y cuando que, por ejemplo, el gen de la timidina quinasa (HSV-tk) derivado del virus del herpes simple, que confiere susceptibilidad al ganciclovir, se una fuera de la región homóloga a la secuencia diana del vector de acceso, no pudiendo las células que tienen el vector insertado aleatoriamente en las mismas desarrollarse en un caldo que comprenda ganciclovir, porque tienen el gen HSV-tk, mientras que las células dirigidas al locus del AIM endógeno por recombinación homóloga se vuelven resistentes al ganciclovir y son seleccionadas porque no tienen el gen HSV-tk (selección negativa). Alternativamente, siempre y cuando el gen toxina de la difteria, por ejemplo, se una en lugar del gen HSV-tk, las células que tienen el vector insertado aleatoriamente a las mismas mueren debido a la toxina producida por ellas mismas, por lo que también puede seleccionarse un recombinante homólogo en ausencia de un fármaco.

25 Aunque para la introducción del vector de acceso en células ES puede usarse cualquiera entre el método de coprecipitación de fosfato cálcico, el método de electroporación, el método de lipofección, el método de infección por retrovirus, el método de agregación, el método de microinyección, el método del cañón génico (cañón de partículas), el método DEAE-dextrano y similares, generalmente se eligen el método de electroporación debido a la facilidad de tratamiento de un gran número de células y similares, dado que la recombinación génica en un mamífero se produce fundamentalmente de forma no homóloga, por lo que la frecuencia de obtención de recombinantes homólogos es baja, según se ha descrito anteriormente. Para la electroporación, pueden usarse tal cual las condiciones ordinarias usadas para la transfección en células animales; por ejemplo, la electroporación puede ser llevada a cabo tripsinizando células ES en la fase de crecimiento logarítmico para dispersarlas como células individuales, suspendiendo las células en un caldo para obtener una densidad entre 10^6 y 10^8 células/ml, transfiriendo las células a una cubeta, añadiendo de 10 a 100 μ g de un vector de acceso, y aplicando un impulso eléctrico de 200 a 600 V/cm.

35 Las células ES que tienen el vector de acceso integrado en las mismas pueden ser determinadas seleccionando ADN cromosómico separado y extraído de una colonia obtenida cultivando las células individuales sobre fibroblastos, mediante hibridación Southern o PCR; si se usa un gen de resistencia a los fármacos o un gen indicador como el otro fragmento de ADN, es posible seleccionar un transformante en la fase celular con la expresión del mismo como índice. Por ejemplo, si se usa un vector que comprenda el gen nptII como gen marcador para la selección positiva, se cultivan células ES, después del tratamiento de transfección, en un caldo que comprende un antibiótico de la serie de la neomicina, tal como el G418, y se selecciona la colonia resultante como candidata para un transformante. Si se usa un vector que comprenda el gen HSV-tk como gen marcador para la selección negativa, se cultivan células ES en un caldo que comprende ganciclovir, y se selecciona la colonia resultante como candidata para un recombinante homólogo. Las colonias obtenidas son transferidas a respectivas placas de cultivo, y se repiten la tripsinización y los intercambios de caldo, después de lo cual se reserva una porción para cultivo, y el resto es sometido a PCR o hibridación Southern para confirmar la presencia del ADN introducido.

40 Cuando una célula ES que se confirma que tiene el ADN introducido integrado en la misma es devuelta a un embrión derivado de un mamífero no humano de la misma especie, la célula ES se integra en la ICM del embrión anfitrión formando un embrión quimérico. Este es trasplantado a una madre receptora (hembra receptora del embrión) y se le permite que siga su desarrollo, con lo que se obtiene un animal KO quimérico. Si la célula ES contribuye a la formación de una célula germinal primordial que se diferenciará en un óvulo o un espermatozoo en el animal quimérico, se obtendrá una quimera de línea germinal; apareando esta, puede prepararse un animal KO que tenga deficiencia en la expresión del AIM mantenido genéticamente en el mismo.

55 Para preparar un embrión quimérico, hay un método en el que los embriones tempranos hasta la fase de mórula se adhieren y agregan entre sí (método de la quimera de agregación), y un método en el que una célula es microinyectada en una cavidad de blastocelo de un blastocisto (método de la quimera de inyección). Aunque este se ha llevado a cabo tradicionalmente de forma generalizada en la preparación de un embrión quimérico usando una célula ES, recientemente se han plasmado un método en el que se crea una quimera de agregación inyectando una célula ES en la zona pelúcida de un embrión en la fase de 8 células, y un método en el que se crea una quimera de agregación cocultivando y agregando una masa de una célula ES y un embrión en la fase de 8 células carente de la zona pelúcida, como un método que no requiere un micromanipulador y que puede ser realizado fácilmente.

En todos los casos, puede recogerse de la misma manera un embrión anfitrión de un mamífero no humano que pueda ser usado como una hembra para la recogida de óvulos en la transfección en un óvulo fertilizado, según se menciona posteriormente; por ejemplo, en el caso de un ratón, para hacer posible determinar la contribución porcentual de las células ES a la formación de un ratón quimérico por el color del pelaje, es preferible que el embrión anfitrión sea recogido de un ratón de una cepa que presente un color de pelaje diferente del de la cepa de la que se deriva la célula ES. Por ejemplo, en el caso de una célula ES derivada de una cepa murina 129 (color del pelaje: agutí), se usa un ratón C57BL/6 (color del pelaje: negro) o un ratón ICR (color del pelaje: albino) como hembra para la recogida de óvulos; en el caso de una célula ES derivada de un ratón C57BL/6 o DBF₁ (color del pelaje: negro) o de una célula TT2 (derivada del F₁ (color del pelaje: agutí) de C57BL/6 y CBA), puede usarse un ratón ICR o un ratón BALB/c (color del pelaje: albino) como hembra para la recogida de óvulos.

Dado que la capacidad de formación de quimeras de línea germinal depende en gran medida de la combinación de una célula ES y un embrión anfitrión, es más preferible que se escoja una combinación que presente una capacidad elevada de formación de quimeras de línea germinal. Por ejemplo, en el caso de un ratón, es preferible usar un embrión anfitrión derivado de la cepa C57BL/6 y similares para células ES derivadas de la cepa 129, y usar un embrión anfitrión derivado de la cepa BALB/c y similares para células ES derivadas de la cepa C57BL/6.

Es preferible que el ratón hembra para la recogida de óvulos tenga de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 semanas de edad, y que el ratón macho para el apareamiento sea de la misma cepa entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 meses de edad. Aunque el apareamiento puede ser por cópula natural, se lleva a cabo preferentemente después de administrar hormonas gonadotrópicas (hormona de estimulación del folículo, luego hormona luteinizante) para inducir sobreovulación.

En el caso del método de inyección en blastocistos, se recoge un embrión blastocístico (por ejemplo, en el caso de un ratón, aproximadamente 3,5 días después del apareamiento) del útero de una hembra para la recogida de óvulos (o puede cultivarse un embrión temprano en la fase de mórula o anterior, después de ser recogido del oviducto, en un caldo (mencionado posteriormente) para el cultivo de embriones hasta la fase de blastocisto), y células ES (de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 células) que tienen un vector de acceso introducido en las mismas son inyectadas en una cavidad de blastocele del blastocisto usando un micromanipulador, después de lo cual los embriones son trasplantados al útero de una hembra de mamífero no humano pseudopreñada receptora del embrión. Como hembra de mamífero no humano receptora del embrión, puede usarse de la misma manera un mamífero no humano como hembra receptora del embrión en la transfección a un óvulo fertilizado.

En el caso del método del cocultivo, se recogen embriones en la fase de 8 células y mórulas (por ejemplo, en el caso de un ratón, aproximadamente 2,5 días después del apareamiento) del oviducto y el útero de una hembra para la recogida de óvulos (o puede cultivarse un embrión temprano en la fase de 8 células o anterior, después de ser recogido del oviducto, en un caldo (mencionado posteriormente) para el cultivo de embriones hasta la fase de 8 células o la fase de mórula), y la zona pelúcida es lisada en solución ácida de Tyrode, después de lo cual una masa de una célula ES que incorpora un vector de acceso (número de células: de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 células) es colocada en una microgota de un caldo para el cultivo de embriones recubiertos con aceite mineral, es colocado también el embrión en la fase de 8 células anteriormente descrito o la mórula (preferentemente, 2 embriones), y son cultivados de un día para otro. El blastocisto o mórula obtenido es trasplantado al útero de una hembra de mamífero no humano receptora del embrión, según se ha descrito anteriormente.

Si el embrión trasplantado se implanta con éxito y la hembra receptora del embrión queda preñada, se obtendrán crías de mamífero quimérico no humano mediante parto natural o cesárea. A las hembras receptoras de embriones que han parido espontáneamente se les permite que sigan amamantando; si las crías nacen por cesárea, las crías pueden ser amamantadas por una hembra proporcionada por separado para amamantar (una hembra de mamífero no humano con apareamiento y parto habituales).

Para la selección de una quimera de línea germinal, si ya se ha determinado el sexo de la célula ES, se selecciona en primer lugar un ratón quimérico del mismo sexo que la célula ES (habitualmente, se escoge un ratón quimérico macho, dado que se usa una célula ES macho), y luego se selecciona un ratón quimérico que presenta una elevada tasa de contribución de células ES (por ejemplo, el 50% o más) en función de fenotipos tales como el color del pelaje. Por ejemplo, en el caso de un ratón quimérico obtenido de un embrión quimérico entre una célula D3 —que es una célula ES macho derivada de la cepa murina 129— y un embrión anfitrión derivado de un ratón C57BL/6, es preferible que se seleccione un ratón macho que presente un elevado porcentaje del color de pelaje agutí. Que el mamífero quimérico no humano seleccionado sea o no una quimera de línea germinal puede determinarse en función de los fenotipos del animal F₁ obtenido mediante cruce con una cepa apropiada de la misma especie animal. Por ejemplo, en el caso del ratón quimérico anteriormente descrito, el agutí es dominante sobre el negro; por lo tanto, cuando el ratón macho es cruzado con un ratón hembra C57BL/6, el color del pelaje del F₁ obtenido es agutí si el ratón macho seleccionado es una quimera de línea germinal.

El mamífero no humano quimérico de línea general así obtenido que incorpora un vector de acceso (fundador) suele obtenerse como un heterocigoto que tiene el AIM bloqueado solo en uno cualquiera de los dos cromosomas homólogos. Para obtener un homocigoto que tiene el AIM bloqueado en ambos cromosomas homólogos de los

animales F₁ obtenidos según se ha descrito anteriormente, pueden cruzarse hermanos de heterocigotos. La selección de heterocigotos puede determinarse, por ejemplo, seleccionando, mediante hibridación Southern o PCR, ADN cromosómicos separados y extraídos de la cola de un animal F₁. La cuarta parte de los animales F₂ obtenidos serán homocigotos.

5 En otra realización preferente con el uso de un virus como vector de acceso, puede mencionarse un método que comprende la infección de una célula ES de un mamífero no humano con un virus que comprende un ADN que comprende un gen marcador para la selección positiva insertado entre los brazos 5' y 3', y un gen marcador para la selección negativa fuera de los brazos (véase, por ejemplo, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), vol. 99, n° 4, pp. 2140-2145, 2002). Por ejemplo, cuando se usa un retrovirus o un
10 lentivirus, se siembran células en un medio de incubación apropiado, tal como una placa de cultivo, se añade un vector viral al caldo de cultivo (si se desea, también puede haber presente polibreno), las células son cultivadas de 1 a 2 días, después de lo cual el cultivo continúa según se ha descrito anteriormente, y se seleccionan las células que tienen el vector integrado en las mismas.

15 En cuando a medios específicos para bloquear el AIM, puede mencionarse un método que comprende introducir un ADN que codifica un ARN o ARNip antisentido (incluido el ARNhc) de AIM usando técnicas de preparación de animales transgénicos conocidas independientemente, y permitirlo en la célula del mamífero sujeto no humano y similares.

20 Se puede decir que un ADN que comprende una secuencia de bases complementaria con respecto a la región diana de un polinucleótido deseado —es decir, un ADN hibridable con un polinucleótido deseado— es “antisentido” contra el polinucleótido deseado.

25 El ADN antisentido que tiene una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria con respecto a la secuencia de bases de un polinucleótido que codifique el AIM o una porción del mismo puede ser cualquier ADN antisentido, siempre y cuando comprenda una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria con respecto a la secuencia de bases del polinucleótido que codifica el AIM o una porción del mismo, y que tenga una acción que suprima la expresión del polinucleótido.

30 La secuencia de bases sustancialmente complementaria con respecto a un polinucleótido que codifique el AIM es, por ejemplo, una secuencia de bases que tiene una homología de aproximadamente el 70% o más, preferentemente de aproximadamente el 80% o más, más preferentemente de aproximadamente el 90% o más, siendo lo más preferible de aproximadamente el 95% o más, con respecto a la secuencia de bases de la cadena complementaria del polinucleótido para la región de superposición. En la presente memoria, la homología de secuencias de bases puede ser calculada, por ejemplo, usando el algoritmo de cálculo de la homología NCBI BLAST (National Center for
35 Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool, herramienta básica de búsqueda de alineamiento local del Centro Nacional Estadounidense de Información Biotecnológica) en las condiciones siguientes: expectativa=10; huecos permitidos; filtrado=ACTIVADO; puntuación de coincidencia=1; puntuación de discrepancia=-3.

