

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 590**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2010 PCT/US2010/042126**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11008947**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010 E 10800535 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2454372**

54 Título: **Gestión del tratamiento de trastornos inflamatorios o autoinmunitarios usando expresión de Hom-1**

30 Prioridad:

15.07.2009 US 225852 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2019

73 Titular/es:

ZHU, ZHENGLUN (50.0%)
85 Brainerd Road, TH 3
Allston, MA 02134, US y
GAO, HONG (50.0%)

72 Inventor/es:

ZHU, ZHENGLUN y
GAO, HONG

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 707 590 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

Gestión del tratamiento de trastornos inflamatorios o autoinmunitarios usando expresión de Hom-1

5 Antecedentes

10 El sistema inmunitario defiende al cuerpo humano contra la infección por patógenos, la transformación celular y el daño físico/químico. Su disfunción, ya sea hiperactiva o hipoactiva, conduce a diversos trastornos. La disfunción puede producirse por la edad, defectos del desarrollo, enfermedades y tratamiento médico (por ejemplo, quimioterapia o inmunosupresión). Existe la necesidad de fármacos y reactivos para el tratamiento y el diagnóstico de trastornos inmunitarios.

Sumario

15 Esta invención se refiere a materiales y métodos *in vitro* para gestionar el tratamiento de pacientes usando Hom-1 o sus inhibidores o activadores. La invención se explica en las reivindicaciones adjuntas. A continuación se muestran las secuencias del polipéptido y los nucleótidos de Hom-1.

Polipéptido Hom-1 (SEQ ID NO: 1):

20

mrlsssprrg pqqllsffgsv dwlsqsscsg pthtprpadf slgslpgpgq tsgareppqa
vsikeaagss nlpapertma glskepntlr aprvrtaftm eqvrtlegvf ghhqylsple
rkrlaremql sevqiktwfg nrrmkhkrqm gdpqlhspfs gslhappafy stssglangl
qllcpwapls gpqalmppg sfwglcqvaa ealasagasc cgqplashpp tpgrpslga
 lstgprglca mpqtgdaf **(Subrayado: aa. 91-151/homeodominio)**

Secuencia de nucleótidos de Hom-1 (SEQ ID NO: 9):

25

acctggccgc catgcgectc tctcctccc cacctcgtgg cccgcagcag ctctccagct
ttggctccgt ggactggctc tcccagagca gctgctcagg gccgaccac acccccaggc
ctgccgactt ctccctgggg agcctccctg gcccaggcca gacatccggc gcccgggagc
ccctcaggc cgtcagcadc aaggaggccg ccgggtctc aaatctgect gcgccggaga
ggaccatggc cgggttgagt aaggagccaa ataccttgcg ggcccccggt gtccgcacag
ccttcacccat ggagcaggtc cgcacctgg agggcgtctt ccagaccac cagtacctga
gccctctgga gcggaagagg ctggccaggg agatgcagct ctcagaggtc cagataaaaa
cctggtttca gaatcggcgc atgaaacaca aacggcaaat gcaggacccc cagctgcaca
gccccttctc ggggtctctc catgcgcccc cagctttcta ctcaacgtct tctggccttg
ccaatggcct gcagctgctg tgccctggg caccctgtc cgggcccag gctctgatgc
tgccccctgg ctccctctgg ggtctctgcc aagtggcaca agaggccctg gcatctggcg
gagcttctctg ctgcgggcag cctctggcgt cccaccccc taccaccaggc cggccttgc
tgggaccagc cctgtccacg gggccccggg gctgtgtgc tatgccacag acgggggatg
cattttgagg aggcacctct gactcccaca ctgcgggtct tgctgatgc acctggctcc
tacctggagg actcagttgt tctgtttaca tcttggtgac acctctcacc ctgaccaca
caaaggttct ggagattact ggagaatata tataaatata tatatgtac tatatatga
aatacacata tacgtatata taaatatata tatacatatg tgtgtgtata tatatatata
tttttttttt tttttttttt tttgagacgg agtggtgctc tgtcaccag gctggagtgc
aatgacgcaa tctcggctca ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcga ttctccagcc
tcagcctccc gagtagctgg gattacagac acccgccacc acgcccggct aattttttct
attttttagta gaaatgggtt ttcaccatgt tagccaggct ggtctcaaac tctgaccct
gtgatccgcc cgctcggcc tcccaaagtg ctgggattac aggcattgagc cactgcaccc
ggcctgaga atatatattat taaagccacc tcttactga aagttaccga aagagtcggt
ttaggaagga aacgaagggt cagtgaacag agtcaaatgc agaagtggc ttgtcatggg
tagggctttc ggcgtagcat aaaaggatca tttgtttttt aaaaggggtt ggaaaaactg
gttttccagt tggaaacagt aaaggttgta agctttgtgt gtacaaaaga aaacagggaa
tcaggtgtg tttatagcgt tgtggttcaa gtccctctta acaagaactc caaagctgga

```

aagcaggagg gaacaaaggt gaacatgaag gcgaggatgc tggggccctg cagtgcgctc
taggctgtgc gtgagccggg actgtacca cagcttgcctg agggctgctc ttcttgggcc
agggaaagca gggcagccgg gacctgcggc tgtgcctgga ctgaagctgt cccgcaggtc
cccaccctcc aacacgtgct cacctgtccc cctcctcgca gcagcctcgg gacaaaacaa
tgactcaagg acagcacttc tcgcagaagg tctggaagtg cccagaatgg gaggcacgga
agcccctccc ggggagact cccgcgttga tggaccgttc ttggtgcaga ctctgactg
cgtgcatgaa acctgagaca agtgcaattc cttccatgct gccccagagt gccaggagg
caggcagtgc ggggtgcca ggcagacggg ttcagcctgc agaactggag ggcacctgtg
aaaccacccc gggcacccca acaggaacag aagcgtggtc ctgcggctgc gtccccagcg
agtttcactt tccccttgcct cgtttctccc ttggtgtaag tgtttacaac tggcatgtgc
ttttaaacgt caggttaagag ggaacagct gctgtacatc gtccctggcga gtgacaatg
gacagaagct tgggcgaggc cctcggaggg cagcagctgg acaggggcta ctgggtttgg
cctggacagc actgatttgt ggatgtggat gggggcacgt tgtccgtgat aaaagtacaa
gtgcccctca caaaaaaaaa aaaaaaaaa subrayado: secuencia codificante (nt12 a 788.
SEQ ID NO: 2)
2)

```

5 Por consiguiente, se describe un agente de iARN que tiene una primera cadena que tiene una primera secuencia de nucleótidos homóloga a una región de un gen que codifica para la proteína Hom-1. El agente de iARN selecciona como diana un ARNm transcrito a partir del gen o su zona no traducida en 5'. En un ejemplo, la primera secuencia incluye UUCAGAAUCGCCGAUGAAACACAAACGG (SEQ ID NO: 6), UCUACUCAACGUCUUCUGGCCUUGCCAAU (SEQ ID NO: 7), y la versión de ADN correspondiente: TTCAGAATCGCCGCATGAAAC ACAACGG (SEQ ID NO: 4), TCTACTCAACGTCTTCTGGCCTTGCCAAT (SEQ ID NO: 8), El agente de iARN también puede incluir una segunda cadena que tiene una segunda secuencia de nucleótidos complementaria a la primera secuencia.

10 También se presenta una composición farmacéutica que tiene el agente de iARN que acaba de mencionarse. La composición puede ser un aerosol nasal o una composición de inhalación.

15 El agente y la composición descritos anteriormente pueden usarse para tratar a un sujeto humano que tiene, o que está en riesgo de tener, un trastorno inmunitario, tal como un trastorno de inflamación, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), que puede producirse por infección por virus o productos químicos. Específicamente, puede administrarse a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del agente de la composición o agente de iARN. El agente de iARN tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6 ó 7. El sujeto puede ser uno que tiene, o que se sospecha que tiene gripe, por ejemplo, SRAG.

20 También se presenta un ácido nucleico aislado que tiene la SEQ ID NO: 4, 6, 7 u 8 mencionada anteriormente o su complemento. También se presenta un ácido nucleico aislado que tiene la secuencia enumerada a continuación (SEQ ID NO: 3) o su complemento.

25

```

5' cgaatgcagaggctcctgcgatggccccggagtgagtcccccagaggagccggattaggg
ctggaggcggccgagtcccccgagagggccctcccgacattcccggccccgcgcgcgctcc
ccgggtcctccgcgtctctttcccggaaagcctccctcggttcctgcgcggccgcacagcc
tggacgcagcgcacgcgggcaccggcctgactctcccaccccgaagcctgctcccaacctaa
gtccgcccctgactctcccagcctgaagcctgctcgcacctcgggtgtccgggctgggcacagg
cgccagcgtccccctggagaggagaggtcgcccgccacctcccaggacaggcccaagtggga
gtgggaccctcctaccttctcgcagcctcgcccgccgggggtggggggttgggagagatgaaa
ggaggtgaccgatcccgaacctcgcctctccattaaccagggccccgcagccccgcccctcc
cccagacatcgaggagccggggaggtgtgaacggcctcctttgtgcctctgaatcgaaggca
attagcgcgtgcttatctgggcattagccgtgtatgcaaaccgggctcccggccccctcctcc
tgggcttataaacgcccgcctggcgaggcccaggggtgatcctgcgcctggccagcccgg
cctggccttcccctcggcccacctggccgc3'

```

30 También se describe el uso de una cantidad eficaz de un inhibidor de un polipéptido que contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 en un método para disminuir el nivel o la actividad de células inflamatorias (por ejemplo, macrófagos) en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del inhibidor de un polipéptido que contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.

35 También se describe el uso de una cantidad eficaz de un inhibidor de un polipéptido que contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 en un método para disminuir el nivel de una citocina proinflamatoria en un sujeto mediante la administración a un sujeto que lo necesita de la cantidad eficaz de un inhibidor de un polipéptido que contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1. Los ejemplos de la citocina incluyen TNF- α , IL-1 β e IL6.

40 También se describe el uso de una cantidad eficaz de un inhibidor de un polipéptido que contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 en un método para tratar a un sujeto humano que tiene, o que está en riesgo de tener, un trastorno inmunitario. Se administra al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un inhibidor de un polipéptido que

contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1. El trastorno inmunitario puede ser un trastorno inflamatorio o autoinmunitario, tal como SDRA. En un ejemplo, el sujeto tiene o se sospecha que tiene gripe.

5 Los ejemplos del inhibidor incluyen un anticuerpo (tal como un anticuerpo que conduce al crecimiento celular, incluyendo anticuerpo anti-CD3), un ácido nucleico antisentido y un agente de iARN, así como otra macromolécula o compuestos de molécula pequeña y compuestos que se producen de manera natural, que seleccionan como diana Hom-1. El agente de iARN puede tener la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, 6, 7 u 8. Los ejemplos de compuestos de molécula pequeña incluyen prednisona, Imuran, metotrexato, Cellcept e ionicina. Los ejemplos de macromolécula incluye PHA. En un ejemplo, cada uno de los métodos anteriores incluye además determinar el nivel de expresión o actividad de Hom-1 en una muestra obtenida del sujeto antes o después de la administración para confirmar la inhibición de Hom-1.