40 En particular, de toda la secuencia de bases de la cadena complementaria del polinucleótido que codifica el AIM, (a) en el caso de un ADN antisentido previsto para inhibir la traducción, es adecuado un ADN antisentido que tiene una homología de aproximadamente el 70% o más, preferentemente de aproximadamente el 80% o más, más preferentemente de aproximadamente el 90% o más, siendo lo más preferible de aproximadamente el 95% o más, con respecto a la cadena complementaria de la secuencia de bases de la porción que codifica la parte N-terminal del AIM (por ejemplo, una secuencia de bases en las inmediaciones del codón de iniciación y similares), y (b) en el caso de un ADN antisentido previsto para degrada ARN con RNasaH, es adecuado un ADN antisentido que tiene una homología de aproximadamente el 70% o más, preferentemente de aproximadamente el 80% o más, más preferentemente de aproximadamente el 90% o más, siendo lo más preferible de aproximadamente el 95% o más,
45 con respecto a la cadena complementaria de toda la secuencia de bases del polinucleótido que codifica el AIM, incluido el intrón.

50 Específicamente, cuando el mamífero sujeto no humano es un ratón, pueden mencionarse un ADN antisentido que comprende una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria con respecto a la secuencia de bases registrado en GenBank con el n° de entrada AF011428 o una porción del mismo, preferentemente un ADN antisentido que comprenda una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases o de una porción de la misma, y similares.

55 Un ADN antisentido que tenga una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria de la secuencia de bases de un polinucleótido que codifique el AIM o una porción del mismo (también denominado en lo sucesivo “el ADN antisentido de la presente invención”) puede ser diseñado y sintetizado en función de la información de la secuencia de bases de un ADN que codifique un AIM clonado o determinado. Tal ADN antisentido es capaz de inhibir la duplicación o la expresión del AIM. Específicamente, el ADN antisentido de la presente invención es capaz de hibridarse con un ARN transcrito a partir del AIM (ARNm o producto de transcripción inicial) y capaz de inhibir la síntesis (el procesamiento) o la función (traducción a proteína) del ARNm.

La región diana del ADN antisentido de la presente invención no está limitada en particular con respecto a la longitud de la misma, siempre y cuando la traducción a AIM sea inhibida como consecuencia de la hibridación del ADN antisentido; la región diana puede ser toda la secuencia o una secuencia parcial del ARNm que codifica la proteína, y la longitud es aproximadamente de 10 bases para la más corta, y toda la secuencia del ARNm o del producto de transcripción inicial para la más larga. Específicamente, la horquilla del terminal 5', las repeticiones de 6 pares base del terminal 5', la región no traducida del terminal 5', el codón de iniciación de traducción, la región codificante de proteínas, el codón de parada de traducción del ORF, la región no traducida del terminal 3', la región palindrómica del terminal 3' o la horquilla del terminal 3' del AIM pueden ser elegidos como región diana preferible del ADN antisentido, pero también puede escogerse como diana cualquier otra región en el gen AIM. Por ejemplo, la porción del intrón del gen también puede ser la región diana.

Además, el ADN antisentido de la presente invención puede ser uno que no se hibride con el ARNm o el producto de transcripción inicial del AIM para inhibir la traducción a proteína, pero que también sea capaz de unirse al AIM que sea un ADN bicatenario para formar una cadena triple (tríplex) y, por ende, inhibir la transcripción a ARN. Alternativamente, el ADN antisentido de la presente invención puede ser uno que forme un híbrido ADN:ARN para inducir la degradación por RNasaH.

El ADN antisentido de la presente invención también puede englobar un ADN que codifique una ribozima capaz de escindir específicamente el ARNm que codifica el AIM o el producto de transcripción inicial dentro de una región de codificación (incluyendo la porción del intrón en el caso del producto de transcripción inicial). Una de las ribozimas más versátiles es un ARN de autoempalme encontrado en ARN infecciosos, tales como el viroide y el virusoide, y se conocen el de tipo cabeza de martillo, el de tipo horquilla y similares. El de tipo cabeza de martillo presenta actividad enzimática con aproximadamente 40 bases de longitud, y es posible escindir específicamente el ARNm diana convirtiendo varias bases en ambos terminales flanqueantes de la porción con estructura en cabeza de martillo (aproximadamente 10 bases en total) en una secuencia complementaria del sitio deseado de escisión del ARNm. Debido a que este tipo de ribozima tiene únicamente ARN como sustrato, ofrece la ventaja adicional de la falta de ataque del ADN genómico. Siempre y cuando el ARNm del AIM adopte una estructura bicatenaria por sí solo, puede hacerse que la secuencia diana sea monocatenaria usando una ribozima híbrida preparada uniendo un motivo de ARN derivado de un ácido nucleico viral que pueda unirse específicamente a una ARN helicasa [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(10): 5572-5577 (2001)]. Además, la ribozima puede ser una ribozima híbrida preparada uniendo, además, una secuencia modificada del ARNt para promover el traslado al citoplasma del producto de transcripción [*Nucleic Acids Res.*, 29(13): 2780-2788 (2001)].

Aquí, para preparar el animal KD de la presente invención, también puede usarse un ARN bicatenario consistente en un oligo-ARN homólogo a una secuencia parcial (incluyendo la porción de intrón en el caso del producto de transcripción inicial) en la región codificante del ARNm o del producto de transcripción inicial del AIM y una cadena complementaria del mismo, lo que se denomina ARN interferente monocatenario (ARNip). Se sabía que la denominada interferencia de ARN (iARN), que es un fenómeno por el cual, cuando se introduce ARNip en las células, se degrada un ARNm homólogo al ARN (ocurre en nematodos, insectos, plantas y similares); dado que se confirmó que este fenómeno también ocurre en células animales [*Nature*, 411(6836): 494-498 (2001)], el ARNip ha sido utilizado de forma generalizada como técnica alternativa a las ribozimas. El ARNip puede ser diseñado según resulte apropiado en función de la información de la secuencia de bases del ARNm que sea diana, usando un soporte lógico disponible comercialmente (por ejemplo, RNAi Designer; Invitrogen).

El oligo-ADN antisentido y la ribozima de la presente invención pueden ser preparados determinando la secuencia diana para el ARNm o el producto de transcripción inicial en función de una secuencia de ADNc o una secuencia de ADN genómico del AIM, y sintetizando una secuencia complementaria a las mismas usando un sintetizador de ADN/ARN disponible comercialmente (Applied Biosystems, Beckman, y similares). Insertando el oligo-ADN antisentido sintetizado o la ribozima corriente abajo del promotor en el vector de expresión, a través de una secuencia conectora (adaptadora) apropiada, usada como se requiera, puede prepararse un vector de expresión de ADN que codifique el oligo-ARN antisentido o la ribozima. Ejemplos de vectores de expresión que pueden ser usados preferentemente aquí incluyen plásmidos amplificados con *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o levadura, bacteriófagos tales como el fago λ , retrovirus tales como el virus de la leucemia de Moloney, virus de animales o de insectos, tales como lentivirus, virus adeno-asociados, *vaccinia virus* y *Baculoviridae*, y similares. En particular, son preferibles los plásmidos (preferentemente plásmidos provenientes de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, o levadura, en particular plásmidos de *Escherichia coli*) y virus animales (preferentemente, retrovirus, lentivirus). Ejemplos de promotores incluyen promotores virales tales como el promotor temprano SV40, la repetición terminal larga (LTR) del citomegalovirus (CMV), la LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), la LTR del virus de la leucemia murina (MoMuLV), y el promotor temprano derivado del adenovirus (AdV), y promotores de los genes de proteínas constitutivas de mamíferos, tales como el promotor del gen β -actina, el promotor del gen PGK y el promotor del gen transferina y similares.

Se puede preparar un vector de expresión de ADN que codifique un ARN antisentido más largo (por ejemplo, una cadena complementaria de longitud máxima del ARNm del AIM y similar) insertando un ADNc del AIM, clonado por un método convencional, en dirección inversa, mediante una secuencia conectora (adaptadora) apropiada, usada como se requiera, corriente abajo del promotor en el vector de expresión.

Por otro lado, puede prepararse un ADN que codifique un ARNip sintetizando por separado un ADN que codifique una cadena sentido y un ADN que codifique una cadena antisentido, e insertándolos en un vector de expresión adecuado. Como vector de expresión de ARNip, puede usarse uno que tenga un promotor del sistema Pol III, tal como U6 o H1. En este caso, en la célula animal que incorpora el vector, la cadena sentido y la cadena antisentido son transcritas y emparejadas para formar el ARNip. Puede prepararse ARNhc insertando una unidad que comprenda una cadena sentido y una cadena antisentido separadas por una base de longitud que permite la formación de una estructura apropiada en bucle (por ejemplo, de aproximadamente 15 a 25 bases) en un vector apropiado de expresión. Como vector de expresión del ARNhc, puede usarse uno que tenga un promotor del sistema Pol III, tal como U6 o H1. En este caso, el ARNhc transcrito en la célula animal que incorpora el vector de expresión forma un bucle por sí mismo, y luego es procesado por un dícer enzimático endógeno y similares para formar un ARNip maduro. Alternativamente, también es posible lograr un silenciamiento mediante iARN expresando un microARN (miARN) que comprende la secuencia de ARNip que es la diana usando un promotor de sistema Pol II. En este caso, mediante un promotor que presenta una expresión específica el tejido, también es posible un silenciamiento específico a un tejido.

Para introducir un vector de expresión que comprenda un ADN que codifique un ARN antisentido, un ARNip, un ARNhc o un miARN del AIM en una célula, se usa un método conocido independientemente, según resulte apropiado, según la célula diana. Por ejemplo, para la introducción en un embrión temprano, tal como un óvulo fertilizado, se usa el método de microinyección. Para la introducción en una célula ES, pueden usarse el método de coprecipitación de fosfato cálcico, el método de electroporación, el método de lipofección, el método de infección por retrovirus, el método de agregación, el método de microinyección, el método del cañón génico, el método DEAE-dextrano y similares. Alternativamente, cuando se usan como vector un retrovirus, un lentivirus y similares, a veces es posible lograr la transfección convenientemente añadiendo el virus a un embrión temprano o a una célula ES, y cultivar el embrión o la célula de 1 a 2 días para infectar las células con el virus. La regeneración de individuos a partir de una célula ES (establecimiento de fundadora), el paso (preparación de homocigotos) y similares pueden ser llevados a cabo según se ha descrito anteriormente con respecto al animal KO de la presente invención.

En una realización preferente, el vector de expresión que comprende un ADN que codifica un ARN antisentido, un ARNip, un ARNhc o un miARN del AIM es introducido mediante microinyección en un embrión temprano (óvulo fertilizado) de un mamífero no humano que es el sujeto.

La microinyección de ADN en el óvulo fertilizado puede ser llevada a cabo a través de un método convencional que use un dispositivo conocido de forma común, tal como un micromanipulador. Sucintamente, el óvulo fertilizado puesto en una microgota de un caldo para el cultivo de embriones es aspirado e inmovilizado usando una pipeta de sostén, y se inyecta una solución de ADN directamente en el pronúcleo masculino o femenino, preferentemente en el pronúcleo masculino, usando una pipeta de inyección. El ADN introducido es usado, preferentemente, después de ser muy purificado usando ultracentrifugación de gradiente de densidad de CsCl o una columna de resina de intercambio aniónico y similares. También es preferible que el ADN introducido sea linealizado de antemano cortando la porción vectorial usando una endonucleasa de restricción.

Después de introducir el ADN, el óvulo fertilizado es cultivado en un caldo para el cultivo de embriones en 5% de dióxido de carbono/95% de atmósfera mediante el método de cultivos por microgotas y similares de la etapa unicelular a la etapa de blastocisto, después de la cual es trasplantado al oviducto o el útero de una hembra de mamífero no humano para la recepción del embrión, dejándola pseudopreñada. La hembra de mamífero no humano para la recepción del embrión puede ser una cualquiera de la misma especie del animal del cual se derive el embrión temprano que haya de ser trasplantado; por ejemplo, cuando se trasplanta un embrión temprano de ratón, preferentemente se usan un ratón ICR hembra (preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 semanas de edad) y similares. Un método conocido de dejar pseudopreñada a una hembra de mamífero no humano para la recepción de un embrión es, por ejemplo, un método que comprende aparear a la hembra con un macho de mamífero no humano vasectomizado (vasoligado) de la misma especie (por ejemplo, en el caso de un ratón, con un ratón ICR macho (preferentemente de aproximadamente 2 meses o más de edad)), y seleccionar una hembra para la que esté confirmado que tiene un tapón vaginal.

La hembra para la recepción del embrión usada puede ser una que haya ovulado espontáneamente, o una que reciba la hormona liberadora de la hormona luteinizante (generalmente abreviada LHRH) o un análogo de la misma administrado antes del apareamiento con un macho vasectomizado (vasoligado) para inducir la fertilidad. Ejemplos de análogos de LHRH incluyen [3,5-Dil-Tyr⁵]-LH-RH, [Gln⁶]-LH-RH, [D-Ala⁶]-LH-RH, [des-Gly¹⁰]-LH-RH, [D-His(Bzl)⁶]-LH-RH y etilamidas de los mismos y similares. La cantidad administrada de LHRH o de un análogo de la misma, y el tempo de apareamiento con un macho de mamífero no humano después de la administración varían dependiendo de la especie del mamífero no humano. Por ejemplo, cuando el mamífero no humano es un ratón (preferentemente, un ratón ICR y similares), suele resultar preferible que la hembra de ratón se aparee con un ratón macho aproximadamente 4 días después de la administración de LHRH o de un análogo de la misma; la cantidad administrada de LHRH o de un análogo de la misma suele ser de aproximadamente 10 a 60 µg/individuo, preferentemente de aproximadamente 40 µg/individuo.

Habitualmente, si el embrión temprano que ha de ser trasplantado está en la etapa de mórula o posterior, el embrión es trasplantado al útero de una hembra para la recepción del embrión; si el embrión temprano está en una etapa

anterior a la etapa de mórula (por ejemplo, entre la etapa unicelular y la etapa de un embrión de 8 células), el embrión es trasplantado al oviducto. La hembra para la recepción del embrión es usada como se apropiado después de transcurso de un número dado de días después de quedar pseudopreñada, dependiendo de la etapa de desarrollo del embrión que ha de ser trasplantado. Por ejemplo, en el caso de un ratón, un ratón hembra aproximadamente 0,5 días después de quedar pseudopreñada es preferible para el trasplante de un embrión en la etapa de 2 células, y un ratón hembra aproximadamente 2,5 días después de quedar pseudopreñada es preferible para el trasplante de un embrión blastocístico. Después de que la hembra para la recepción del embrión es anestesiada (preferentemente, se usan Avertin, Nembutal y similares), se practica una incisión, se extrae un ovario, y se inyectan embriones tempranos (de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 embriones) en suspensión en un caldo para el cultivo de embriones en las inmediaciones del ostium abdominal del tubo uterino o de la unión de tubo uterino del cuerno uterino usando una pipeta para el trasplante de embriones.

Cuando el embrión trasplantado se implanta con éxito y la hembra receptora del embrión queda preñada, se obtendrán crías de mamífero quimérico no humano mediante parto natural o cesárea. A las hembras receptoras de embriones que han parido espontáneamente se les permite que sigan amamantando; cuando las crías nacen por cesárea, las crías pueden ser amamantadas por una hembra proporcionada por separado para amamantar (por ejemplo, en el caso del ratón, un ratón hembra con apareamiento y parto normales (preferentemente un ratón ICR hembra y similares)).

La transferencia del ADN que codifica un ARN antisentido, un ARNip, un ARNhc o un miARN del AIM en la etapa unicelular del óvulo fertilizado se fija para que el ADN introducido esté presente en todas las células de la línea germinal y las células somáticas del mamífero sujeto no humano. Que el ADN introducido se integre o no en el ADN cromosómico puede determinarse, por ejemplo, seleccionando, mediante hibridación Southern o PCR, ADN cromosómicos separados y extraídos de la cola de la cría. La presencia del vector de expresión en las células de la línea germinal de la prole del mamífero no humano (F_0) obtenida según se ha descrito anteriormente significa que el vector de expresión está presente en todas las células de la línea germinal y en las células somáticas de todos los animales de la generación subsiguiente (F_1).

Habitualmente, los animales F_0 son obtenidos como heterocigotos que tienen el ADN introducido en cualquiera de los dos cromosomas homólogos. Diferentes individuos F_0 tienen el ADN introducido insertado de forma aleatoria en cromosomas diferentes, a no ser que la inserción sea por recombinación homóloga. Para obtener un homocigoto que tenga el vector de expresión en ambos cromosomas homólogos, se cruzan un animal F_0 y un animal no transgénico para preparar un animal F_1 , y pueden cruzarse hermanos heterocigóticos de los mismos que tengan el ADN introducido en uno cualquiera de los dos cromosomas homólogos. Si el ADN introducido está integrado únicamente en un locus génico, 1/4 de los animales F_2 obtenidos serán homocigotos.

En otra realización preferente con el uso de un virus como vector, como con el caso anteriormente descrito de animales KO, puede mencionarse un método que comprende infectar un embrión temprano o una célula ES de un mamífero no humano con un virus que comprende un ADN que codifica un ARN antisentido, un ARNip, un ARNhc o un miARN del AIM. Cuando se usa como célula un óvulo fertilizado, es preferible eliminar la zona pelúcida antes de la infección. Después de un cultivo de 1 a 2 días tras la infección con el vector viral, el óvulo fertilizado es trasplantado al oviducto o al útero de una hembra de mamífero no humano para la recepción del embrión a la que se deja pseudopreñada según se ha descrito anteriormente en el caso de un embrión temprano, o se sigue cultivando el óvulo fertilizado con la adición de un fármaco de selección según se ha descrito anteriormente en el caso de una célula ES, y se selecciona una célula que incorpore el vector.

Además, según se describe en *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)*, vol. 98, pp. 13090-13095, 2001, se infecta una espermatogonia recogida de un macho de mamífero no humano con un vector viral durante el cocultivo con fibroblastos STO, después de lo cual la espermatogonia es inyectada en el tubo seminífero de un mamífero no humano macho infértil, y el mamífero no humano macho infértil es apareado con una hembra de mamífero no humano, con lo que pueden obtenerse eficientemente crías que son hétero-Tg (+/-) para un ADN que codifica un ARN antisentido, un ARNip, un ARNhc o un miARN del AIM.

El mamífero no humano deficiente en la expresión del gen AIM de la presente invención, que es descrito en Miyazaki T. et al. (*J. Exp. Med.*, 189, 413-422, 1999), u obtenido por el método anteriormente mencionado, tiene las siguientes características en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa:

- (1) el peso del hígado aumenta,
- (2) se promueve el hígado graso,
- (3) se desarrolla cáncer hepático, y/o
- (4) se suprime la respuesta inflamatoria en el hígado.

Además, el mamífero no humano deficiente en expresión AIM de la presente invención presenta de forma característica una promoción de la fibrosis hepática en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa, como los animales de referencia. Estos fenotipos no han sido documentados, al menos en ratones con AIM KO conocidos públicamente de manera convencional. En particular, los cambios del hígado graso a la fibrosis hepática al cáncer hepático son similares a la patología de EHNA, lo cual es un nuevo hallazgo.

- 5 (1) Que el peso del hígado aumente significa que el peso del hígado y/o que la proporción peso del hígado/peso corporal (%) se vuelven significativamente diferentes en el mamífero no humano deficiente en expresión AIM de la presente invención en comparación con animales de referencia mediante cebado con una dieta rica en grasa. En los Ejemplos mencionados posteriormente, se encontraron diferencias significativas en los ratones con AIM bloqueado a partir de la semana 6 de cebado con la dieta rica en grasa, en comparación con el ratón de referencia.
- 10 (2) Que se promueva el hígado graso significa que se observa una acumulación de grasa en el hígado del mamífero no humano deficiente en expresión AIM de la presente invención en una etapa temprana, en comparación con animales de referencia, cebándolos con una dieta rica en grasa. La acumulación de grasa en el hígado también puede ser confirmada, por ejemplo, tincionando una sección tisular hepática con rojo aceite O. Alternativamente, también puede ser confirmada midiendo la cantidad de grasa neutra en el tejido hepático. En los Ejemplos mencionados posteriormente, se encontraron diferencias significativas en los ratones con AIM bloqueado a partir de la semana 6 de cebado con la dieta rica en grasa, en comparación con el ratón de referencia.
- 15 (3) Que se desarrolle cáncer hepático significa que se observa la aparición de cáncer hepático en el mamífero no humano deficiente en expresión AIM de la presente invención cebándolo con una dieta rica en grasa. El cáncer hepático puede ser confirmado, por ejemplo, tincionando una sección tisular hepática con anti-AFP (α -fetoproteína), midiendo el nivel de expresión de la AFP en un tejido hepático, o midiendo la concentración de AFP en sangre. En los Ejemplos mencionados posteriormente, el cáncer hepático apenas pudo ser confirmado en ratones de referencia ni siquiera después de un año de cebado con una dieta rica en grasa, pero se halló cáncer hepático en todos los ratones con AIM bloqueado con un año de cebado con dieta rica en grasa.
- 20 (4) Que se suprima la respuesta inflamatoria en el hígado significa que se suprime una respuesta inflamatoria en el mamífero no humano deficiente en expresión AIM de la presente invención en comparación con animales de referencia, incluso cuando estaban cebados con una dieta rica en grasa. La respuesta inflamatoria puede ser confirmada por la expresión, por ejemplo, de F4/80 (marcador de macrófago), TNF α , IL-6 o IL-1 β . En los Ejemplos mencionados posteriormente, la inflamación del hígado fue suprimida significativamente en ratones con AIM bloqueado a partir de la semana 12 de cebado con dieta rica en grasa, en comparación con ratones de referencia.
- 25

30 Que se promueva la fibrosis hepática significa que se observa fibrosis hepática en el mamífero no humano deficiente en expresión AIM de la presente invención cebándolo con una dieta rica en grasa, como los animales de referencia. La fibrosis hepática puede ser confirmada, por ejemplo, tincionando una sección tisular hepática con rojo sirio. Aunque se sabe que la síntesis del colágeno debida a las células estrelladas hepáticas está implicada en la fibrosis hepática, también puede ser confirmada por la expresión de α SMA, que es un marcador de la célula estrellada hepática. También puede ser confirmada por la expresión de TGF β 1, colágeno 4A1 en el hígado. En los Ejemplos mencionados posteriormente, se observó fibrosis hepática en los ratones de referencia y en los ratones con AIM bloqueado a partir de la semana 20 de cebado con dieta rica en grasa. Además, se observó alta expresión de α SMA en los ratones de referencia y en los ratones con AIM bloqueado a partir de la semana 20 de cebado con dieta rica en grasa. El TGF β 1 tendió a presentar un aumento en el nivel de expresión en proporción con la duración del periodo de cebado con la dieta rica en grasa. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en el nivel de fibrosis ni el nivel de expresión de α SMA y TGF β 1 entre los ratones de referencia y en los ratones con AIM bloqueado.

35

40

Estos hallazgos indican que un mamífero no humano deficiente en expresión AIM puesto en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa es útil como modelo animal de enfermedades hepáticas, y que, además, puede ser usado para hacer una selección en busca de un fármaco profiláctico o terapéutico para enfermedades hepáticas. Específicamente, el método de detección de la presente invención comprende las siguientes etapas:

45

- (1) una etapa de administración, en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa, de una sustancia de prueba a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM,
- 50 (2) una etapa de observación de uno o más elementos cualesquiera de las siguientes propiedades del mamífero no humano deficiente en expresión AIM al que se administra la sustancia de prueba:
- (i) peso del hígado,
- (ii) cantidad de grasa en el hígado,
- 55 (iii) fibra en el hígado,
- (iv) cáncer hepático, y
- (v) respuesta inflamatoria en el hígado, y

- (3) una etapa de selección de una sustancia de prueba que mejora las propiedades anteriormente mencionadas por comparación con la falta de administración de la sustancia de prueba.

Una dieta rica en grasa usada para cebar a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM en el método de detección de la presente invención no está limitada en particular, siempre y cuando el contenido lipídico sea elevado. Generalmente tiene un contenido lipídico no menor del 20%, preferentemente no menor del 30%, más preferentemente no menor del 40%. El periodo de cebado de un mamífero no humano deficiente en expresión AIM con una dieta rica en grasa es, al menos, hasta que puedan confirmarse las propiedades mencionadas anteriormente. el periodo de cebado no es menor de 6 semanas, más preferentemente no menor de 12 semanas, más preferentemente no menor de 20 semanas.

- Como sustancia de prueba para ser administrada a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM, pueden usarse proteínas, péptidos, anticuerpos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extractos celulares, extractos vegetales, extractos de tejidos animales, plasma y similares. El momento de administración de la sustancia de prueba puede ser anterior al inicio del cebado con la dieta rica en grasa o simultáneo con el inicio del mismo, o posterior a la observación de la propiedad anteriormente mencionada tras el cebado del mamífero no humano deficiente en expresión AIM con la dieta rica en grasa. El método de administración puede ser oral o parenteral. Para la administración oral, puede ser administrada mediante mezcla con el pienso o el agua de beber. Como administración parenteral, pueden mencionarse la administración intraperitoneal, la administración mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección muscular, perfusión por goteo y similares, la administración rectal de supositorios y similares. La administración puede incluir una sola administración o múltiples administraciones.

- La propiedad de un mamífero no humano deficiente en expresión AIM al que se administra una sustancia de prueba es observada después de la administración de la sustancia de prueba, generalmente 4 semanas o posteriormente, preferiblemente 6 semanas con posterioridad. En cuanto al peso del hígado, puede ser observado midiendo el peso del hígado aislado del mamífero anteriormente mencionado y/o la proporción peso del hígado/peso corporal (%). En cuanto a la grasa hepática, puede ser observada tincionando una sección tisular hepática del hígado aislado anterior con rojo aceite O, y convirtiendo en valores numéricos el nivel de tinción de la misma, o midiendo la cantidad de grasas neutras en un tejido hepático. En cuanto a la fibra en el hígado, puede ser observada tincionando una sección tisular hepática del hígado aislado anterior con rojo sirio, y convirtiendo en valores numéricos el nivel de tinción de la misma. Alternativamente, en cuanto a la fibra en el hígado, también puede ser confirmada convirtiendo en valores numéricos el nivel de expresión de α SMA (α -actina de músculo liso), TGF β 1 o colágeno 4A1 en el hígado aislado anterior. En cuanto al cáncer hepático, puede ser observado mediante tinción de una sección tisular hepática del hígado aislado anterior con anti-AFP (α -fetoproteína) y convirtiendo en valores numéricos el nivel de tinción de la misma, convirtiendo en valores numéricos el nivel de expresión de la AFP en el hígado aislado anterior, o midiendo la concentración de AFP en sangre. En cuanto a la respuesta inflamatoria en el hígado, puede ser confirmada convirtiendo en un valor numérico el nivel de expresión de F4/80, TNF α , IL-6 o IL-1 β en el hígado aislado anterior.