15 También se describe el uso de una cantidad eficaz de un polipéptido que contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 ó 5, o un equivalente funcional del mismo, o un ácido nucleico que codifica para el polipéptido, o un activador de Hom-1 en un método para aumentar el nivel o la actividad de células inflamatorias (por ejemplo, macrófagos) en un sujeto. Se administra al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del polipéptido que contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 ó 5, o del equivalente funcional del mismo, o del ácido nucleico que codifica para el polipéptido, o del activador de Hom-1. Los ejemplos del activador incluyen 5-FU, DOX, radiación, ácido retinoico, GM-CSF-IL4, resveratrol, ácido eláxico, aspirina, ácido salicílico, emodina y flavonoide y sus derivados que inducen expresión de Hom-1. En un ejemplo, el método incluye además determinar el nivel de expresión o actividad de Hom-1 en una muestra obtenida del sujeto antes o después de la administración para confirmar la inducción de Hom-1.

25 Un equivalente funcional se refiere a un polipéptido que es similar a, o es un derivado de, un polipéptido común, por ejemplo, una proteína que tiene una o más mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, truncamientos, una proteína de fusión, o una combinación de los mismos, y que conserva sustancialmente la capacidad del polipéptido común, tal como unirse a una LEF1/TCF. En un ejemplo, el polipéptido carece de un dominio de transactivación de LEF1/TCF. El trastorno proliferativo celular puede ser un estado caracterizado por la activación aberrante de la transcripción mediada por LEF1/TCF. Una activación aberrante de la transcripción mediada por LEF1/TCF se refiere a un estado celular donde la transcripción mediada por LEF1/TCF es alta de manera anómala, tal como se determina mediante los ensayos descritos en el ejemplo a continuación o mediante cualquier ensayo análogo. Los ejemplos del equivalente funcional de SEQ ID NO: 5 incluyen las secuencias de homeodominio de *Xenopus* (es decir, Xom), chimpancé y macaco de la India. Estas secuencias de homeodominio se enumeran en la figura 1. En general, son idénticas en al menos el 30% (por ejemplo, el 40, el 50, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90 o el 95%) a SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, el homeodominio de Hom-1 comparte una secuencia de aminoácidos idéntica en el 68% y positiva (similar) en el 85% con Xom.

40 Los ácidos nucleicos descritos anteriormente pueden usarse en un método de diagnóstico de un trastorno inmunitario, incluyendo (1) trastorno proliferativo celular/cáncer y (2) trastorno inflamatorio o autoinmunitario. Los ejemplos de los trastornos proliferativos celulares incluyen leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia mieloide aguda (LMA). Los ejemplos del trastorno inflamatorio o autoinmunitario incluyen síndromes mielodisplásicos (SMD), lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades inflamatorias del intestino (EII), artritis reumatoide (AR) y rechazo de trasplante. El método incluye la etapa de determinar el nivel de expresión de un gen que codifica para un polipéptido que contiene la SEQ ID NO: 1 en una muestra biológica obtenida del sujeto. Se determina que el sujeto tiene o es propenso a desarrollar trastorno proliferativo celular/cáncer (LLA, LLC, y LMA) si el nivel de expresión está por debajo de un nivel predeterminado o ausente. Se determina que el sujeto tiene o es propenso a desarrollar un trastorno inflamatorio o autoinmunitario si el nivel de expresión está por encima de un segundo nivel predeterminado. Un nivel predeterminado de este tipo puede obtenerse de un sujeto de control normal.

50 La invención presenta un método *in vitro* para gestionar el tratamiento de pacientes. El método *in vitro* incluye las etapas de identificar a un paciente con, o que necesita, un tratamiento para un estado, obtener una muestra biológica del paciente, y determinar el nivel de expresión de un gen que codifica para un polipéptido que contiene la SEQ ID NO: 1 en la muestra. Se determina que el paciente es adecuado para el tratamiento si el nivel está a o por encima de un valor predeterminado. Alternativamente, si el nivel es menor de ese nivel, el paciente no debe someterse al tratamiento. El método *in vitro* puede incluir además una etapa de comunicar el nivel de expresión al paciente o a un médico o un cuidador del paciente. En un ejemplo, el estado es un trastorno proliferativo celular, o un trastorno inmunitario, tal como los LLA, LLC, LMA y SMD mencionados anteriormente.

60 Para LLA, LLC, LMA o SMD, cuando el nivel de expresión de Hom-1 es menor que un valor predeterminado, Hom-1 puede servir como marcador para dirigir la elección de una estrategia de tratamiento eficaz; para pacientes con trasplante, Hom-1 puede usarse para garantizar que se usa la cantidad adecuada de inmunosupresor; para enfermedades autoinmunitarias, tales como LES, Hom-1 puede usarse para monitorizar el uso de inmunosupresor. Por ejemplo, si el nivel de expresión de Hom-1 disminuye hasta dicho valor tras el uso de inmunosupresores, indicará la necesidad de detener el uso del inmunosupresor para evitar el trastorno linfoproliferativo, tal como linfoma.

También se describe un kit para diagnosticar los trastornos mencionados anteriormente o para gestionar el tratamiento de pacientes. El kit incluye uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en: un anticuerpo específico para un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, un par de cebadores de PCR para amplificar un fragmento de SEQ ID NO: 2 ó 3, y un ácido nucleico que, en un estado riguroso, se hibrida con el complemento de un ácido nucleico de referencia, en el que el ácido nucleico de referencia consiste en SEQ ID NO: 2, 3 ó 5.

Las condiciones de hibridación rigurosas pueden seleccionarse de manera adecuada por un experto en la técnica, y por ejemplo, pueden facilitarse condiciones de baja rigurosidad. Condiciones de baja rigurosidad son, por ejemplo, 42°C, 2x SSC y SDS al 0,1%, y preferiblemente, 50°C, 2x SSC y SDS al 0,1%. Son más preferibles condiciones de alta rigurosidad e incluyen, por ejemplo, 65°C, 2x SSC y SDS al 0,1%. Sin embargo, varios factores distintos de la temperatura, tal como la concentración de sal, pueden influir en la rigurosidad de la hibridación y un experto en la técnica puede seleccionar de manera adecuada los factores para lograr unas condiciones de rigurosidad similares.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de dibujos

Las figuras 1A y 1B son una alineación de secuencias de aminoácidos de regiones que contienen homeodominio de Hom-1 y Xom (figura 1A) y una alineación de secuencias de aminoácidos de Hom-1, homólogos de Hom-1 de chimpancé y mono predichos, que indican que la secuencia de Hom-1 se conserva en primates (figura 1B).

Las figuras 2A y 2B son una presentación esquemática de Hom-1 y sus mutantes de delección y su interacción *in vivo* con TCF4, determinada mediante análisis de inmunoprecipitación-inmunotransferencia de tipo Western (figura 2A) y fotografías que muestran la colocalización de Hom-1 y TCF4 en células HCT116 (figura 2B).

Las figuras 3A-3D son diagramas que muestran los resultados de: (A) viabilidad celular tal como se determina mediante tinción con azul trípano (figura 3A, panel izquierdo), ensayo de MTS (figura 3A, panel central) y ensayo de incorporación de ³H-timidina (figura 3A, panel derecho); (B) regulación por disminución de la expresión de Hom-1 con ARNhc de Hom-1 (figura 3B); (C) efectos de la regulación por disminución de Hom-1 sobre la proliferación de Nalm16 tal como se mide mediante el ensayo de MTT (figura 3C, panel superior) y recuento de viabilidad celular (figura 3C, panel inferior); (D) regulación por disminución de Hom-1, que condujo a la expresión elevada de ciclina D1, con el nivel de expresión de tubulina como control interno (figura 3D).

Las figuras 4A-4D son fotografías o un diagrama (figura 4C, panel derecho) que muestran los resultados de: (A) una elaboración del perfil de expresión tisular de la expresión de Hom-1 en tejidos de adulto, usando RT-PCR con GAPDH como control interno; (B) un análisis de linaje que muestra que Hom-1 se expresa principalmente en células derivadas tanto de linajes mieloides como linfoides, incluyendo monocitos, células T, células B y neutrófilos; (C) expresión creciente de Hom-1 durante el desarrollo de células B; (D) estudio de la expresión de Hom-1 que muestra que Hom-1 no se expresa en la mayoría de las células cancerosas derivadas de tumores malignos de células B, excepto Nalm16.

Las figuras 5A y 5B son (A) una fotografía que muestra que la expresión de Hom-1 estaba marcadamente reducida en muestras de sangre periférica de diez pacientes con LLC recién diagnosticados (figura 5A) y (B) un diagrama que muestra que la regulación por disminución de Hom-1 en la leucemia linfocítica estaba asociada con la elevación correspondiente de la expresión de ciclina D1, usándose GAPDH como control interno (figura 5A).

Las figuras 6A-6D son diagramas (figuras 6A y 6C) y fotografías (figuras 6B y 6D) que muestran: (A) tasas de transfección de células HCT116 de tipo natural y con inactivación de p53 transfectadas con constructos que codifican para GFP o GFP-Hom-1 (figura 6A); (B) efectos de Hom-1 sobre ratones desnudos que portan tumor (figura 6B) y volúmenes tumorales (figura 6C), donde el crecimiento tumoral se reprimió significativamente en las líneas celulares WT y KO para p53 transfectadas con Hom-1. (Los valores son la media ± DE, n=5 por grupo, *P<0,01 frente a células transfectadas con vector; (C) apoptosis en tejido de tumores de xenoinjerto tal como se examina mediante tinción de TUNEL (figura 6D).

Descripción detallada

Esta invención se basa, al menos en parte, en los descubrimientos inesperados de que Hom-1 o sus inhibidores pueden usarse para tratar o diagnosticar diversos trastornos inmunitarios.

Tal como se describe en el presente documento, Hom-1 es un factor asociado a LEF/TCF que reprime la señalización canónica de Wnt/beta-catenina alterando la formación del complejo beta-catenina/LEF/TCF. Los enfoques de aumento de función y pérdida de función definieron a Hom-1 como un regulador negativo del crecimiento celular. Hom-1 se expresa altamente en células hematopoyéticas normales (y la expresión de Hom-1

está regulada por incremento durante la maduración de las células hematopoyéticas), pero su expresión está significativamente reducida en la leucemia linfocítica humana y durante la inmortalización de los linfocitos B periféricos por la infección de VEB. La expresión alterada de Hom-1 está asociada con cambios correspondientes de los oncogenes diana de Wnt/beta-catenina/LEF/TCF, tales como ciclina D1, lo que sugiere el papel de Hom-1 en la patogenicidad de diversos trastornos inmunológicos y tumores malignos hematológicos. Por consiguiente, se describen en el presente documento materiales para su uso en métodos para tratar o diagnosticar estos trastornos.