- Los resultados de la observación de la propiedad anteriormente mencionada obtenidos según se ha mencionado en lo que antecede se comparan con los del caso de no administración de la sustancia de prueba. Alternativamente, se extrae de antemano una cifra de correlación de la presencia o ausencia de una enfermedad hepática y las propiedades anteriormente mencionadas, y los resultados de observación obtenidos de las propiedades anteriormente mencionadas pueden ser comparados con la cifra de correlación. Preferentemente, la comparación se realiza en función de la presencia o ausencia de una diferencia significativa.

- Cuando los resultados de observación de las propiedades anteriormente mencionadas obtenidos son una mejora con respecto a la no administración de la sustancia de prueba, la sustancia de prueba puede ser seleccionada como agente para la profilaxis o tratamiento de enfermedades hepáticas. Aquí, ser una mejora significa que (i) el peso del hígado es menor que en la no administración de la sustancia de prueba, que (ii) la cantidad de grasa en el hígado (nivel de la tinción con rojo aceite O, o la cantidad de grasas neutras) es menor que en la no administración de la sustancia de prueba, que (iii) el nivel de fibrosis hepática (nivel de la tinción con rojo sirio, o la expresión de α SMA, TGF β 1, colágeno 4A1) es menor que en la no administración de la sustancia de prueba, que (iv) la expresión de AFP es menor que en la no administración de la sustancia de prueba, o que (v) la expresión de F4/80, TNF α , IL-6, IL-1 β es mayor que en la no administración de la sustancia de prueba.

- Cuando la sustancia de prueba seleccionada en lo que antecede es usada como agente para la profilaxis o tratamiento de enfermedades hepáticas, puede ser formulada de la misma manera que en los AIM de la presente invención, y administrada por una vía de administración similar y con una dosis similar. Las enfermedades hepáticas que han de ser la diana del agente profiláctico o terapéutico pueden ser similares a las mencionadas anteriormente.

- Además, dado que un mamífero no humano deficiente en expresión AIM en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa es útil como modelo animal de enfermedades hepáticas, el mamífero puede ser usado para el método de evaluación de a fármaco profiláctico o terapéutico para enfermedades hepáticas. En consecuencia, la presente invención también proporciona un método de evaluación de un efecto profiláctico o terapéutico de un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, que comprende el uso de un animal obtenido por cebado de un mamífero no humano deficiente en expresión AIM con una dieta rica en grasa. Específicamente, el método de

evaluación de la presente invención comprende las etapas siguientes:

- (1) una etapa de administración, en condiciones de cebado con una dieta rica en grasa, de un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM,
- 5 (2) una etapa de observación de uno o más elementos cualesquiera de las siguientes propiedades del mamífero no humano deficiente en expresión AIM al que se administra el agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática:
 - (i) peso del hígado,
 - 10 (ii) cantidad de grasa en el hígado,
 - (iii) fibra en el hígado,
 - (iv) cáncer hepático,
 - 15 (v) respuesta inflamatoria en el hígado,
- (3) una etapa de evaluación del efecto del agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática por comparación de las propiedades anteriormente mencionadas con las de la falta de administración del agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática.

20 El agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática que ha de ser administrado a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM en el método de evaluación de la presente invención puede ser un agente profiláctico o terapéutico conocido para una enfermedad hepática. Ejemplos del mismo incluyen, sin limitación, sensibilizadores a la insulina (por ejemplo, derivados de la tiazolidina, tales como rosiglitazona, pioglitazona y similares), y similares, biguanidas tales como metformina, buformina y similares); antioxidantes (por ejemplo, vitamina E, vitamina C, betaína, EPL (polienofosfatidilcolina) etc.); agentes de soporte hepático (por ejemplo, ácido ursodesoxicólico (UDCA) etc.); agentes antihiperlipidémicos (por ejemplo, fármacos de fibratos, probucol, fármacos de estatina, etc.); depresores (por ejemplo, antagonistas de los receptores de angiotensina II, etc.); una preparación de glicirricina; hierbas medicinales chinas (por ejemplo, *shosaikoto*, etc.); agentes anticancerosos y similares. El periodo de administración, el método de administración, la frecuencia de administración y similares de un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática pueden ser iguales como los del método de detección anteriormente mencionado.

Un método de observación de la propiedad que ha de ser observada por el método de evaluación de la presente invención puede llevarse a cabo según la descripción anteriormente mencionada del método de detección. Cuando los resultados de la observación de las propiedades anteriormente mencionadas obtenidos por el método de evaluación son una mejora en mayor grado con respecto a la no administración de un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, se puede evaluar que la sustancia de prueba tiene un efecto profiláctico o terapéutico mayor como agente para la profilaxis o tratamiento de enfermedades hepáticas. Según se usa en la presente memoria, ser una mejora significa igual o superior.

En los Ejemplos de la presente invención mencionados posteriormente, se confirmó que la concentración de AIM en el suero de pacientes con EHNA era menor que la de los pacientes sin EHNA. En particular, se confirmó que la concentración de AIM en el suero de pacientes con EHNA que pasaron a sufrir cáncer hepático seguía siendo menor que la de los pacientes sin EHNA que no pasaron a tener cáncer hepático. A partir de esto, se sugiere que se pueden diagnosticar enfermedades hepáticas midiendo la concentración de AIM en la sangre de sujetos de prueba. Específicamente, el método diagnóstico de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- 45 (1) una etapa de medición de la concentración de AIM de una muestra de un sujeto de prueba,
- (2) una etapa de comparación de la concentración de AIM anteriormente mencionada de la muestra del sujeto de prueba con la concentración de AIM de una muestra de un ser humano sano,
- 50 (3) una etapa de diagnóstico en el sentido de que el sujeto de prueba tiene una enfermedad hepática o tiene una elevada posibilidad de desarrollar una enfermedad hepática cuando la concentración de AIM anteriormente mencionada de la muestra del sujeto de prueba es inferior a la concentración de AIM de la muestra del ser humano sano.

Aunque el sujeto de prueba al cual es aplicable el método diagnóstico de la presente invención no está limitado en particular, puede mencionarse, por ejemplo, un sujeto de prueba que corra el riesgo de desarrollar una enfermedad hepática o del que se sospecha que ha desarrollado una enfermedad hepática. Aunque tal sujeto de prueba no está limitado, pueden mencionarse, por ejemplo, sujetos de prueba que tengan síntomas de obesidad, diabetes, hipertensión, arteriosclerosis, hiperlipidemia y similares. Como seres humanos sanos, pueden mencionarse aquellos a los que no se les haya diagnosticado clínicamente que tengan una enfermedad hepática; por ejemplo, una persona

que esté libre de los síntomas anteriormente mencionados.

Una muestra que haya de ser usada para el método diagnóstico de la presente invención no está limitada en particular, siempre y cuando sea recogida del sujeto de prueba anteriormente mencionado y comprenda un producto génico de AIM (por ejemplo, un ARN, una proteína, un producto de lisis del mismo y similares) para que sea la diana de medición. Ejemplos de la misma incluyen líquidos corporales tales como sangre, plasma, suero, líquido linfático, orina, sudor, saliva, líquido sinovial y similares o una fracción de los mismos, y células contenidas en los mismos, en particular macrófagos y similares.

La concentración de AIM de una muestra recogida de un sujeto de prueba puede ser medida preparando una fracción de ARN (por ejemplo, ARN total, ARNm) de un macrófago, y midiendo un producto de transcripción del gen AIM contenido en la fracción. Aunque se puede preparar una fracción de ARN usando un método conocido tal como el método de ultracentrifugación de guanidina-CsCl, el método AGPC y similares, puede prepararse rápida y convenientemente un ARN total sumamente puro a partir de una cantidad traza de macrófago usando un equipo de reactivos comercialmente disponible de extracción de ARN (por ejemplo, el RNeasy Mini Kit, fabricado por QIAGEN, etc.). Ejemplos del método de detección de un producto de transcripción del gen AIM en una fracción de ARN incluyen un método que usa hibridación (transferencia Northern, transferencia puntual, análisis de la matriz de ADN, etc.), un método que usa PCR (RT-PCR, PCR competitiva, PCR en tiempo real, etc.) y similares. Son preferibles métodos PCR cuantitativos tales como PCR competitiva, PCR en tiempo real y similares, dado que la variación en la expresión del gen AIM puede ser detectada rápida, convenientemente y de manera muy cuantitativa a partir de una cantidad traza de macrófago.

Cuando se emplea hibridación por transferencia Northern o transferencia puntual, puede medirse un producto de transcripción del gen AIM usando un ácido nucleico (sonda) capaz de hibridación con un producto de transcripción del gen. Ejemplos de tal ácido nucleico incluyen un ácido nucleico capaz de hibridación con un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases mostrada por un producto de transcripción del gen AIM (por ejemplo, la secuencia de bases mostrada en la SEC ID N°: 1) en condiciones sumamente estrictas. Las condiciones sumamente estrictas son las condiciones mencionadas anteriormente y similares.

El ácido nucleico que ha de ser usado como sonda puede ser bicatenario o monocatenario. En el caso de un ácido nucleico bicatenario, puede ser un ADN bicatenario, un ARN bicatenario o un híbrido ADN:ARN. En el caso de una sola cadena, puede usarse una cadena antisentido. Aunque la longitud del ácido nucleico no está limitada en particular, siempre y cuando pueda hibridarse específicamente, por ejemplo, con un ácido nucleico diana, no es menor de aproximadamente 15 bases, preferentemente no menor de aproximadamente 30 bases. El ácido nucleico está preferentemente marcado con un marcador para permitir la detección y la cuantificación del ácido nucleico diana. Como agente marcador, se usan, por ejemplo, radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes y similares. Como radioisótopos, se usan, por ejemplo, [³²P], [³H], [¹⁴C] y similares. Como las enzimas anteriormente descritas, se prefieren enzimas estables con una actividad muy específica; por ejemplo, se usan beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa, malato deshidrogenasa y similares. Como sustancias fluorescentes, se usan, por ejemplo, fluorescamina, isotiocianato de fluoresceína y similares. Como sustancias luminiscentes, se usan, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, lucigenina y similares. Además, también puede usarse biotina-(estrept)avidina para unir una sonda y un marcador.

Cuando se emplea hibridación Northern, una fracción de ARN preparada según se ha mencionado anteriormente es separada mediante electroforesis en gel, transcrita sobre una membrana de nitrocelulosa, nailon, difluoruro de polivinilideno y similares, hibridada en las condiciones sumamente estrictas mencionadas anteriormente en un tampón de hibridación que comprende una sonda de marcado preparada según se ha mencionado anteriormente, y se mide la cantidad del marcador unido a la membrana para cada banda a través de un método adecuado, mediante el cual pueda medirse el nivel de expresión del gen AIM. Además, en el caso de una transferencia puntual, el nivel de expresión del gen AIM puede ser medido sometiendo una membrana salpicada con fracciones de ARN a una reacción de hibridación de la misma manera y midiendo la cantidad del marcador de la salpicadura.

En otra realización preferente, se usa un método PCR cuantitativo como método para medir la concentración de AIM. Ejemplos de PCR cuantitativa incluyen la PCR competitiva, la PCR en tiempo real y similares.

Un conjunto de oligonucleótidos usados como cebadores en PCR no está limitado en particular, siempre y cuando cada uno de ellos pueda hibridarse específicamente con una cadena sentido (cadena codificante) y una cadena antisentido (cadena no codificante) de un producto de transcripción del gen AIM, y pueda amplificar el fragmento de ADN encajonado por ellos. Por ejemplo, puede mencionarse un conjunto de unos oligo-ADN, cada uno de los cuales tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 bases, preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 bases, y está diseñado para amplificar fragmentos de ADN de aproximadamente 100 pb a 1 kpb. Más específicamente, como conjunto de oligonucleótidos usados como cebadores, puede mencionarse un ácido nucleico capaz de hibridarse con un ácido nucleico (cadena antisentido) que comprende la secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases anteriormente mencionada en condiciones sumamente estrictas. Según se usan en la presente memoria, las condiciones sumamente estrictas son como se ha definido anteriormente.

En la RT-PCR competitiva, la cantidad de ADN deseado se determina dejando que una cantidad conocida de otro ácido nucleico plantilla que pueda ser amplificado por un conjunto de cebadores capaces de amplificar el ADN deseado, como competidor, para que coexista en el líquido de reacción para provocar una reacción de amplificación competitiva, y comparando las cantidades de los productos de amplificación. Por lo tanto, cuando se usa RT-PCR competitiva, además del conjunto de cebadores anteriormente mencionados, se usa una cantidad conocida de un ácido nucleico competidor que puede ser amplificada con el conjunto de cebadores, y puede ser distinguida de un producto de amplificación del ácido nucleico diana (es decir, el producto de transcripción del gen AIM) después de la amplificación (por ejemplo, diferente tamaño de amplificación, diferente patrón de migración del fragmento tratado con la enzima de restricción y similares). Dado que la amplificación se produce de forma competitiva al disputarse el ácido nucleico diana y el ácido nucleico competidor los cebadores, la proporción cuantitativa del producto de amplificación refleja la proporción cuantitativa de la plantilla original. El ácido nucleico competidor puede ser ADN o ARN. En el caso del ADN, se sintetiza un ADNc a partir de una fracción de ARN preparada, según se ha mencionado anteriormente, mediante una reacción de transcripción inversa, y puede llevarse a cabo una PCR en copresencia del conjunto de cebadores anteriormente mencionado y del competidor. En el caso del ARN, se añade competidor a una fracción de ARN y se lleva a cabo una reacción de transcripción inversa, y se añade el conjunto de cebadores anteriormente mencionado y se lleva a cabo la PCR. En este caso, la cantidad absoluta del ARNm original puede estimarse porque también se tiene en consideración la eficacia de la reacción de transcripción inversa.

En la PCR en tiempo real, la cantidad de amplificación es monitorizada en tiempo real usando un reactivo fluorescente, y es necesario un aparato que comprende integralmente un termociclador y un espectrofluorofotómetro. Tal aparato está disponible comercialmente. Hay varios métodos que dependen del reactivo fluorescente que haya de ser usado y pueden mencionarse, por ejemplo, el método intercalador, el método de sondas TaqMan™, el método de balizas moleculares y similares. En cualquier caso, se sintetiza ADNc mediante una reacción de transcripción inversa a partir de una fracción de ARN preparada según se ha mencionado anteriormente, y el conjunto de cebadores anteriormente mencionado y un reactivo (sonda) de fluorescencia —por ejemplo, reactivos (intercaladores) que emiten fluorescencia uniéndose a ADN bicatenario, tales como SYBR Green I, bromuro de etidio y similares—, ácidos nucleicos utilizables como las sondas anteriormente mencionadas (el ácido nucleico se hibrida con el ácido nucleico diana dentro de la región de amplificación), mientras que ambos terminales son modificados, respectivamente, con una sustancia fluorescente (por ejemplo, FAM, HEX, TET, FITC, etc.) y una sustancia de apagado (por ejemplo, TAMRA, DABCYL etc.) (sonda TaqMan™ o sonda de balizas moleculares) y similares, son añadidos cada uno al sistema de reacción de PCR. Dado que el intercalador se une a un ADN bicatenario sintetizado y emite fluorescencia tras la irradiación de una luz de excitación, la cantidad de un producto de amplificación puede ser monitorizada midiendo la intensidad de la fluorescencia, en función de lo cual se puede suponer la cantidad del ADNc plantilla original. La sonda TaqMan™ es un oligonucleótido capaz de hibridarse con una región de amplificación del ácido nucleico diana, que tiene ambos extremos modificados por una sustancia fluorescente y una sustancia de apagado, respectivamente. Se hibrida con un ácido nucleico diana durante el emparejamiento, pero se le prohíbe emitir fluorescencia por la presencia de la sustancia de apagado, y emite fluorescencia cuando es descompuesta por la actividad de exonucleasa de la ADN polimerasa durante el alargamiento, lo que libera la sustancia fluorescente. En consecuencia, midiendo la intensidad de la fluorescencia, puede monitorizarse la cantidad del producto de amplificación, en función de lo cual se puede suponer la cantidad del ADNc plantilla original. La sonda de balizas moleculares es un oligonucleótido capaz de hibridarse con una región de amplificación de un ácido nucleico diana y de tener una estructura secundaria de tipo horquilla, que tiene ambos terminales modificados por una sustancia fluorescente y una sustancia de apagado, respectivamente. Cuando tiene una estructura en horquilla, no emite fluorescencia debido a la presencia de una sustancia de apagado, y emite fluorescencia cuando la distancia entre la sustancia fluorescente y la sustancia de apagado crece tras la hibridación con el ácido nucleico diana durante el emparejamiento. Por lo tanto, la cantidad del producto de amplificación puede ser monitorizada midiendo la intensidad de la fluorescencia, en función de lo cual se puede suponer la cantidad del ADNc plantilla original. Dado que la RT-PCR en tiempo real permite la monitorización en tiempo real de la cantidad de amplificación de la PCR, no requiere electroforesis y puede analizar la expresión del gen AIM más rápidamente.

En otra realización, la concentración de AIM de una muestra recogida de un sujeto de prueba puede ser medida preparando fracciones de proteína de la muestra y detectando el AIM contenido en la fracción. La detección del AIM puede ser llevada a cabo mediante un método inmunológico de medición (por ejemplo, ELISA, FIA, RIA, inmunolectrotransferencia, etc.) usando un anticuerpo al AIM. Alternativamente, la detección del AIM también puede ser llevada a cabo mediante un método de espectrometría de masas, tal como el MALDI-TOFMS y similares.

Un anticuerpo al AIM puede ser obtenido según una técnica generalmente usada para producir un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, y usando una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos igual o sustancialmente igual que la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, o una secuencia parcial de aminoácidos de la misma como antígeno de inmunización.

Al aplicar estos métodos inmunológicos de medición individuales al método diagnóstico de la presente invención, es innecesario establecer condiciones especiales, procedimientos especiales y similares. Realizando consideraciones técnicas ordinarias para los expertos en la técnica en cuanto a las condiciones ordinarias y los procedimientos de cada método, puede construirse un sistema de medición para el AIM. Para detalles de estos medios técnicos generales, se puede recurrir a compendios, libros y similares. Por ejemplo, Hiroshi Irie, ed., "Radioimmunoassay"

(Kodansha Ltd., publicado en 1974), Hiroshi Irie, ed., "Sequel to the Radioimmunoassay" (Kodansha Ltd., publicado en 1979), Eiji Ishikawa et al., ed., "Enzyme Immunoassay" (Igakushoin, publicado en 1978), Eiji Ishikawa et al., ed., "Enzyme Immunoassay" (2ª ed.) (Igakushoin, publicado en 1982), Eiji Ishikawa et al., ed., "Enzyme Immunoassay" (3ª ed.) (Igakushoin, publicado en 1987), *Methods in ENZYMOLOGY*, Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A)), *ibidem*, Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)), *ibid.*, Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C)), *ibid.*, Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D; Selected Immunoassays)), *ibidem*, Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), *ibidem*, Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (todos publicados por Academic Press Publishing) y similares.

Según se ha mencionado anteriormente, la concentración del AIM de la presente invención en sangre disminuye en los pacientes con enfermedades hepáticas. Por lo tanto, cuando la concentración de AIM es medida según se ha mencionado anteriormente y los resultados muestran una menor concentración en comparación con un ser humano sano, se puede evaluar que el sujeto de prueba ha desarrollado una enfermedad hepática o que tiene mucha posibilidad de desarrollar una enfermedad hepática. Alternativamente, se extrae de antemano una cifra de correlación de la presencia o ausencia de una enfermedad hepática y se extrae de antemano la concentración de AIM, y los resultados de observación obtenidos pueden ser comparados con la cifra de correlación. Preferentemente, la comparación se realiza en función de la presencia o ausencia de una diferencia significativa.

Los números de identificación de secuencias en el listado de secuencias de la presente memoria muestran las secuencias siguientes.

La [SEC ID N°: 1] muestra la secuencia de bases del AIM humano.

La [SEC ID N°: 2] muestra la secuencia de aminoácidos del AIM humano.

La [SEC ID N°: 3] muestra la secuencia de bases de un cebador sentido para F4/80.

La [SEC ID N°: 4] muestra la secuencia de bases de un cebador antisentido para F4/80.

La [SEC ID N°: 5] muestra la secuencia de bases de un cebador sentido para TNF α .

La [SEC ID N°: 6] muestra la secuencia de bases de un cebador antisentido para TNF α .

La [SEC ID N°: 7] muestra la secuencia de bases de un cebador sentido para IL-6.

La [SEC ID N°: 8] muestra la secuencia de bases de un cebador antisentido para IL-6.

La [SEC ID N°: 9] muestra la secuencia de bases de un cebador sentido para IL-1 β .

La [SEC ID N°: 10] muestra la secuencia de bases de un cebador antisentido para IL-1 β .

La [SEC ID N°: 11] muestra la secuencia de bases de un cebador sentido para α SMA.

La [SEC ID N°: 12] muestra la secuencia de bases de un cebador antisentido para α SMA.

La [SEC ID N°: 13] muestra la secuencia de bases de un cebador sentido para TGF β 1.

La [SEC ID N°: 14] muestra la secuencia de bases de un cebador antisentido para TGF β 1.

La [SEC ID N°: 15] muestra la secuencia de bases de un cebador sentido para AFP.

La [SEC ID N°: 16] muestra la secuencia de bases de un cebador antisentido para AFP.

La [SEC ID N°: 17] muestra la secuencia de bases de un cebador sentido para GAPDH.

La [SEC ID N°: 18] muestra la secuencia de bases de un cebador antisentido para GAPDH.

55 Ejemplos

En lo que sigue, la presente invención es descrita más específicamente por medio de los siguientes Ejemplos y Ejemplos de Referencia, a los cuales la invención no está limitada.

Ejemplo 1: Promoción del hígado graso cebando a ratones con AIM bloqueado con una dieta rica en grasa (DRG)

El peso del hígado, el peso del hígado con respecto al peso corporal, el peso de la grasa neutra en el hígado y la acumulación de grasa hepática mediante tinción tisular con hematoxilina-eosina fueron estudiados cebando a

ratones con AIM bloqueado y a ratones WT con una dieta rica en grasa (DRG). Como resultado, el cebado de los ratones WT con la DRG no produjo una clara diferencia en la proporción peso del hígado/peso corporal hasta la semana 20, pero el cebado de ratones con AIM bloqueado con DRG produjo un aumento significativo en la proporción peso del hígado/peso corporal en comparación con los WT desde la semana 6 (Fig. 1A). Además, los resultados del peso de la grasa neutra en el hígado muestran que el cebado de ratones con AIM bloqueado con DRG dio como resultado la acumulación de grasa en el hígado desde la semana 6, y se ha aclarado que se promovió el hígado graso en comparación con los WT (Fig. 1B).

Ejemplo 2: Avance de la fibrosis hepática (cirrosis) cebando a ratones con AIM bloqueado con una dieta rica en grasa (DRG)

Ratones de referencia (machos, 10 ratones, de 12 semanas de edad) y ratones con AIM bloqueado (machos, 10 ratones, de 12 semanas de edad) fueron cebados con una dieta rica en grasa (DRG). 0, 6, 12, 20, 45, 55 semanas después, el hígado fue fijado con formol, se tincionaron trozos con rojo sirio, y el área de fibrosis tincionada (Fig. 2A) fue cuantificada mediante una imagen NIH-J. Cada ratón fue analizado con tres trozos no contiguos, y se muestra la media (proporción de la fibrosis con respecto al trozo completo) (Fig. 2B). En consecuencia, el área de fibrosis aumenta a medida que el periodo de cebado con DRG se hace mayor, pero no se encontró una diferencia significativa entre el ratón de referencia y el ratón con AIM bloqueado. Además, se extrajo ARN de una parte del tejido hepático antes de la fijación, y se analizó el nivel de expresión del ARNm de α SMA y TGF β , que son genes representativos implicados en la fibrosis hepática, mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 2C). Dado que el cáncer se desarrolla frecuentemente en ratones con AIM bloqueado 45, 55 semanas después de un cebado con una dieta rica en grasa (DRG) y que el nivel preciso de expresión de un área hepática normal es difícil de analizar, el análisis del ARN se llevó a cabo únicamente en ratones cebados durante 0, 6, 12, 20 semanas. En consecuencia, aunque el nivel de expresión del ARNm de α SMA y TGF β aumentó con el cebado con DRG, no se encontró una diferencia significativa entre ellos.

Ejemplo 3: Aparición de cáncer hepatocelular cebando a ratones con AIM bloqueado con una dieta rica en grasa (DRG)

Cuando los ratones de referencia fueron cebados con DRG durante 52 semanas, se observó hígado graso, pero en la mayoría de los casos no se desarrolló cáncer hepatocelular. Sin embargo, se observó cáncer hepatocelular en todos los ratones con AIM bloqueado, y casi todo tumor observado era cáncer hepatocelular (CHC) de gran diferenciación (Fig. 3A, B, C). El cáncer hepatocelular fue confirmado mediante tinción Hoechst/AFP (Fig. 4) en el hígado de ratones con AIM bloqueado, y también se confirmó la mayor expresión de AFP en el hígado.

Ejemplo 4: Respuesta inflamatoria de ratones con AIM bloqueado por el cebado con una dieta rica en grasa (DRG)

Se suprimió la respuesta inflamatoria en el hígado cebando a ratones con AIM bloqueado con una dieta rica en grasa (DRG) (Fig. 5). Cuando los ratones de referencia fueron cebados con DRG, se observaron mayores respuestas inflamatorias, tales como acumulación de macrófagos en el hígado, y mayor expresión de TNF α , IL-6, IL-1 β en las semanas 12-20. En cambio, estas respuestas inflamatorias fueron suprimidas en ratones con AIM bloqueado en comparación con los WT (Fig. 5).

Ejemplo 5: Estabilización del AIM en sangre por la IgM

Se analizó mediante inmunoelectrotransferencia el AIM sérico de ratones con RAG (gen activador de recombinación) KO que carece de IgM en sangre debido a la ausencia del linfocito B. En comparación con el WT, el ratón con RAG KO presentó un nivel sumamente bajo de AIM en el suero, y no se detectó el complejo AIM-IgM (Fig. 6A). Así, se examinó *in vitro* la unión del AIM y la IgM para confirmar la unión del AIM y la IgM (Fig. 6A). Además, se administraron 200 μ g de IgM por vía intravenosa a ratones con RAG KO. En consecuencia, aumentó el AIM en sangre (Fig. 6B). Además, se midieron mediante un método ELISA la concentración del AIM y la concentración de la IgM de los sueros murino y humano. En consecuencia, se aclaró que la concentración de AIM y la concentración de IgM en sangre están también correlacionadas en el ser humano, igual que en el ratón (Fig. 7). A partir de esto, se sugirió que el AIM forma un complejo con la IgM y que se estabiliza en la sangre.