Por ejemplo, puede usarse un polinucleótido que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para un inhibidor de Hom-1 para tratar un trastorno relacionado con inflamación, tal como SDR. Este inhibidor puede usarse como supresor inmunitario. La secuencia de ácido nucleico puede codificar para un ARN de interferencia pequeño (por ejemplo, un agente de iARN) que selecciona como diana Hom-1 y que inhibe su expresión o actividad.

Un ácido nucleico se refiere a una molécula de ADN (por ejemplo, un ADNc o ADN genómico), una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm), o un análogo de ADN o ARN. Un análogo de ADN o ARN puede sintetizarse a partir de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de ningún ácido nucleico que se produce de manera natural o a la de ningún fragmento de un ácido nucleico genómico que se produce de manera natural. Por tanto, el término cubre, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico que se produce de manera natural pero que no está flanqueada por ambas secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en que se produce de manera natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote de manera que la molécula resultante no es idéntica a ningún ADN genómico o vector que se produce de manera natural; (c) una molécula independiente tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que forma parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica para una proteína de fusión.

El término "agente de iARN" se refiere a un ARN (o análogo del mismo), que tiene una complementariedad de secuencia suficiente con un ARN diana para dirigir interferencia por ARN. Los ejemplos también incluyen un ADN que puede usarse para obtener el ARN. La interferencia por ARN (iARN) se refiere a un proceso selectivo o específico de secuencia mediante el cual una molécula diana (por ejemplo, un gen, proteína o ARN diana) se regula por disminución. Generalmente, un ARN de interferencia ("ARNi") es un ARN de interferencia corto bicatenario (ARNic), ARN de horquilla corto (ARNhc) o micro-ARN monocatenario (miARN) que da como resultado la degradación catalítica de ARNm específicos, y también puede usarse para disminuir o inhibir la expresión génica.

Por tanto, también está dentro del alcance del documento la utilización de iARN que presenta degradación de moléculas de ARN (por ejemplo, dentro de una célula). La degradación se cataliza por un complejo enzimático de silenciamiento inducido por ARN (CSIA). Un agente de ARN que tiene una "secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARN diana, por ejemplo, Hom-1, para dirigir iARN" significa que el agente de ARN tiene una secuencia suficiente para desencadenar la destrucción del ARN diana por la maquinaria o el proceso de iARN (por ejemplo, el complejo CSIA). Un agente de ARN que tiene una "secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARN diana para dirigir iARN" también significa que el agente de ARN tiene una secuencia suficiente para desencadenar la inhibición de la traducción del ARN diana por la maquinaria o el proceso de iARN. Un agente de ARN también puede tener una secuencia suficientemente complementaria a un ARN diana codificado por la secuencia de ADN diana de manera que la secuencia de ADN diana se silencia de manera cromática. Dicho de otro modo, el agente de ARN tiene una secuencia suficiente para inducir silenciamiento génico transcripcional, por ejemplo, para modular por disminución la expresión génica en o cerca de la secuencia de ADN diana, por ejemplo, induciendo cambios estructurales de la cromatina en o cerca de la secuencia de ADN diana. El término "ARN" o "molécula de ARN" o "molécula de ácido ribonucleico" se refiere a un polímero de ribonucleótidos. El término "ADN" o "molécula de ADN" o "molécula de ácido desoxirribonucleico" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN y el ARN pueden sintetizarse de manera natural (por ejemplo, mediante replicación de ADN o transcripción de ADN, respectivamente). El ARN puede modificarse de manera postranscripcional. El ADN y el ARN también pueden sintetizarse químicamente. El ADN y el ARN pueden ser monocatenarios (es decir, ARNmc y ADNmc, respectivamente) o multicatenarios (por ejemplo, bicatenarios, es decir, ARNbc y ADNbc, respectivamente).

Los polinucleótidos mencionados anteriormente pueden administrarse usando dispositivos de administración de micropartículas o microcápsulas poliméricas, biodegradables conocidos en la técnica. Otro modo de conseguir la captación de los polinucleótidos es usando liposomas, preparados mediante métodos convencionales. El polinucleótido puede incorporarse solo en estos vehículos de administración o incorporarse conjuntamente con anticuerpos específicos de tejido. Alternativamente, puede prepararse un conjugado molecular que se compone de un plásmido u otro vector unido a poli-L-lisina mediante fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que puede unirse a un receptor en células diana (Cristiano, *et al.*, 1995, J. Mol. Med. 73:479). Alternativamente, puede lograrse selección como diana específica de tejido mediante el uso de elementos reguladores de la transcripción específicos de tejido que se conocen en la técnica. La administración de ADN

desnudo (es decir, sin un vehículo de administración) a un sitio intramuscular, intradérmico o subcutáneo es otro medio de lograr la expresión *in vivo*.

5 En los polinucleótidos mencionados anteriormente, por ejemplo, vectores de expresión, la secuencia de ácido nucleico que codifica para un inhibidor de Hom-1 está unida operativamente a un promotor o combinación de potenciador-promotor. Los vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos y vectores virales tales como virus del herpes, retrovirus, virus vaccinia, virus vaccinia atenuados, virus de la viruela del canario, adenovirus y virus adenoasociados.

10 Pueden diseñarse moléculas de ARN_i, miARN y ARNas (ARN antisentido) mediante métodos bien conocidos en la técnica. Pueden diseñarse moléculas de ARN_i, miARN y ARNas con homología suficiente para proporcionar la especificidad de secuencia requerida para degradar de manera única cualquier ARN usando programas conocidos en la técnica, incluyendo los mantenidos en los sitios web de AMBION, Inc. y Dharmacon, Inc. Los expertos en la
15 técnica pueden realizar de manera rutinaria pruebas sistemáticas de varias especies diseñadas para la optimización de la secuencia de ARN_i, miARN y ARNas. Las consideraciones cuando se diseñan moléculas de ácido nucleico de interferencia corto incluyen consideraciones biofísicas, termodinámicas y estructurales, preferencias de bases en posiciones específicas en la cadena sentido y homología. Estas consideraciones se conocen bien en la técnica y proporcionan directrices para el diseño de las moléculas de ARN mencionadas anteriormente, por ejemplo, para la administración intranasal a los pulmones tal como se describe en la presente solicitud.

20 En un aspecto, los agentes descritos anteriormente o una composición que contiene los agentes pueden usarse para tratar un trastorno relacionado con inflamación en un sujeto. Un trastorno inflamatorio o relacionado con inflamación se caracteriza por una inflamación local o sistémica, aguda o crónica. Los ejemplos incluyen dermatosis inflamatorias (por ejemplo, dermatitis, eccema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, urticaria, vasculitis necrosante, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, miositis eosinofílica, polimiositis, dermatomiositis y fascitis eosinofílica), enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), síndrome de dificultad respiratoria aguda, hepatitis fulminante, pancreatitis, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad (por ejemplo, neumonitis por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, hipersensibilidad de tipo retardada, enfermedad pulmonar intersticial o EPI, fibrosis pulmonar idiopática y EPI asociada con artritis reumatoide), asma y rinitis alérgica. Los ejemplos también incluyen enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis soriásica, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes de aparición juvenil, glomerulonefritis, tiroiditis autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica y esclerosis múltiple), enfermedades inflamatorias agudas y crónicas (por ejemplo, anafilaxia sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos, alergias a la picadura de insectos, rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto contra huésped), síndrome de Sjogren, inmunodeficiencia humana e infección por virus.

25 En otro aspecto, puede usarse la sobreexpresión de Hom-1 y sus activadores para potenciar la inmunidad para tratar el trastorno proliferativo celular, tal como cáncer (por ejemplo, cáncer de cerebro, mama, próstata, colon, riñón, ovarios, tiroides, pulmón y hematopoyético), y metástasis tumoral.

40 Un "sujeto" se refiere a un ser humano y un animal no humano. Los ejemplos de un animal no humano incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos (particularmente primates superiores), perros, roedores (por ejemplo, ratones o ratas), cobayas, gatos, y animales no mamíferos, tales como aves, anfibios, reptiles, etc. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal de experimentación o animal adecuado como modelo de enfermedad. "Tratar" o "tratamiento" se refiere a la administración de un compuesto o agente a un sujeto que tiene un trastorno (por ejemplo, SDRA o trastornos similares de las vías respiratorias/pulmón), con el fin de curar, aliviar, paliar, remediar, retrasar la aparición de, o mejorar el trastorno, el síntoma del trastorno, el estado patológico secundario al trastorno o la predisposición al trastorno. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto que puede producir un resultado deseable a nivel médico, por ejemplo tal como se describió anteriormente, en un sujeto tratado. El método de tratamiento puede realizarse *in vivo* o *ex vivo*, solo o junto con otros fármacos o terapia.

55 Una composición de esta invención puede administrarse por vía parenteral, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, por vía tópica o por vía bucal. El término "parenteral" tal como se usa en el presente documento se refiere a inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional o intracraneal, así como cualquier técnica de infusión adecuada.

60 En una realización, la composición descrita anteriormente puede usarse para tratar SDRA, y similar o trastornos relacionados de las vías respiratorias/pulmón. Los ejemplos incluyen una infección de las vías respiratorias o el pulmón, que se refiere a cualquier infección bacteriana, viral, fúngica o parasitaria de cualquier parte del sistema respiratorio.

65 Las moléculas de ácido nucleico pueden prepararse en cualquier portador, vehículo o disolución acuosa para proporcionar una composición que sea farmacéuticamente adecuada para la administración *in vivo*. Los métodos de preparación de disoluciones acuosas los conoce bien un experto habitual en la técnica. Preferiblemente, las disoluciones acuosas son agua, disoluciones acuosas fisiológicamente aceptables que contienen sales y/o

5 tampones, tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otra disolución acuosa/tensioactivo aceptable para su administración a un animal o ser humano. Tales disoluciones las conoce bien un experto en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, agua destilada, agua desionizada, agua pura o ultrapura, solución salina, PBS, y disoluciones que contienen tampones habituales que son compatibles con ácidos nucleicos. Las composiciones también pueden contener cloruro de sodio y glucosa o manitol para hacer que la disolución sea isotónica. La composición puede contener componentes auxiliares adecuados tales como agentes de ajuste del pH, la osmolaridad y la tonicidad.

10 Para la administración a través de las vías respiratorias altas, la composición se formula para dar una disolución, por ejemplo, agua o solución salina isotónica, tamponada o no tamponada, o como una suspensión, a una concentración apropiada para administración intranasal como gotas o como pulverización. Preferiblemente, tales disoluciones o suspensiones son isotónicas en relación con las secreciones nasales y aproximadamente del mismo pH, que oscila por ejemplo, desde aproximadamente pH 4,0 hasta 7,4 o, desde pH 6,0 hasta 7,0. Los tampones deben ser fisiológicamente compatibles e incluyen, simplemente a modo de ejemplo, tampones fosfato. Por ejemplo, un descongestionante nasal representativo se describe como tamponado a un pH de aproximadamente 6,2 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Ed. Arthur Osol, página 1445 (1980)). Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un contenido de solución salina y un pH adecuados para una disolución acuosa inocua para administración nasal y/o en las vías respiratorias altas. Otros vehículos acuosos adecuados incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. Las suspensiones acuosas pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y goma tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y n-propilo.