Ejemplo 6: Efecto supresor del hígado graso del AIM *in vitro*

Se estudió la acción del AIM en el hepatocito *in vitro*. Se hizo reaccionar con AIM durante 5 horas a hepatocitos murinos primarios cultivados, y las células fueron tincionadas con anticuerpo anti AIM y sometidas a inmunoelectrotransferencia. En consecuencia, se confirmó que las células captaban el AIM (Fig. 8). Además, se añadieron 800 μ M de ácido oleico (OA) a hepatocitos murinos primarios cultivados, y las células fueron cultivadas durante 24 horas para generar hígado graso, y cultivadas 24 horas más con o sin adición de AIM. El nivel de hígado graso fue medido mediante la tinción con rojo aceite O y el nivel de expresión del ARNm de la FSP27 (proteína 27 específica a las grasas). Mediante la falta de adición de AIM (OA \rightarrow DMEM), el nivel de tinción con rojo aceite O y el nivel de expresión de la fsp27 aumentaron en comparación con la falta de adición del OA, y se confirmó el nivel de hígado graso (Fig. 9). Por otro lado, mediante la adición de AIM (OA \rightarrow AIM), el nivel de tinción con rojo aceite O y el nivel de expresión de la fsp27 no aumentaron (Fig. 9), y se confirmó un efecto del AIM de mejora del hígado graso.

Ejemplo 7: Supresión de la diferenciación de un preadipocito en un adipocito por el dominio SRCR

Se obtuvieron proteínas del dominio SRCR humano recombinante (SRCR1, SRCR2, SRCR3) expresando cada dominio SRCR humano añadido con una etiqueta HA (hemaglutinina) en células HEK293T, y purificar el mismo mediante una columna de anticuerpos anti HA. Se cultivaron preadipocitos 3T3-L1 en presencia de 1 µg/mL de insulina, 1 µM de dexametasona (DEX), 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX) durante 48 horas para inducir la diferenciación en adipocitos, y se estudiaron las acciones supresoras de la diferenciación del dominio SRCR y el AIM. El AIM añadido fue AIM humano (AIMh) de longitud máxima, y se usaron los 3 tipos anteriormente mencionados de proteínas del dominio SRCR a 20 µg/ml. La diferenciación en adipocitos fue cuantificada en función del nivel de tinción con rojo aceite O sin adición como el 100%. En todos los dominios SRCR se halló una acción supresora de la diferenciación en adipocitos, que es igual que la del AIM (Fig. 10).

Ejemplo 8: Medición de la concentración de AIM en el suero de pacientes con EHNA

La concentración de AIM en el suero fue medida en 3 casos de pacientes con EHNA (2 casos acabaron en cáncer hepatocelular) y 3 casos de pacientes sin EHNA. La medición se llevó a cabo mediante inmunoelectrotransferencia usando un anticuerpo anti AIM, y se cuantificó la intensidad de la señal. Los pacientes con EHNA presentaron una menor concentración de AIM en el suero en comparación con los pacientes sin EHNA (Fig. 11). Además, los pacientes con EHNA que acabó en cáncer hepatocelular presentaron mayor disminución en la concentración de AIM en el suero (Fig. 11).

Ejemplo de Referencia: Efecto de la administración de AIM en ratones con AIM bloqueado cebados con una dieta rica en grasa (DRG)

Se crían ratones de 8 semanas de edad con AIM KO mientras se los ceba con una dieta rica en grasa (DRG). Se administra AIM o vehículo todos los días de las semanas 2 - 3 del cebado con DRG y antes de que se observe acumulación de grasa en el hígado. Cuando el hígado es tincionado con rojo aceite O 4 - 6 semanas después de la administración, se observa acumulación de grasa en el grupo de administración de vehículo, mientras que no se encuentra en el grupo de administración de AIM. Por lo tanto, se sabe que el AIM es útil para la profilaxis del hígado graso. Además, se crían ratones de 8 semanas de edad con AIM KO mientras se los ceba con una dieta rica en grasa (DRG). Se administra AIM o vehículo todos los días de las semanas 6 - 8 del cebado con DRG y antes de que se observe acumulación de grasa en el hígado. Cuando el hígado es tincionado con rojo aceite O 4 - 8 semanas después de la administración, la acumulación de grasa aumenta en el grupo de administración de vehículo en comparación con la anterior a la administración, mientras que la acumulación de grasa disminuye en el grupo de administración de AIM en comparación con la anterior a la administración. Por lo tanto, se sabe que el AIM es útil para la mejora o tratamiento del hígado graso. Además, también se obtienen resultados similares usando, en lugar de AIM, un fármaco capaz de controlar de forma agonista la función del AIM (incluyendo un péptido parcial de AIM que tiene actividad AIM) o un fármaco que induce la expresión del AIM. De manera similar, también se puede confirmar el efecto profiláctico, de mejora o terapéutico del AIM en la cirrosis y el cáncer hepático administrando AIM en el momento en que se desarrollan la fibrosis hepática y el cáncer hepático.

Ejemplo 9: Efecto de la administración de AIM en ratones con AIM bloqueado cebados con una dieta rica en grasa (DRG)

Ratones con AIM bloqueado (machos, 10 ratones, de 12 semanas de edad) fueron cebados con una dieta rica en grasa (DRG) durante 43 semanas, y se administró AIM recombinante (AIMr) (20 mg/kg (peso corporal); 5 ratones) o PBS (5 ratones) por inyección intraperitoneal una vez por semana desde la semana 30 hasta la semana 43. En la semana 43 de la DRG, los ratones fueron sacrificados, el hígado aislado fue fijado con formol, y se prepararon trozos tisulares hepáticos. Los trozos tisulares hepáticos obtenidos fueron tincionados con hematoxilina-eosina, y fueron analizados el estado del cáncer y el estado del hígado graso. Los trozos tisulares hepáticos fueron preparados en 10 trozos no contiguos para cada ratón, y la presencia o ausencia de cáncer, el tamaño y el número fueron analizados. Además, el hígado (parte no cancerosa) fue parcialmente extirpado antes de su fijación y se midió el contenido de grasas neutras. En consecuencia, disminuyó de manera significativa el peso corporal del grupo de administración del AIMr. Por otro lado, aumentó el peso corporal del grupo de administración de PBS (Fig. 12A). No se encontró una parte cancerosa clara en el grupo de administración del AIMr. En cambio, todos los ratones tenían múltiples nódulos cancerosos en el grupo de administración de PBS. Además, histológicamente se encontraron múltiples cánceres hepáticos. Se muestran fotografías macroscópicas e imágenes tincionadas con hematoxilina-eosina (Fig. 12B). En cuanto al hígado graso, se observó histológicamente una clara mejora en el grupo de administración del AIMr. Además, el contenido de grasa neutra del hígado (parte no cancerosa) disminuyó significativamente en comparación con el del grupo de administración de PBS (Fig. 12B).

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, que comprende AIM como ingrediente activo. Además, el ratón modelo de enfermedad hepática de la presente invención contribuye a la elucidación del mecanismo de aparición de enfermedades hepáticas y, según el método de detección que usa el ratón modelo de enfermedad hepática, puede buscarse una sustancia eficaz para la profilaxis o

tratamiento para enfermedades hepáticas. Además, usando el ratón modelo de enfermedad hepática de la presente invención, pueden evaluarse los efectos de un agente profiláctico o terapéutico conocido para una enfermedad hepática. Además, la presente invención puede proporcionar un método para el diagnóstico de una enfermedad hepática.

5 **Listado de secuencias**

<110> MIYAZAKI, Toru Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.

<120> prophylactic or therapeutic agent for hepatic disease

<130> 092021

10 <150> JP 2012-103958

<151> 2012-04-27

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 1116

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ttgctgcttg gggacctcct tctagcetta aatttcagct catcacctc acctgccttg      60
gtcatggctc tgctattctc cttgatcctt gccatttgca ccagacctgg attcctagcg      120
tctccatctg gagtgcggct ggtggggggc ctccaccgct gtgaagggcg ggtggaggtg      180
gaacagaaag gccagtgggg caccgtgtgt gatgacggct gggacattaa ggacgtggct      240
gtgttgctgc gggagctggg ctgtggagct gccagoggaa ccctagtgg tattttgtat      300
gagccaccag cagaaaaaga gcaaaaggtc ctcatccaat cagtcagttg cacaggaaca      360
gaagatacat tggctcagtg tgagcaagaa gaagtttatg attgttcaca tgatgaagat      420
gctggggcat cgtgtgagaa ccagagagc tctttctccc cagtccaga ggtgtcagg      480
ctggctgacg gccctgggca ttgcaaggga cgcgtggaag tgaagcacca gaaccagtgg      540
tataccgtgt gccagacagg ctggagcctc cgggccgcaa aggtggtgtg ccggcagctg      600