25 Las composiciones pueden contener cantidades minoritarias de polímeros, tensioactivos u otros excipientes bien conocidos por los expertos en la técnica. En este contexto, "cantidades minoritarias" significa que no están presentes agentes o sustancias auxiliares que pudieran afectar o mediar en la captación del ácido nucleico en las células de los pulmones.

30 La dosificación, las formulaciones y los sistemas de administración de aerosol pueden seleccionarse para una aplicación terapéutica particular, tal como se describe, por ejemplo, en Gonda, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313, 1990. El término aerosol tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier preparación de una niebla fina de partículas, que pueden estar en disolución o en suspensión, se produzca o no usando un propelente. Los aerosoles pueden producirse usando técnicas convencionales, tales como ultrasonificación o tratamiento a alta presión.

35 La formulación puede administrarse en una disolución acuosa que es farmacéuticamente aceptable para la administración al sistema respiratorio. Los tamaños de partícula mayores de 5 μm se depositan en la cavidad nasal. Las partículas que tienen de 2 a 10 μm pueden retenerse en los pulmones, y las partículas de menos de 1 μm se exhalan. En realizaciones preferidas, el compuesto se administra a través de inhalación en una forma tal como partículas líquidas y/o partículas sólidas. Los ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, un aerosol, una nebulización, una niebla, una muestra atomizada y gotas de líquido. El aparato típico que puede usarse para la administración a seres humanos incluye inhaladores dosificadores (MDI), nebulizadores y técnicas de instilación. La formulación se administra en una cantidad eficaz para tratar, prevenir o diagnosticar uno o más síntomas o manifestaciones de enfermedad pulmonar. Se cree que las moléculas de ácido nucleico también pueden administrarse como polvos secos usando un inhalador de polvo seco, donde las partículas se disuelven dentro de las secreciones pulmonares. Se conocen en la técnica diversos dispositivos y métodos de inhalación adecuados que pueden usarse para administrar partículas a las vías respiratorias de un paciente. Los nebulizadores crean una niebla fina a partir de una disolución o suspensión, que se inhala por el paciente. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5709202.

50 Las composiciones se administran preferiblemente al pulmón con un perfil farmacocinético que da como resultado la administración de una dosis eficaz del ácido nucleico. Tal como se usa generalmente en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un ácido nucleico de la invención es aquella cantidad que puede tratar uno o más síntomas de una enfermedad pulmonar, revertir el avance de uno o más síntomas de una enfermedad pulmonar, detener el avance de uno o más síntomas de una enfermedad pulmonar, prevenir la aparición de uno o más síntomas de una enfermedad pulmonar, disminuir una manifestación de la enfermedad o diagnosticar uno o más síntomas de una enfermedad pulmonar en un sujeto al que se administra el compuesto o agente terapéutico, en comparación con un sujeto correspondiente que no recibe el compuesto o agente terapéutico. Las cantidades eficaces reales de fármaco pueden variar según el fármaco específico o la combinación del mismo que esté utilizándose, la composición particular formulada, el modo de administración, y la edad, el peso, el estado del paciente y la gravedad de los síntomas o el estado que esté tratándose. Las dosificaciones para un paciente particular pueden determinarse por un experto habitual en la técnica usando consideraciones convencionales, (por ejemplo, por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado). En un caso, las composiciones se administran a un intervalo de dosis de 3 a 400 μg por 20 g de peso corporal, con un límite de dosificación superior de 1 gramo por 20 gramos de peso corporal. En un caso preferido, las composiciones se administran a un intervalo de dosis de 50 a 100 μg por 20 g de peso corporal. En otro caso preferido, las composiciones se administran a un intervalo de dosis de 150 nM por kg de peso

corporal.

Uno o más de los agentes descritos anteriormente pueden administrarse a un animal (por ejemplo, un ser humano) para modular la expresión o actividad de Hom-1 o sus homólogos. Por ejemplo, un médico puede recetar una dosis relativamente baja en primer lugar, aumentando posteriormente la dosis hasta que se obtiene una respuesta apropiada. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para un sujeto particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el momento de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, cualquier combinación de fármaco y el grado de expresión o actividad que va a modularse.

La eficacia del tratamiento puede monitorizarse o bien midiendo la cantidad de ARNm del gen diana (por ejemplo usando PCR en tiempo real) o bien la cantidad de polipéptido codificado por el ARNm del gen diana (análisis de inmunotransferencia de tipo Western). Tal como se conoce bien en la técnica, la dosificación para un paciente depende de diversos factores tal como se describió anteriormente. Las dosificaciones variarán, pero una dosificación preferida para la administración de polinucleótidos es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de polinucleótido. Esta dosis puede administrarse repetidamente según sea necesario. Las vías de administración pueden ser cualquiera de las enumeradas anteriormente.

Esta solicitud también presenta métodos de diagnóstico. Una célula cancerosa o una célula propensa a tumorigénesis puede detectarse en un sujeto basándose en la ausencia del polipéptido Hom (por ejemplo, anticuerpo) o un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARNm genómico) que codifica para el polipéptido en una muestra de prueba del sujeto. Dicho de otro modo, el polipéptido y los ácidos nucleicos pueden usarse como marcadores para indicar la presencia o ausencia de una célula cancerosa. Los ensayos de diagnóstico y pronóstico incluyen métodos para evaluar el nivel de expresión del polipéptido Hom o el ácido nucleico y para identificar variaciones y mutaciones en la secuencia del polipéptido Hom o el ácido nucleico.

Puede evaluarse la presencia, el nivel o la ausencia del polipéptido Hom o el ácido nucleico en una muestra de prueba obteniendo una muestra de prueba de un sujeto de prueba y poniendo en contacto la muestra de prueba con un compuesto o un agente que puede detectar el polipéptido Hom o el ácido nucleico (por ejemplo, sonda de ARNm o ADN genómico). La "muestra de prueba" incluye tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y líquidos presentes dentro de un sujeto. El nivel de expresión del gen de Hom puede medirse de varias maneras, incluyendo medir el ARNm codificado por el gen de Hom; medir la cantidad de polipéptido codificado por el gen de Hom; o medir la actividad de polipéptido codificado por el gen de Hom.

El nivel de ARNm correspondiente al gen de Hom en una célula puede determinarse mediante formatos tanto *in situ* como *in vitro*. Puede usarse ARN mensajero aislado de una muestra de prueba en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen análisis de transferencia de tipo Southern o Northern, análisis de PCR y alineamientos de sondas. Un método de diagnóstico preferido para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una sonda de ácido nucleico que puede hibridarse con el ARNm codificado por el gen de Hom. La sonda puede ser un ácido nucleico de Hom de longitud completa, tal como el ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 ó 3 o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 10 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con ARNm o ADN genómico de Hom.

En un formato, se inmoviliza ARNm (o ADNc preparado a partir del mismo) sobre una superficie y se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, haciendo correr el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En otro formato, se inmovilizan las sondas sobre una superficie y se pone en contacto el ARNm (o ADNc) con las sondas, por ejemplo, en un alineamiento de chips de gen. Un experto en la técnica puede adaptar métodos de detección de ARNm conocidos para detectar el nivel de ARNm de Hom.

Puede evaluarse el nivel de ARNm (o ADNc preparado a partir del mismo) en una muestra codificado por el gen de Hom con amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante PCR convencional (patente estadounidense n.º 4.683.202), RT-PCR (Bustin S. J Mol Endocrinol. 25:169-93, 2000), PCR cuantitativa (Ong Y. *et al.*, Hematology. 7:59-67, 2002), PCR en tiempo real (Ginzinger D. Exp Hematol. 30:503-12, 2002) y PCR *in situ* (Thaker V. Methods Mol Biol. 115:379-402, 1999), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas conocidas en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden aparearse a regiones en 5' o 3' de un gen (cadenas positiva y negativa, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre medias. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para métodos *in situ*, puede prepararse una muestra de células o tejido e inmovilizarse sobre un soporte, tal como un portaobjetos de vidrio, y luego ponerse en contacto con una sonda que puede hibridarse con ADN genómico en cromosomas o ARNm que codifica para el polipéptido Hom.

En otra realización, los métodos incluyen además poner en contacto una muestra de control con un compuesto o

agente que puede detectar ARNm o ADN genómico de Hom y comparar la presencia de ARNm o ADN genómico de Hom en la muestra de control con la presencia de ARNm o ADN genómico de Hom en la muestra de prueba.

5 Los métodos de diagnóstico basados en ácidos nucleicos descritos anteriormente pueden proporcionar información cualitativa y cuantitativa para determinar si un sujeto tiene o está predispuesto a padecer una enfermedad asociada con la expresión génica aberrante de Hom, por ejemplo, cánceres.

10 Pueden usarse una variedad de métodos para determinar el nivel del polipéptido Hom. En general, estos métodos incluyen poner un contacto un agente que se une selectivamente al polipéptido, tal como un anticuerpo, para evaluar el nivel de polipéptido en una muestra. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. También puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). En una realización preferida, el anticuerpo porta un marcador detectable. El término "marcado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende englobar el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo uniendo físicamente una sustancia detectable a la sonda o al anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable. Por ejemplo, un anticuerpo con una región Fc de conejo puede marcarse indirectamente usando un segundo anticuerpo dirigido contra la región Fc de conejo, en el que el segundo anticuerpo se acopla a una sustancia detectable. Se proporcionan ejemplos de sustancias detectables en el presente documento. Las sustancias o los marcadores detectables apropiados incluyen radioisótopos (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³H o ³²P), enzimas (por ejemplo fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano, luciferasa o β-galactosidasa), restos o proteínas fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, GFP o BFP), o restos luminiscentes (por ejemplo nanopartículas Qdot™ de Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA).

25 Los métodos de detección pueden usarse para detectar el polipéptido Hom en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Las técnicas *in vitro* para la detección del polipéptido Hom incluyen análisis mediante ELISA, inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, EIA, RIA y de inmunotransferencia de tipo Western. Las técnicas *in vivo* para la detección del polipéptido Hom incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo anti-Hom marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con una sustancia detectable tal como se describió anteriormente. La presencia y ubicación de la sustancia detectable en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de obtención de imágenes convencionales.

30 Los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento pueden identificar sujetos que tienen, o están en riesgo de desarrollar, una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de Hom. Tal como se describe en el presente documento, los ejemplos de una enfermedad o un trastorno de este tipo incluyen LLA, LLC, LMA y SMD.

35 Los ensayos de pronóstico descritos en el presente documento pueden usarse para determinar si es adecuado administrar a un sujeto un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato a fármaco) para tratar un trastorno, tal como cáncer (por ejemplo, LLA, LLC y LMA). Por ejemplo, tales ensayos pueden usarse para determinar si puede administrarse a un sujeto un fármaco citotóxico para tratar un trastorno de proliferación celular o un inmunosupresor para tratar un trastorno inmunitario, incluyendo los implicados en el trasplante de órganos/tejidos.