ggatgtggga gggctgtact gactcaaaaa cgctgcaaca agcatgccta tggccgaaaa      660
cccatctggc tgagccagat gtcatgctca ggacgagaag caacccttca ggattgcct      720
tctgggcctt gggggaagaa cacctgcaac catgatgaag acacgtgggt cgaatgtgaa      780
gatccctttg acttgagact agtaggagga gacaacctct gctctgggcg actggaggtg      840
ctgcacaagg gcgtatgggg ctctgtctgt gatgacaact ggggagaaaa ggaggaccag      900
gtggtatgca agcaactggg ctgtgggaag tccctctctc cctcctcag agaccggaaa      960
tgctatggcc ctggggtttg ccgcatctgg ctggataatg ttcgttgctc aggggaggag     1020
cagtccctgg agcagtgcc a gcacagattt tgggggtttc acgactgcac ccaccaggaa     1080
gatgtggctg tcatctgctc aggatagtat cctggg      1116

```

20

<210> 2

<211> 347

ES 2 668 507 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ile Leu Ala Ile Cys Thr Arg Pro Gly
 1 5 10 15

Phe Leu Ala Ser Pro Ser Gly Val Arg Leu Val Gly Gly Leu His Arg
 20 25 30

Cys Glu Gly Arg Val Glu Val Glu Gln Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val
 35 40 45

Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ile Lys Asp Val Ala Val Leu Cys Arg Glu
 50 55 60

Leu Gly Cys Gly Ala Ala Ser Gly Thr Pro Ser Gly Ile Leu Tyr Glu
 65 70 75 80

Pro Pro Ala Glu Lys Glu Gln Lys Val Leu Ile Gln Ser Val Ser Cys
 85 90 95

Thr Gly Thr Glu Asp Thr Leu Ala Gln Cys Glu Gln Glu Glu Val Tyr
 100 105 110

Asp Cys Ser His Asp Glu Asp Ala Gly Ala Ser Cys Glu Asn Pro Glu
 115 120 125

Ser Ser Phe Ser Pro Val Pro Glu Gly Val Arg Leu Ala Asp Gly Pro
 130 135 140

Gly His Cys Lys Gly Arg Val Glu Val Lys His Gln Asn Gln Trp Tyr
 145 150 155 160

Thr Val Cys Gln Thr Gly Trp Ser Leu Arg Ala Ala Lys Val Val Cys
 165 170 175

Arg Gln Leu Gly Cys Gly Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Arg Cys Asn
 180 185 190

Lys His Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Ile Trp Leu Ser Gln Met Ser Cys
 195 200 205

Ser Gly Arg Glu Ala Thr Leu Gln Asp Cys Pro Ser Gly Pro Trp Gly
 210 215 220

Lys Asn Thr Cys Asn His Asp Glu Asp Thr Trp Val Glu Cys Glu Asp
 225 230 235 240

5

ES 2 668 507 T3

Pro Phe Asp Leu Arg Leu Val Gly Gly Asp Asn Leu Cys Ser Gly Arg
 245 250 255

Leu Glu Val Leu His Lys Gly Val Trp Gly Ser Val Cys Asp Asp Asn
 260 265 270

Trp Gly Glu Lys Glu Asp Gln Val Val Cys Lys Gln Leu Gly Cys Gly
 275 280 285

Lys Ser Leu Ser Pro Ser Phe Arg Asp Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Gly
 290 295 300

Val Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asn Val Arg Cys Ser Gly Glu Glu Gln
 305 310 315 320

Ser Leu Glu Gln Cys Gln His Arg Phe Trp Gly Phe His Asp Cys Thr
 325 330 335

His Gln Glu Asp Val Ala Val Ile Cys Ser Gly
 340 345

<210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 3
 cctggacgaa tctgtgaag 20

10 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 15 <223> cebador

<400> 4
 ggtgggacca cagagagttg 20

20 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

25 <400> 5
 tcttctatt cctgctgtg g 21

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 6
 ggtctgggcc atagaactga 20

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 7
 gatggatgct accaaactgg a 21
 <210> 8
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 8
 ccaggtagct atgtactcc agaa 24
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 9
 tgtaatgaaa gacggcacac c 21
 25 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> cebador
 <400> 10
 tcttcttgg gtattgctg g 21
 <210> 11
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 11
 40 actctcttcc agccatctt ca 22
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <400> 12
 ataggtggtt tcgtgatgc 20
 <210> 13
 50 <211> 20