45 Por tanto, también se presenta un método de monitorización de un tratamiento para un cáncer o un trastorno inmunitario en un sujeto. Para este fin, pueden determinarse los niveles de expresión génica de Hom para muestras de prueba de un sujeto antes, durante o tras someterse a un tratamiento. Un aumento del nivel de expresión de Hom después del tratamiento indica que el sujeto puede tratarse adicionalmente mediante el mismo tratamiento. Por ejemplo, un paciente que ha recibido trasplante de órganos o tejidos a menudo se enfrenta a problemas de rechazo de órganos o tejidos. Es decir, el cuerpo tiene una respuesta inmunitaria a un órgano o tejido que produce el fallo del trasplante. Para abordar este problema, el trasplante de órgano o tejido a menudo va acompañado de terapia de inmunosupresión no específica para prevenir el rechazo mediado por células T. Sin embargo, estos inmunosupresores pueden producir infección, hipertensión, cáncer y otros efectos secundarios indeseables. Por tanto, existe la necesidad de monitorizar la supresión. Para este fin, el nivel de expresión de Hom-1 puede servir como marcador de un nivel o grado apropiado de inmunosupresión. Un experto en la técnica puede ajustar la cantidad de inmunosupresores y la duración del tratamiento basándose en el nivel de la expresión de Hom-1 durante el transcurso del tratamiento.

50 La información obtenida de la práctica de los ensayos anteriores es útil en el pronóstico, la identificación del avance de y el tratamiento clínico de enfermedades y otros estados perjudiciales que afectan al estado de salud de un individuo. En realizaciones preferidas, los ensayos de diagnóstico anteriores proporcionan información útil en el pronóstico, la identificación del avance de y el tratamiento clínico de tumores malignos (cánceres) que se caracterizan por una falta o expresión de Hom de nivel bajo de manera anómala. La información ayuda más específicamente al médico clínico en el diseño de regímenes quimioterápicos u otros regímenes de tratamiento para erradicar tales tumores malignos del cuerpo de un mamífero aquejado, por ejemplo, un ser humano.

65 Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción en el presente documento, utilizar la presente invención en toda su amplitud. Además, cualquier mecanismo propuesto a

continuación no restringe en modo alguno el alcance de la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Hom-1, un represor de la transcripción asociado con LEF/TCF, es un supresor tumoral

5 Los factores de transcripción LEF/TCF son los mediadores transcripcionales nucleares de la señalización canónica de Wnt/beta-catenina, que es crítica para la determinación del destino celular en la embriogénesis temprana y está implicada como una ruta oncogénica principal en una variedad de cánceres. LEF/TCF poseen poca actividad transcripcional intrínseca, pero están estrechamente controlados por factores asociados. En presencia de
10 señalización de Wnt, LEF/TCF forman un complejo con beta-catenina, que activa la expresión de genes en el sentido de 3' de LEF/TCF, incluyendo oncogenes bien establecidos tales como ciclina D1 y C-myc. Xom (también conocido como Vent-2, Xbr-1 y Vox) es un homólogo en vertebrados del gen de caja homeótica de *Drosophila ananassae* Om1D. Xom se identificó como el principal mediador en el sentido de 3' de BMP4 y es un constituyente esencial del centro de señalización ventral. Similar a beta-catenina, Xom es también una proteína inestable. Se examinó el efecto de Xom sobre la transcripción mediada por LEF/TCF y se identificó Xom como un factor de
15 transcripción asociado a LEF/TCF novedoso.

En este ejemplo, a través de la búsqueda de homología de secuencia, la elaboración del perfil de distribución y el análisis funcional, se identificó un nuevo transcrito denominado Hom-1 como un homólogo de Xom humano candidato. Se encontró que Hom-1 comparte el mismo ORF con VentX2 conocido anteriormente, pero contiene una
20 UTR en 5' de 711 pb más allá de la secuencia conocida de VentX2. Se realizaron ensayos adicionales para analizar Hom-1 tal como se describe a continuación.

Materiales y métodos:

25 *Ensayo de promotor-luciferasa*

Para un experimento de ensayo típico de promotor-luciferasa, se sembraron 2×10^5 células 293T en una placa de cultivo de 12 pocillos 24 horas antes de la transfección. Se mezclaron un microgramo de un plásmido que codifica para el gen de interés y 0,3 µg del constructo luciferasa-indicador con 3 µl de reactivo de transfección de liposomas (TRANSIT, Mirus) y se transfectaron en células cultivadas siguiendo las instrucciones de fabricación. Cuarenta y
30 ocho horas tras la transfección, se lavaron las células con PBS y se lisaron con un tampón de lisis celular 1x (PROMEGA), se rasparon y se recogieron sobre hielo. Tras una breve centrifugación en una centrífuga de sobremesa, se mezclaron 20 µl de sobrenadante con 100 µl de reactivo de ensayo de luciferasa (PROMEGA), y se midió la actividad luciferasa usando un luminómetro para microplacas TR717 (APPLIED BIOSYSTEM).

35 *Aislamiento de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real*

Se extrajo el ARN total mediante el método de TRIzol. Se homogeneizaron las células (1×10^6) en 1 ml de Trisol y entonces se añadieron 200 µl de cloroformo. Tras mezclar con vórtex, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm, y se recogieron los sobrenadantes en tubos nuevos. Se añadió isopropanol (500 µl) a cada muestra, se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entonces se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se recogieron sedimentos, se lavaron con ETOH al 70%, se secaron al aire y se resuspendieron en 20 µl de H₂O tratada con DEPC. Se determinó la concentración de ARN final mediante la medición de OD₂₆₀. Se sintetizó el ADNc de primera cadena con el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript (INVITROGEN) según el protocolo del fabricante. En resumen, se usaron 3 µg de ARN total de cada muestra para reacción de RT, y se usó 1 µl del producto de RT para la reacción de PCR. Se usó GAPDH como control interno. Se verificaron las identidades de los productos de PCR mediante secuenciación. Se realizó PCR en tiempo real usando el sistema LightCycler (ROCHE) y LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, según las instrucciones del fabricante. Se calcularon los niveles relativos de expresión génica mediante la fórmula: expresión génica relativa = $2^{-\Delta C_d}$ (ΔC_d = ciclo del gen específico – ciclo del gen de GAPDH de referencia).
40
45
50

Clonación con corte y empalme de Hom-1 y paseo por el ADNc en 5'

Se amplificó el ADN genómico de Hom-1 de 2,4 kb a partir de un clon de BAC RP13 que contenía la secuencia genómica de Hom-1 con reacción de PCR usando cebadores
55

F1: 5' AATTGAATTCAATGCGCCTCTCCTCCTCC 3',

R1: 5' TTAATCTAGATCATCAAATGCATCCCCGTCTG 3'.

60 Se digirieron los productos de PCR con EcoRI y XbaI y se clonaron en el vector CS2. Se transfectó el plásmido en células 293T. Se extrajo el ARN total de las células transfectadas mediante métodos de TriZol y se sometió a reacción de RT usando el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript (INVITROGEN). Se amplificaron los productos de RT con el cebador F1 y R1, se digirieron con EcoRI y XbaI, y luego se clonaron en el vector CS2.
65

Para el paseo por el ADNc en 5', se amplificó el ADNc de primera cadena usando el ARN total de leucocitos periféricos de voluntarios sanos. Se amplificó la región no traducida en 5' con cebadores directos partiendo de la posición -100, -161, -291, -357, -471, -711, -843 (la posición del nucleótido "A" del codón de iniciación ATG se designó como la posición 0).

5

Inmunofluorescencia y coimmunoprecipitación

Para los experimentos de inmunofluorescencia, se cotransfectaron GFP-Hom-1 y Myc-TCF4 en células HCT116 con TransIT (MIRUS). TCF4 se tiñó con anticuerpo anti-myc, seguido por anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Alexa 568 secundario (INVITROGEN). Se visualizaron los núcleos con DAPI y se tomaron imágenes con microscopía confocal en las instalaciones centrales del Hospital Infantil de Boston. Para la coimmunoprecipitación, se prepararon perlas de proteína de afinidad A/G mezclando 20 µl de perlas de agarosa - proteína A/G (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) con 1 µg de los anticuerpos de interés. Para preparar los lisados celulares, se lisaron 2×10^6 de células con un tampón de lisis celular 1x (PROMEGA) que contenía reactivo de inhibidor de proteasa 1x (ROCHE). Se incubaron los lisados celulares en hielo durante 30 minutos, se sonicaron brevemente y se centrifugaron a 12.000xg durante 5 minutos a 4°C. Se limpiaron adicionalmente los sobrenadantes añadiendo 20 µl de perlas de agarosa - proteína A/G y 1 µg de suero preinmunitario a 4°C durante dos horas. Tras una breve centrifugación, se mezclaron entonces los sobrenadantes con 20 µl de perlas de proteína A/G marcada con anticuerpo a 4°C durante la noche. Se lavaron las perlas cuatro veces con PBS - NP40 al 0,2%. Se liberaron las proteínas unidas mediante tampón de muestra 2x, se hirvieron a 95°C durante 5 minutos, se centrifugaron brevemente y se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos tal como se indica. El anticuerpo de ratón anti-myc y el anticuerpo de cabra anti-TCF4 se adquirieron de Santa Cruz.

10

15

20

25

Cultivo celular, aislamiento celular y alineamiento de ADNc

Las células usadas en este ejemplo incluyen células Nalm6, células Nalm16, células Reh, células RS1, células H Sultan, células de muestra de LLA, células de muestra de LLC, células 293T, células Jurkat, células Tall, células B transformadas con VEB y células B correspondientes de individuos sanos, células PC3, células LnCap, células MCF7, células MDA, células SK-N-AS, células H1299, células H460 y células 116. Todas las líneas celulares se mantuvieron en RPMI 1640 o DMEM complementado con FBS al 10% y penicilina y estreptomicina al 1%. Se aislaron leucocitos procedentes de individuos sanos de leukopaks desechados de donantes de sangre anónimos sanos en el Hospital Infantil de Boston. Los experimentos con materiales humanos se realizaron según directrices aprobadas por el comité de revisión institucional del Brigham and Women's Hospital.

30

35

Se aislaron células T, células B, granulocitos y monocitos con microperlas de MCAS marcadas específicamente con anticuerpos anti-CD3, CD19, CD15 y CD14 (MILTENYI BIOTEC), siguiendo las instrucciones del fabricante. El panel de ADNc de tejido normal humano PrimeExpress II (n.º 10020) se adquirió de PRIMGEN.

40

Transfección transitoria y establecimiento de líneas celulares estables de ARNhc de Hom-1

Para las células HCT116 y 293T, todas las transfecciones transitorias se realizaron con el reactivo liposómico TransIT (Mirus) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las células Reh y Nalm16, la transfección transitoria se realizó con electroporación usando el Cell Line Nucleofector Kit V (células) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron plásmidos de ARNhc de Hom-1 de Origene Technologies; Constructo 1: 5' CAAATCTGCCT GCGCCG GAGAGGACCATG 3'; constructo 3: 5' TTCAGAATCGCCGCATGAA ACACAAACGG 3' (SEQ ID NO: 4). Para establecer líneas celulares con inactivación de Hom-1, se transfectaron las células con ARNhc de Hom-1. Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se seleccionaron las células con inactivación de Hom-1 con tratamiento de puomicina 500 ng/ml durante cuatro semanas.

45

50

Ensayos de viabilidad celular, ensayos de proliferación de MTS y ensayos de incorporación de ³H-timidina

Para los experimentos de sobreexpresión de Hom-1, se transfectaron células con plásmidos que codifican para GFP-Hom1 o GFP. Veinticuatro horas tras la transfección, las células positivas para GFP se clasificaron mediante el citómetro de flujo de clasificación FAC G4 (BD BIOSCIENCE) y se sembraron en placas de cultivo.

55

60

65

Para los ensayos de viabilidad, se sembraron 5×10^5 células en placas de 12 pocillos por triplicado. Se contaron las células viables cuatro veces mediante tinción con azul tripano en cada punto de tiempo indicado. La viabilidad celular se presenta como un porcentaje. Para los ensayos de proliferación de MTS, se sembraron 1×10^5 células en placas de 96 pocillos por triplicado. Cuarenta y ocho horas tras la siembra, se midió la velocidad de proliferación celular con el kit de ensayo de proliferación celular no radiactivo acuoso Cell Titer 96 (PROMEGA) según las instrucciones de fabricación. Para los ensayos de incorporación de ³H-timidina, se sembraron 1×10^5 células clasificadas en placas de cultivo de 96 pocillos por triplicado. Cuarenta y ocho horas tras la siembra, se añadió ³H-timidina (1,0 U^{ci}/pocillo) en cada pocillo durante 18 horas adicionales. Se lisaron las células mediante congelación a -70°C durante la noche, se transfirieron a una membrana, se lavaron con PBS tres veces y se sometieron a recuento por centelleo usando el dispositivo TopCount NXT (PACKARD BIOSCIENCE).

Ensayo de CHIP

5 Se cultivaron células Hela en placas de 6 cm durante 24 horas y luego se transfectaron con constructos que codifican para myc-Hom-1 o etiqueta myc. Veinticuatro horas tras la transfección, se realizó el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) usando un kit de ensayo (Upstate Cell Signaling) siguiendo las instrucciones de fabricación. Se amplificó la secuencia promotora de ciclina D1 con cebadores específicos: F5'-CGGACTACAGGGGAGTTTTGTTG-3' y R5'-TCCAGCATCCAGGTGGCGACGAT -3', y se amplificó el promotor de la cadena pesada de inmunoglobulina con cebadores específicos: F5'-AACCCCTTTTCCCCCTCGTCT-3', R5'-AGCACCTGTGAGGTGGCTGC-3. Se analizaron los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Análisis estadístico

15 Se analizaron los datos usando la prueba de la t. Las diferencias con el valor de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Resultados:

20 *Hom-1 es un homólogo de Xom*

25 Para identificar el homólogo humano de Xom, se usó la secuencia de aminoácidos del homeodominio (HD) de Xom (HD) como molde para buscar en la base de datos de proteínas del NCBI. El gen candidato revelado por la búsqueda se designó Hom-1 (conocido anteriormente como Ventx2). El marco de lectura abierto de Hom-1 codifica para 258 aminoácidos, en comparación con los 327 aminoácidos de Xom. Tal como se muestra en la figura 1A, el homeodominio de Hom-1 comparte una secuencia de aminoácidos idéntica en el 68% y positiva (similar) en el 85% con Xom. Hom-1 contiene un dominio rico en serina/treonina N-terminal (aa 4-89), un homeodominio (aa 91-151) y un dominio rico en prolina C-terminal (aa 151-258). Esto es similar a Xom, que también contiene un dominio rico en serina/treonina N-terminal (aa 31-154), un homeodominio (aa 172-233) y un dominio rico en prolina C-terminal (aa 233-326).

35 Usando el programa de alineación de proteínas Vector NTI, se encontró que, además del homeodominio, Hom-1 y Xom comparten fuertes similitudes en la región carboxilo terminal y la parte inicial de la región amino terminal durante aproximadamente diez aminoácidos. Hay una parte no alineada de la región N-terminal entre estas dos moléculas que también es funcionalmente relevante. El análisis genómico comparativo muestra que Hom-1 está conservado en primates (figura 1B), pero la homología de secuencia se pierde en otras especies. Además de las similitudes estructurales, los datos de EST a partir de CGAP (The Cancer Genome Anatomy Project) muestran que el patrón de expresión de Hom-1 es similar a la distribución de Xom, demostrando ambos una expresión muy limitada en tejidos de adulto, pero expresión en tejidos embrionarios.

40 Para evaluar adicionalmente la función de Hom-1, se obtuvo su ADNc a través de clonación con corte y empalme, usando el clon BAC RP13 como molde. Además de la secuencia conocida, se identificó una región no traducida en 5' novedosa de 711 pb en el primer exón de Hom-1 mediante paseo por el ADNc en 5'.

45 Xom es un represor transcripcional del gen específico dorsal Gooseoid. Para identificar cualquier posible similitud funcional entre Hom-1 y Xom, se inyectó ARNm que codifica para Hom-1 o Xom en uno de los dos blastómeros de embriones de *Xenopus* en la fase de dos células, junto con ARNm que codifica para activina y el constructo Gsc-indicador de luciferasa. Se recogieron cinco embriones en la fase 10, y se midió la actividad luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa PROMEGA.

50 Se encontró que la expresión de Hom-1 inhibía la expresión inducida por activina del promotor de Gsc, de manera similar a la inhibición del promotor de Gsc por Xom. Estos resultados son consecuentes con el hallazgo anterior de que la expresión de Hom-1/Ventx2 inhibe la dorsalización en el pez cebra. No obstante, tal como se muestra a continuación, Xom transactiva la transcripción mediada por LEF/TCF a través de su dominio N-terminal, lo que distingue a Xom de Hom-1. Por tanto, se concluye que Hom-1 es un homólogo de Xom en lugar de un ortólogo de Xom.

Hom-1 forma un complejo con los factores de transcripción con LEF/TCF

60 Se examinó si Hom-1 interacciona con LEF1/TCF. Hom-1 marcado en myc se expresó de manera transitoria en células HCT116, y se caracterizó la posible interacción entre Hom-1 y TCF4 mediante coimmunoprecipitación. Cuando se aplicaron perlas recubiertas con anti-TCF4 a los extractos de células HCT116, myc-Hom-1 coimmunoprecipitó fácilmente con TCF4. También se encontró que Hom-1 se colocalizaba con TCF-4 de manera punteada en los núcleos de células transfectadas (figura 2B). Para determinar los dominios críticos de Hom-1 implicados en la interacción con los factores LEF/TCF, se obtuvieron mutantes de Hom-1 mediante delección en serie y se sometieron a prueba para determinar su afinidad con TCF4 (figura 2A). Se encontró que si se delecionaba el

homeodominio y su región circundante de 50 aminoácidos de Hom-1, los mutantes resultantes no interactuaban con las perlas recubiertas con anti-TCF4 mediante coimmunoprecipitación, lo que sugiere que el homeodominio de Hom-1 y su región circundante desempeñan papeles críticos en la interacción entre los factores Hom-1 y LEF1/TCF.

5 Dado que el dominio de caja homeótica es un dominio de unión a ADN de Hom-1, se incluyó bromuro de etidio (EtB) 20 µg/ml para descartar una posible interferencia de ácidos nucleares en la interacción entre Hom-1 y TCF4. Se encontró que EtB no interrumpía la interacción entre TCF4 y Hom-1, lo que indica que la interacción entre Hom-1 y TCF4 no es dependiente de su asociación con ADN.

10 *Hom-1 inhibe la transactivación de beta-catenina de la transcripción mediada por LEF/TCF*

Se realizaron ensayos para examinar los efectos de Hom-1 sobre la transactivación de beta-catenina de LEF/TCF, usando el ensayo de TOPflash indicador de LEF/TCF. Se encontró que Hom-1 solo no activaba la transcripción mediada por LEF/TCF en células 293T. En cambio, Hom-1 bloqueó la transactivación de β-catenina de la transcripción mediada por LEF/TCF de manera dependiente de la concentración.

15 Para confirmar adicionalmente los efectos inhibidores de Hom-1 sobre la señalización de beta-catenina, se realizaron ensayos para examinar los efectos de Hom-1 sobre la transcripción mediada por LEF/TCF en células HCT116, que expresan constitutivamente actividad de β-catenina endógena elevada. Los resultados muestran que Hom-1 inhibía la transcripción mediada por LEF1/TCF de manera dependiente de la concentración en células HCT116, pero no ejercía efectos significativos sobre la expresión de ARNm o proteína beta-catenina.

20 Para explorar los mecanismos alternativos que subyacen a la acción de Hom-1, se examinó si Hom-1 altera la formación de un complejo de beta-catenina y TCF4, que se requiere para la transactivación de beta-catenina de genes diana de LEF/TCF. Se transfectaron de manera transitoria células HCT116 con Myc-Hom-1 en concentraciones crecientes. Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se recogieron lisados de células HCT116 y se inmunoprecipitó TCF4 con anticuerpo específico. Se usaron anticuerpos específicos para detectar cualquier Hom-1 y beta-catenina en el inmunocomplejo. Se encontró que, con niveles crecientes de Myc-Hom-1 en el inmunocomplejo, los niveles de beta-catenina en el inmunocomplejo mostraban una disminución correspondiente, lo que sugiere que la expresión de Hom-1 altera la formación del complejo beta-catenina/TCF4.

25 Por tanto, de manera similar a las acciones de los inhibidores asociados a beta-catenina de la señalización beta-catenina/LEF/TCF tal como Chibby, bloquear la formación de un complejo entre beta-catenina y los factores LEF/TCF podría explicar la inhibición de Hom-1 de la transactivación de LEF/TCF transactivación por beta-catenina.

35 *Hom-1 modula la expresión de genes en el sentido de 3' de beta-catenina/LEF1/TCF*

En esta parte, se realizaron ensayos para examinar los efectos de Hom-1 sobre la expresión de genes diana de LEF/TCF endógenos, tales como ciclina D1.

40 En primer lugar, se realizaron ensayos para examinar la interacción entre Hom-1 y el promotor de ciclina D1, usando un ensayo CHIP. Se transfectaron de manera transitoria un plásmido que codifica para myc-Hom-1 y etiqueta myc de control en células Hela, que más tarde se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos contra etiqueta myc. Se amplificó el promotor de ciclina D1 o el promotor de la cadena pesada de IgG, Cμ, que se usó como control negativo, con cebadores específicos. Se encontró que Hom-1 se unía específicamente al promotor de ciclina D1, pero no al promotor Cμ de control.