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 5 tggagcaaca tgtggaactc 20
 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 14
 cagcagccgg ttaccaag 18
 <210> 15
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 15
 catgctgcaa agctgacaa 19
 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 16
 ctttgcaatg gatgctctct t 21
 30 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 17
 agaacatcat ccctgcatcc 20
 <210> 18
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 18
 45 cacattgggg gtaggaacac 20

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un agente que comprende un AIM (inhibidor de la apoptosis del macrófago, SEC ID N°:2) o un dominio SRCR1 (rico en cisteína de receptor depurador), un dominio SRCR2 o un dominio SRCR3 del mismo, o cualquier combinación de los mismos, o un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases que codifica el mismo, para su uso en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad hepática, siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático.
- 10 **2.** Un método de selección para un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, que comprende el uso de un animal obtenido cebando a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM con una dieta rica en grasa, siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático.
- 3.** Un método de evaluación de un efecto profiláctico o terapéutico de un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad hepática, que comprende el uso de un animal obtenido cebando a un mamífero no humano deficiente en expresión AIM con una dieta rica en grasa, siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático.
- 15 **4.** Un método de diagnóstico de una enfermedad hepática que comprende las siguientes etapas:
- (1) una etapa de medición de la concentración de AIM de una muestra de un sujeto de prueba,
- (2) una etapa de comparación de la concentración de AIM anteriormente mencionada de la muestra del sujeto de prueba con la concentración de AIM de una muestra de un ser humano sano,
- 20 (3) una etapa de diagnóstico en el sentido de que el sujeto de prueba tiene una enfermedad hepática o tiene una elevada posibilidad de desarrollar una enfermedad hepática cuando la concentración de AIM anteriormente mencionada de la muestra del sujeto de prueba es inferior a la concentración de AIM de la muestra del ser humano sano, siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático.
- 25 **5.** Un AIM o un dominio SRCR1, un dominio SRCR2 o un dominio SRCR3 del mismo, o cualquier combinación de los mismos, o un ácido nucleico que comprende una secuencia de bases que codifica el mismo, para su uso en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad hepática, siendo la enfermedad hepática hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer hepático.

30

Fig. 1

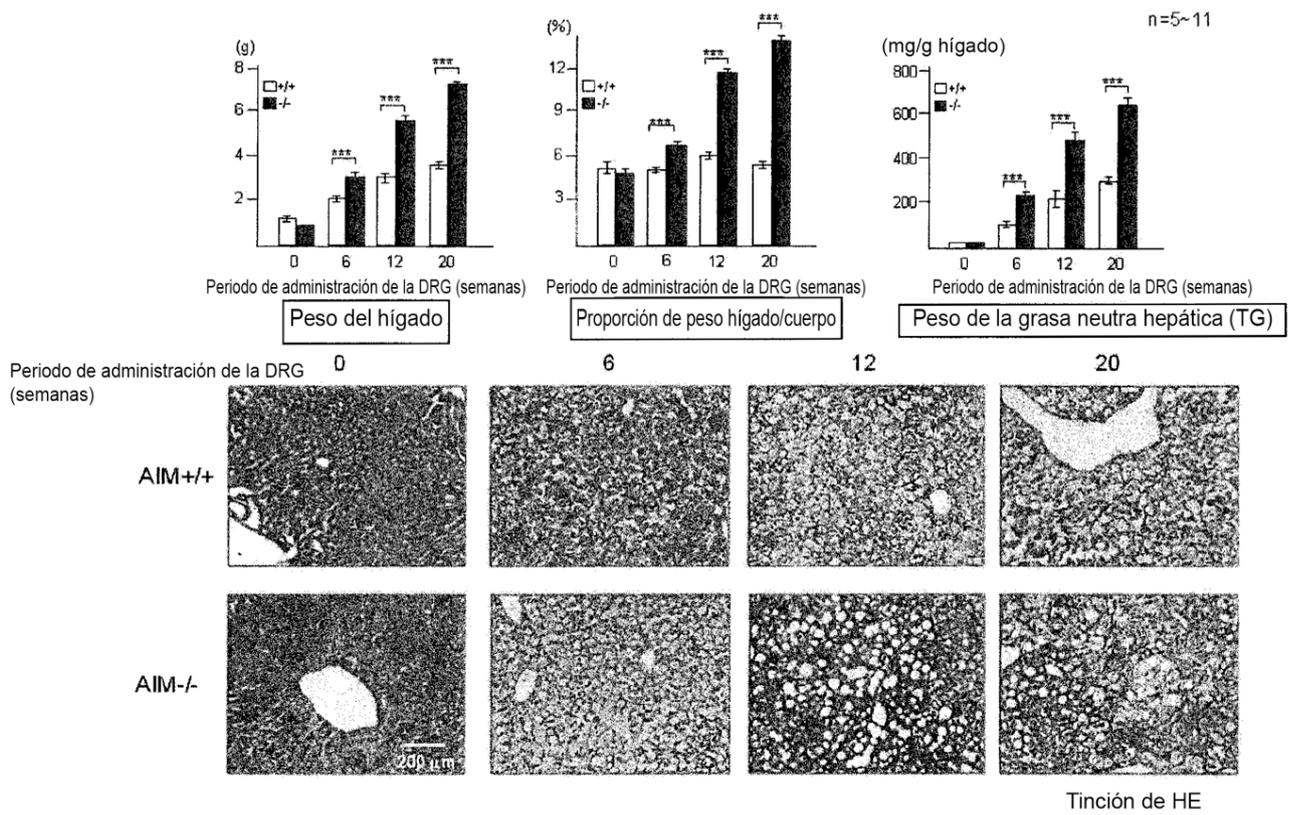


Fig. 2

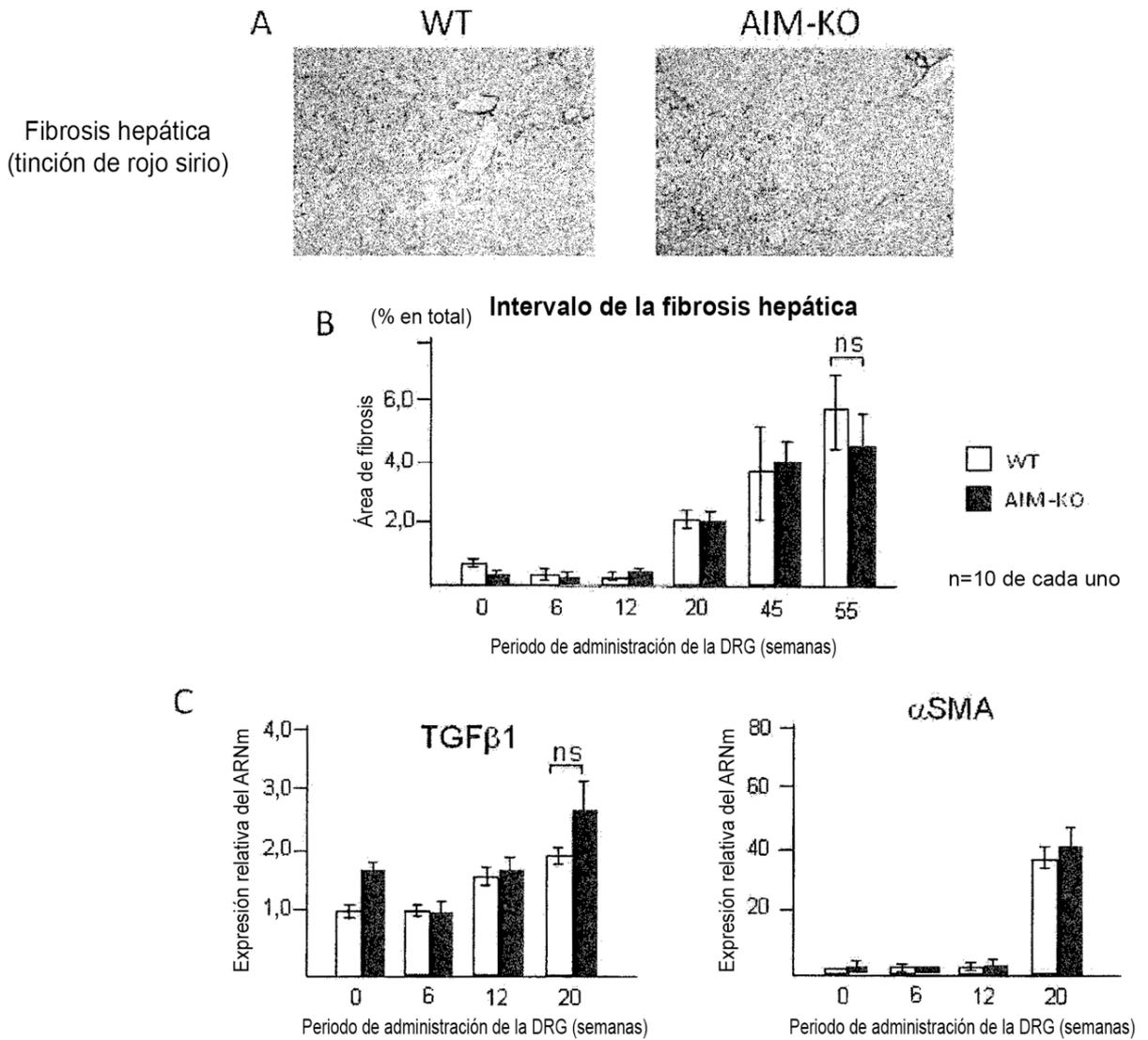


Fig. 3

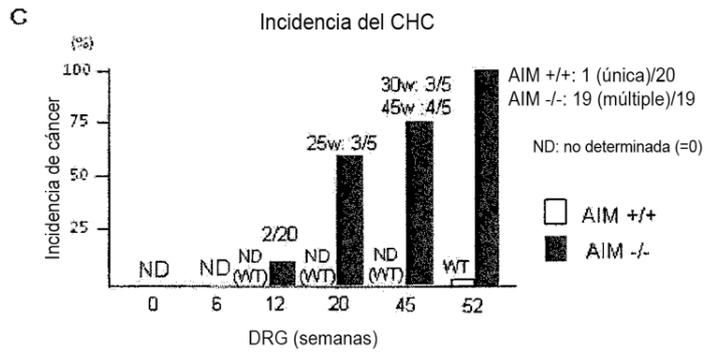
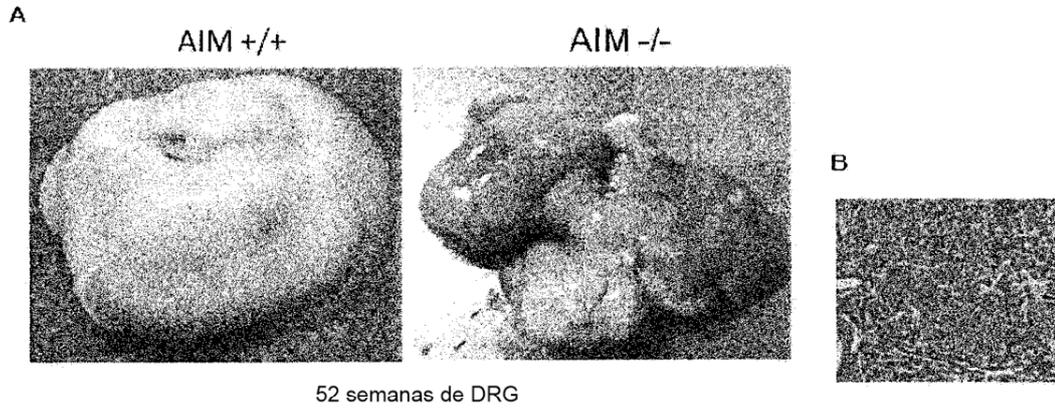


Fig. 4

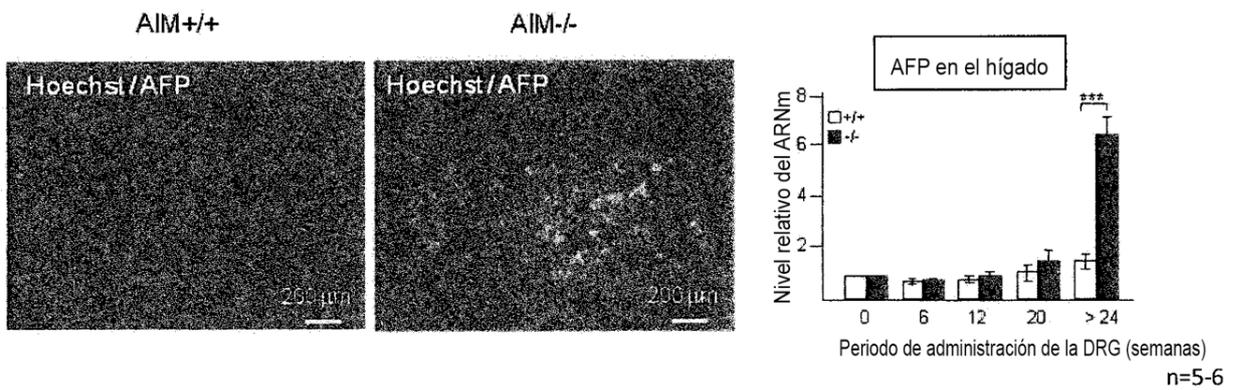
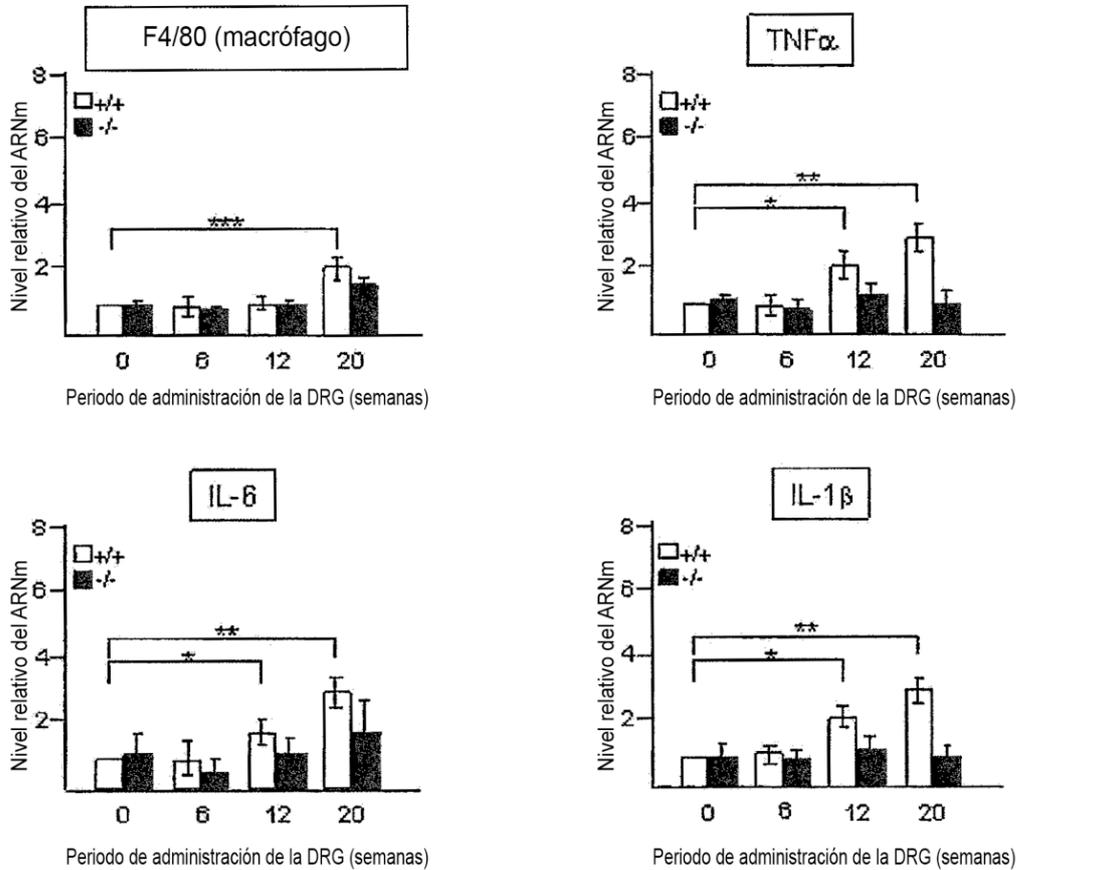


Fig. 5



n=5~6

Fig. 6

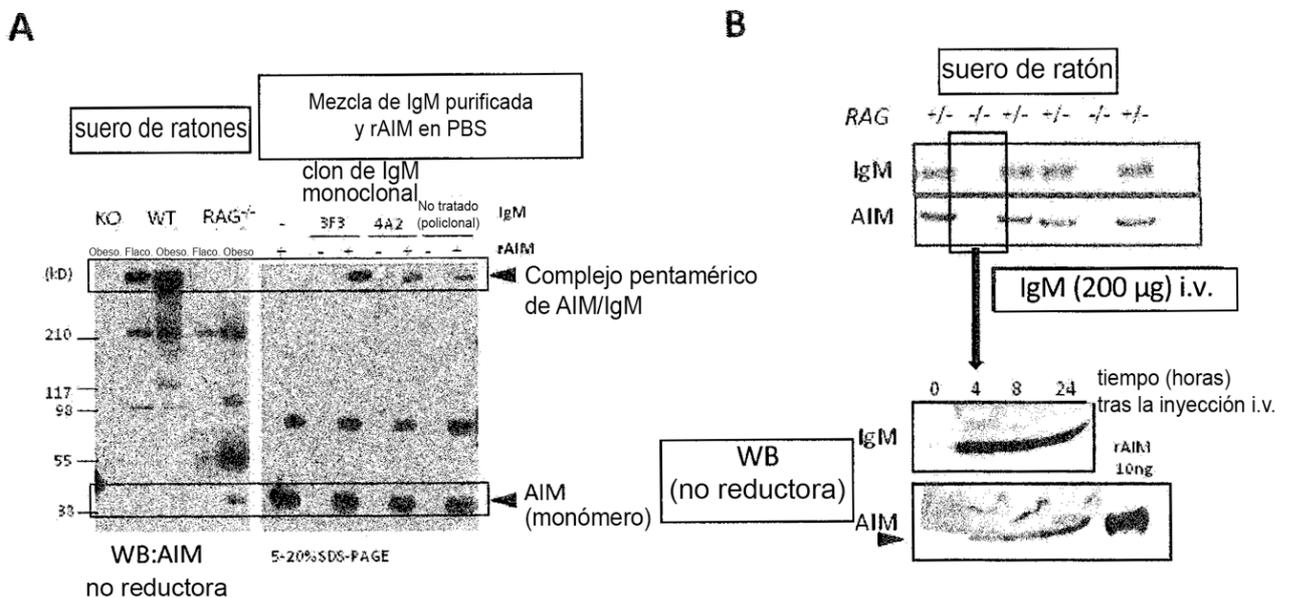


Fig. 7

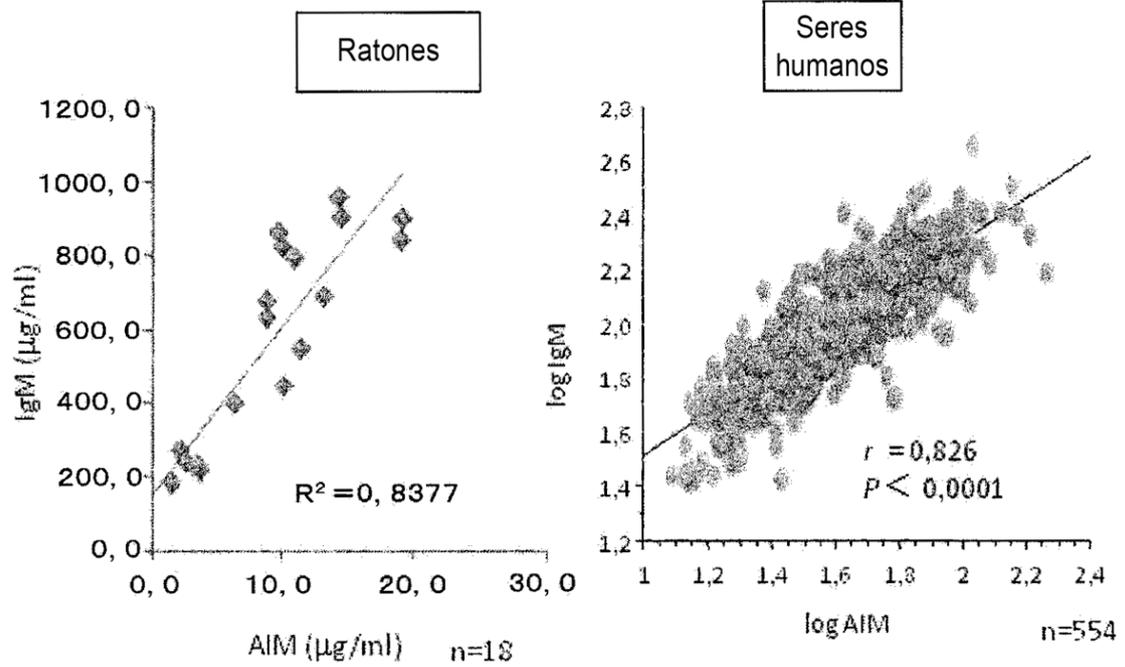
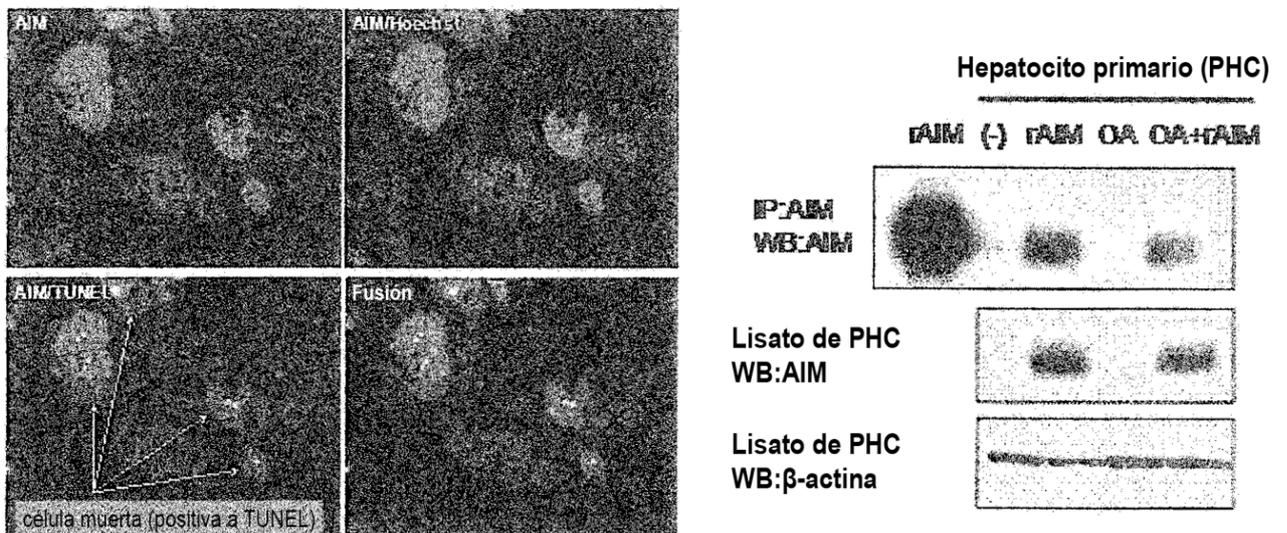
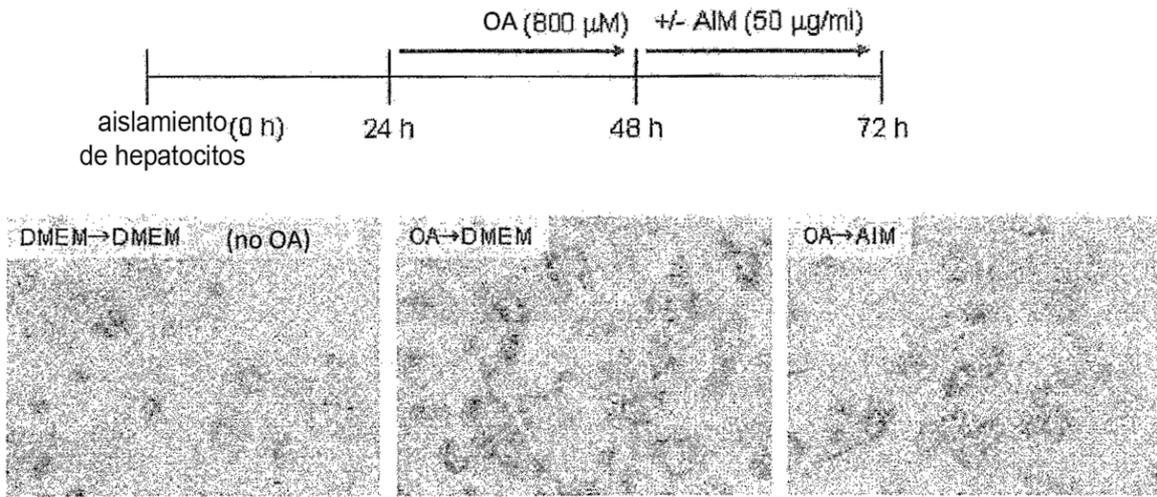


Fig. 8

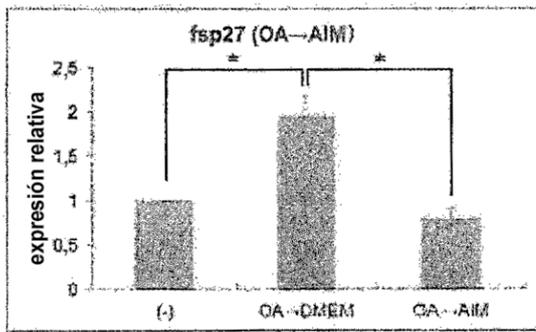


rAIM 25 µg/ml, tiempo de estimulaci3n: 5 h

Fig. 9



Tinción rojo aceite O; ampliación: ×200



N = 3, media ± SEM, *, P < 0,05

Fig. 10

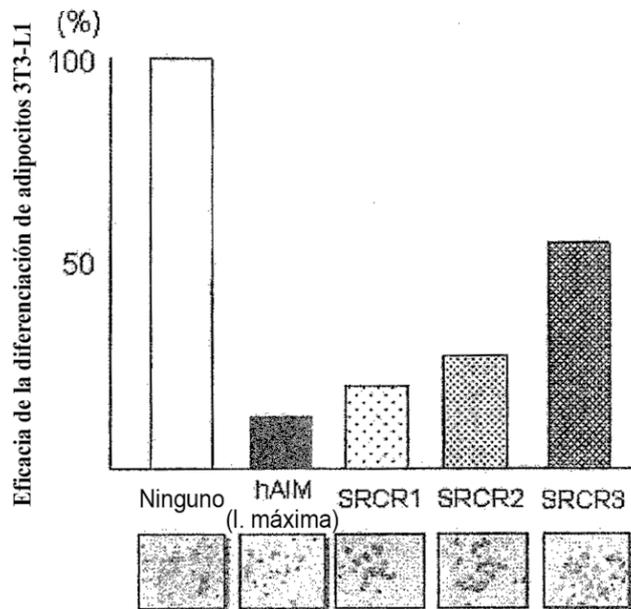


Fig. 11

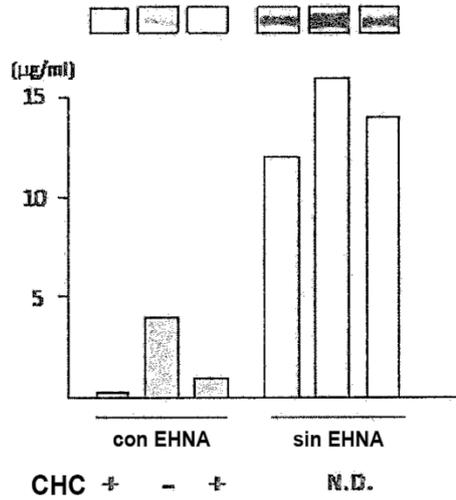


Fig. 12