45 Además, se sometieron a prueba los efectos de Hom-1 sobre la expresión de ciclina D1 usando el ensayo de promotor de ciclina D1-luciferasa. De acuerdo con la inhibición por Hom-1 de la transcripción mediada por LEF/TCF, se encontró que la Hom-1 bloqueaba la transactivación del constructo promotor de ciclina D1-luciferasa en células HCT116, de manera similar a su efecto sobre el constructo TOPflash-indicador. De acuerdo con un efecto inhibidor de Hom-1 sobre la expresión de ciclina D1, análisis de inmunotransferencia de tipo Western mostraron que Hom-1 producía una disminución dependiente de la concentración de los niveles de la ciclina D1 intracelular.

55 *Hom-1 es un regulador negativo de la proliferación celular*

La ruta canónica de Wnt/beta-catenina/LEF/TCF se ha implicado en la transformación maligna y la proliferación celular. En esta parte, se llevaron a cabo ensayos para evaluar el papel de Hom-1 sobre la proliferación celular.

60 Se examinó la expresión de Hom-1 en células cancerosas derivadas de tumores malignos tanto solitarios como hematopoyéticos mediante RT-PCR. Se identificó la expresión de Hom-1 sólo en las células de leucemia linfoblástica Nalm16, pero no en otras células cancerosas (véase a continuación y figura 4D).

65 Para determinar el efecto de Hom-1 sobre la proliferación celular, se transfectó de manera transitoria GFP-Hom-1 en células de leucemia linfoblástica Reh, que no expresan Hom-1 endógeno. Las células transfectadas positivamente

se clasificaron con FACS, y se determinaron los efectos de Hom-1 sobre la proliferación celular mediante recuento celular, ensayo metabólico de MTT y ensayo de incorporación de ³H-timidina en síntesis de ADN (figura 3A). Los resultados indicaron que la expresión de Hom-1 inhibía fuertemente la proliferación de células Reh. También se obtuvieron resultados similares con Hom-1 sobre la proliferación de otras células cancerosas.

5 Para evaluar adicionalmente el efecto de Hom-1 sobre la proliferación celular, se reguló por disminución la expresión de Hom-1 en células Nalm16 usando una técnica de ARNhc. Se transfectaron cuatro constructos de ARNhc de Hom-1 en las células Nalm16. Se determinó la eficacia de estos constructos en la expresión con regulación por
10 disminución de Hom-1 mediante RT-PCR y se verificó adicionalmente con análisis de inmunotransferencia de tipo Western, usando un anticuerpo específico frente a Hom-1 preparado en el laboratorio. Se encontró que, aunque el constructo 3 tenía alta actividad específica contra la expresión de Hom-1, el constructo 1 ejercía poco efecto (figura 3B). Posteriormente, se usaron los constructos para transfectar células Nalm16, y se seleccionaron las células transfectadas positivamente por la resistencia a puomicina. Se determinó el efecto de estos ARNhc de Hom-1 sobre la expresión de Hom-1 endógeno mediante RT-PCR (figura 3B, panel superior). Se determinó adicionalmente la
15 expresión de Hom-1 en células transfectadas con ARNhc de Hom-1 y de control mediante inmunotransferencia usando anticuerpo específico frente a Hom-1 (figura 3B, panel central) y se cuantificó mediante densitometría (figura 3B, panel inferior). Los resultados indicaron que el constructo 3, pero no el constructo 1, inactiva eficazmente la expresión de Hom-1 en células Nalm16.

20 Los efectos de Hom-1 sobre la proliferación celular se determinaron adicionalmente mediante el ensayo de proliferación celular y el ensayo de MTT. Tal como se muestra en la figura 3C, aunque la regulación por disminución de Hom-1 con el constructo 3 se asoció con hiper-proliferación de Nalm16, ni el constructo de control ni el constructo 1 tuvieron ningún efecto sobre la proliferación de células Nalm16. Los resultados anteriores sugirieron que Hom-1 es un regulador negativo de la proliferación celular.

25 Para determinar si los efectos de Hom-1 sobre la proliferación celular se refieren a la expresión de genes diana de LEF/TCF, se examinaron los efectos de la regulación por disminución de Hom-1 sobre la expresión de ciclina D1. A diferencia del efecto se la sobreexpresión, la regulación por disminución de Hom-1 se asoció con niveles celulares aumentados de ciclina D1 (figura 3D). Los resultados anteriores sugirieron que Hom-1 regulaba por disminución la proliferación celular al menos parcialmente a través de la inhibición de la señalización de beta-catenina/LEF/TCF y la expresión de sus reguladores del ciclo celular en el sentido de 3' tales como ciclina D1.

30 *La expresión de Hom-1 está altamente regulada en células hematopoyéticas y está implicada en la oncogénesis de la leucemia linfocítica*

35 Para explorar el papel fisiológico de Hom-1, se caracterizó su expresión en tejidos de adulto, usando alineamiento de ADNc de tejido y RT-PCR. Se encontró que la expresión de Hom-1 de longitud completa estaba altamente restringida a leucocitos de sangre periférica (figura 4A). El análisis de linaje de leucocitos de sangre periférica mostró que Hom-1 se expresaba tanto en linajes mieloides como linfoides, incluyendo células mononucleares, células B,
40 células T y neutrófilos (figura 4B). Su expresión aumentó como células B maduras (figura 4C). A diferencia de la expresión fisiológica de Hom-1 en linfocitos B periféricos, Hom-1 no se expresó esencialmente en líneas de células cancerosas derivadas de tumores malignos de células B, excepto en células Nalm16 (figura 4D). Además, un examen de líneas de células cancerosas derivadas de cánceres solitarios reveló que Hom-1 no se expresó en líneas de células cancerosas, incluyendo HCT116, SW480, HT29, HepG2, PC3, LnCap, Hela, H460, H1299, MCF7, MDA y SK-N-AS. Se ha demostrado que los factores LEF/TCF desempeñan un papel esencial en el desarrollo y la leucemogénesis de linfocitos B. De acuerdo con el papel de Hom-1 en oncogénesis de tumores malignos de células B, el nivel de expresión de longitud completa de Hom-1 se redujo significativamente durante la inmortalización de células B periféricas mediante infección de VEB.

50 Para explorar adicionalmente el papel de Hom-1 en la oncogénesis de tumores malignos de células B, se examinó la expresión de Hom-1 de longitud completa en muestras de sangre periférica de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC) recién diagnosticada y no tratada. Todas las muestras de LLC contenían un mínimo del 95% de células de leucemia CD19+. La RT-PCR del nivel de ARN total de estas muestras de sangre mostró una reducción significativa de la expresión de Hom-1 en las siete muestras de LLA y las diez
55 muestras de LLC (figura 5A). También se encontró que la regulación por disminución de la expresión de Hom-1 en la sangre periférica de pacientes con leucemia aguda y crónica estaba asociada con una elevación de la expresión de ciclina D1 (figura 5B).

60 Varios mecanismos podrían explicar la expresión altamente regulada de Hom-1. Además de la regulación transcripcional, el transcrito de Hom-1 contiene una región no traducida larga en 5' rica en GC (5'UTR) de 711 pares de bases. Se observa una 5'UTR atípica larga en aproximadamente el 10% de los ARNm y a menudo precede a genes que regulan el crecimiento y la proliferación celulares, tales como C-myc, HIF y LEF/TCF. La 5'UTR larga podría formar una estructura secundaria para regular el inicio de la traducción de Hom-1. Por tanto, es posible que 5'UTR de Hom-1 desempeñe un papel crítico en la regulación de la expresión de Hom-1 a nivel de traducción.

65 Los resultados anteriores sugirieron que Hom-1 es un supresor tumoral que funciona, al menos en parte, como

inhibidor de la expresión de oncogenes en el sentido de 3' de LEF/TCF tales como ciclina D1. Los resultados también sugirieron que Hom-1 puede usarse para predecir el comportamiento clínico de la leucemia linfocítica y como diana para identificar fármacos para tratar diversos trastornos, por ejemplo, cáncer.

5 Ejemplo 2: Apoptosis inducida por Hom-1 en células cancerosas suficientes y deficientes en p53

Materiales y Métodos

Cultivo celular, transfección, quimioterapia

10 Se obtuvieron las líneas celulares de cáncer colorrectal humanas HCT116, SW480, y la línea celular de cáncer de pulmón humana H460 y H1299 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). La línea celular HCT116 ($p53^{-/-}$) fue un obsequio. Se mantuvieron todas las líneas celulares a 37°C y el 5% de CO₂. Los medios de cultivo celular incluyeron 5A de McCoy (INVITROGEN, Carlsbad, CA) para HCT116, HCT116 ($p53^{-/-}$) y SW480, RPMI-1640 (INVITROGEN) para H460 y H1299. Los medios de cultivo celular se complementaron con el 10% de suero bovino fetal (HYCLONE, Logan, UT), penicilina 100 unidades/ml, estreptomina 100 µg/ml y anfotericina B 250 ng/ml (MEDIATECH, Hemdon, VA). La transfección se realizó con Lipofectamine 2000 (INVITROGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fármacos anticancerígenos usados en el estudio, incluyendo 5-fluorouracilo (5-FU, 50 µg/ml) y clorhidrato de doxorubicina (DOX, 0,4 µg/ml) se adquirieron de SIGMA (ST. Louis, MO). Todos los fármacos se disolvieron en DMSO y se diluyeron hasta concentraciones apropiadas con medios de cultivo celular.

Plásmidos y construcción

25 Se subclonó un ácido nucleico que codifica para Horn mediante la técnica basada en PCR en el vector pCS2+, etiqueta GFP. Los constructos se verificaron mediante traducción y secuenciación *in vitro*.

Microscopía confocal

30 Se sembraron células HCT116 en portaobjetos de cámara de vidrio y se transfectaron con constructos de expresión Hom-GFP. Veinticuatro horas después, las células se fijaron con paraformaldehído en PBS, y se contratiñeron mediante yoduro de propidio (PI, SIGMA). Tras cuatro lavados en PBS durante 5 min cada uno, se montaron los portaobjetos y se analizaron mediante microscopía confocal.

35 *Ensayo de crecimiento y apoptosis*

Se recogieron células, incluyendo las células unidas más las flotantes en el medio y se fijaron en una disolución que contenía una concentración final de formaldehído al 3,7%, Nonidet P-40 al 0,5% y 4',6-diamidino-2-fenilindol 10 µg/ml en PBS. Se evaluó la apoptosis a través de visualización microscópica de cromatina condensada y micronucleación. Se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes durante cada condición, y se contó un mínimo de 400 células en cada medición.

45 Se midió el crecimiento celular mediante ensayo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTT) en placas de 96 pocillos (8.000 células por pocillo) usando el ensayo CellTiter 96 Aqueous One Solution (PROMEGA, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la A_{490 nm} usando un lector de microplacas ajustable VERSAmax (Sunnyvale, CA). Las células tratadas con vehículo fueron como 1 (100%). Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió al menos dos veces.

50 *Ensayo de formación de colonias*

Se transfectaron las células con Lipofectamine 2000 (INVITROGEN) durante 24 h en placas de cultivo celular de 100 mm según las instrucciones del fabricante. Entonces, se recogieron las células y se clasificaron en células positivas para GFP-Vector o GFP-Hom1 usando un citómetro de flujo de clasificación FAC G4 (BD Biosciences). Estas células positivas para GFP se sembraron en placa en placas de seis pocillos a diluciones de 1 × 10⁵ células cada pocillo. Se permitió que las células crecieran durante 5-10 días antes de la tinción con cristal violeta (SIGMA). Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, y se obtuvieron resultados similares en cada ensayo.

Tumores de xenoinjerto y tinción tisular

60 Todos los experimentos con animales se aprobaron por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en la Facultad de Medicina de Harvard. Se transfectaron las células con Lipofectamine 2000 (INVITROGEN) durante 24 h en placas de cultivo celular de 100 mm. Entonces, se recogieron las células y se clasificaron en células positivas para vector-GFP o Hom-GFP usando un citómetro de flujo de clasificación FAC G4 (BD BIOSCIENCES). Se establecieron tumores de xenoinjerto mediante inyección por vía s.c. de 1 × 10⁵ células HCT116 ($p53^{+/+}$) o HCT116 ($p53^{-/-}$) positivas para vector-GFP o Hom-GFP en ambos costados de ratones desnudos atímicos hembras de 5 a 6 semanas de edad (SIMONSEN LABORATORIES, Gilroy, CA). Al mismo tiempo, también se inyectaron por

vía s.c. 1×10^6 células no clasificadas incluyendo las positivas y las negativas para GFP en otros ratones desnudos para establecer un modo de tumores de xenoinjerto no clasificados. Se monitorizó el crecimiento tumoral tres veces a la semana mediante calibres para calcular los volúmenes tumorales según la fórmula (longitud x anchura²) / 2. Se fijó inmediatamente el tejido de tumores de xenoinjerto en formalina tamponada neutra al 10%. Entonces se incrustaron los tejidos en parafina y se cortaron. Se tiñeron los cortes con hematoxilina y eosina (H&E), y entonces se sometieron a análisis histológico. Se realizó la tinción de marcaje de extremo de mella terminal mediante dUTP mediado por desoxirribonucleotidil transferasa (TUNEL) usando transferasa terminal recombinante (ROCHE, Indianápolis, IN) y dUTP-Alexa 594 (MOLECULAR PROBES) según las instrucciones de los fabricantes y se contratiñó mediante 4',6-diamidino-2-fenilindol. Todas las imágenes se adquirieron con un microscopio de fluorescencia Nikon TS800 usando un software de obtención de imágenes de cámara SPOT.

Fraccionamiento celular

Se recogieron células flotantes y unidas de dos placas de 60 cm² mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón de homogenización (sacarosa 0,25 mol/l, HEPES 10 mmol/l (pH 7,4) y EGTA 1 mmol/l) y se sometieron a 40 pulsos de homogenización en hielo en un homogeneizador Dounce de 2 ml. Se centrifugaron los homogeneizados a 1.000 x g a 4°C durante 10 minutos para sedimentar los núcleos. Posteriormente se centrifugó el sobrenadante a 14.000 x g a 4°C durante 30 minutos para obtener fracciones citosólicas (sobrenadante).

Inmunotransferencia de tipo Western

Se purificaron las fracciones mitocondriales y citosólicas, lisados celulares totales, y se separaron mediante electroforesis en gel de Tris-glicina al 4-20% (INVITROGEN, Carlsbad, CA). Para el análisis de caspasa-3 activa, PARP y Hom, se extrajeron y se separaron las células totales mediante electroforesis en gel de Tris-glicina al 4-20% (INVITROGEN). Los anticuerpos usados incluyen GFP (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), Histona-1 (Ac-1, NEOMARKERS, Fremont, CA), y β -actina (SIGMA), caspasa-3 activa (BD BIOSCIENCES) y PARP (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, Boston, MA). Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa del rábano apropiados para detectar el complejo anticuerpos primario-antígeno unidos y se revelaron con reactivo de quimioluminiscencia de inmunotransferencia de tipo Western, Western Lightning® Plus (PERKINELMER, Boston, MA).

Transcripción inversa-PCR

Se aisló el ARN total usando el reactivo TRIzol® (INVITROGEN) según las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc de primera cadena usando la transcriptasa inversa Superscript II (INVITROGEN). Posteriormente, se sometió cada mezcla de reacción de RT a amplificación con PCR variando el número de ciclos desde 20 (*GAPDH*) hasta 35 (*Hom*). Cada ciclo consistió en una etapa de desnaturalización con calor (94°C durante 60 segundos), una etapa de apareamiento (57°C durante 30 segundos) y una etapa de extensión (72°C durante 30 segundos). Los productos de PCR se fraccionaron por tamaño en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Los cebadores usados para amplificar *Hom* incluyeron: 5'-AAGGCAATTAGGCGCTGCTT-3' y 5'-ACAGAACAACCTGAGTCCTCCA-3'.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm DE. El análisis estadístico se evaluó mediante análisis de ANOVA en el que se realizaron múltiples comparaciones mediante el uso del método de diferencia menos significativa. Las diferencias se consideraron significativas si la probabilidad de la diferencia que se produce por casualidad fue de <5 en 100 ($P < 0,05$).

Resultados

Hom-1 codificaba para una proteína nuclear

Hom-1 es un homólogo humano de Xom de *Xenopus* y comparte homología de estructura similar. Para identificar la localización intracelular de Hom-1, se construyó un vector de expresión que codifica para una proteína Hom-1 de longitud completa con una etiqueta GFP amino-terminal. Se transfectaron los constructos en células de cáncer de colon HCT116 y se visualizó la distribución intracelular de la proteína quimérica con microscopía confocal. Se marcaron los núcleos de las células HCT116 con tinción de PI. Se encontró que Hom-1 se dirigía a los núcleos de las células transfectadas, donde se colocaliza con PI. Para verificar adicionalmente la localización nuclear de Hom-1, se usó gradiente de sacarosa para fraccionar los compartimentos subcelulares antes de determinar la distribución de Hom-1 en cada compartimento con análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se encontró que Hom-1 está enriquecido en la fracción nuclear de las células transfectadas, mientras que GFP está enriquecido en el compartimento citoplasmático de las células transfectadas.

Hom suprimió el crecimiento de células cancerosas humanas a través de la inducción de apoptosis

Tal como se comentó anteriormente, Hom-1 es un antagonista de la señalización de Wnt oncogénica. Para determinar los efectos de Hom-1 sobre el crecimiento de tumores sólidos, se llevaron a cabo ensayos para examinar los efectos de Hom-1 sobre el crecimiento de células cancerosas humanas.

5 Se encontró que las células de cáncer de colon HCT116, las células de cáncer de pulmón H460 y una célula renal embrionaria humana 293T (transformada con E1a de adenovirus y que porta un antígeno T sensible a la temperatura coseleccionado con neomicina) se transfectaban con el vector de expresión que codifica para GFP-Hom-1 o GFP. Para las tres líneas celulares, aproximadamente el 35-50% de las células se transfectaron tal como se indica mediante la señal de GFP. Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se analizó el crecimiento celular
10 mediante ensayo de MTS, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se encontró que GFP no ejercía ningún efecto sobre el crecimiento de las células sometidas a prueba. Sin embargo, GFP-Hom-1 ejerció una fuerte inhibición sobre el crecimiento de las células cancerosas sometidas a prueba. Resulta interesante que los efectos inhibidores sobre el crecimiento de GFP-Hom-1 fueron mínimos en la línea celular 293T
15 no cancerosa. Estos hallazgos están de acuerdo con la observación previa denominada adición oncogénica (para rutas oncogénicas).

Además, se realizó un ensayo de formación de colonias para investigar el efecto de Hom-1 sobre la supervivencia celular a largo plazo. Se transfectaron de manera transitoria células HCT116 con plásmidos que codifican para GFP-Hom-1 o GFP. Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se recogieron las células y se clasificaron mediante señal de GFP y luego se sembraron en placa en placas de seis pocillos a una dilución de 1×10^5 células por pocillo. Veinticuatro horas tras la siembra en placa, se visualizaron las células de colon HCT116 (el 90% unidas a la placa) con microscopía fluorescente y microscopía de contraste de fases. Noventa y seis horas tras la siembra en placa, se examinaron de nuevo las células transfectadas con microscopía de contraste de fases y microscopía fluorescente.
20

Se encontró que se identificaban pocas células positivas para GFP como bien transfectadas con GFP-Hom-1 a las 96 horas tras la siembra en placa, lo que sugiere que GFP-Hom-1 suprime el crecimiento de las células transfectadas. También se observaron resultados similares en otras líneas celulares de cáncer humano incluyendo Sw480, H460 y H1299. De acuerdo con los resultados de los estudios de transfección transitorios, el crecimiento de las células 293T sólo se inhibió ligeramente por GFP-Hom-1. El crecimiento a largo plazo de las células transfectadas clasificadas mostró que se formaban múltiples colonias en las células transfectadas con GFP, mientras que se desarrollaron muy pocas colonias en las células transfectadas con GFP-Hom-1. Sólo hubo una reducción del 20% en el número de colonias en las células 293T transfectadas con GFP-Hom-1.
25

Para determinar si esta supresión del crecimiento era el resultado de la apoptosis en células transfectadas con GFP-Hom-1, se evaluó la apoptosis a través de visualización microscópica de las células transfectadas para determinar la presencia de características apoptóticas, tales como cromatina condensada y micronucleación mediante una tinción de Hoechst 33258 tal como se describió previamente (Waldman T, *et al.* Nature 1996, 381:713). Se encontró que la GFP no inducía apoptosis celular, mientras que GFP-Hom-1 inducía una cantidad significativa de apoptosis celular en líneas celulares de cáncer humano. Además, GFP-Hom-1 no inducía apoptosis en células 293T, una línea celular no cancerosa.
30

Estos resultados sugirieron que Hom-1 es un potente inductor de la supresión del crecimiento en células cancerosas humanas, y el efecto es parcialmente a través de la inducción de apoptosis. Los efectos de la inhibición del crecimiento de Hom-1 son significativamente menores en las células 293T humanas no cancerosas, lo que puede reflejar los fenómenos observados previamente de adición oncogénica para la ruta oncogénica.
35

Muerte celular apoptótica inducida por Hom-1 en células deficientes en p53

P53 es un gen supresor tumoral crítico. Más del cincuenta por ciento de los cánceres albergan p53 inactivo como resultado de mutaciones directas en el gen *p53*. Para determinar si el efecto de supresión tumoral de Hom-1 se basa en p53 funcional, se realizaron ensayos para investigar el efecto de Hom-1 sobre tres líneas de células cancerosas, HCT116 p53KO, H1299 nulas para p53 y SW480 con p53 mutado, donde la función de p53 se ha perdido o bien como resultado de mutación o de inactivación artificial. Los métodos para analizar los efectos de Hom-1 sobre el crecimiento de estas células cancerosas son esencialmente iguales a los descritos anteriormente.
40

Se llevaron a cabo ensayos de MTS, ensayos de crecimiento celular *in vitro* y ensayos de formación de colonias. Los resultados mostraron que Hom-1 inhibió fuertemente el crecimiento de estas células cancerosas sometidas a prueba que carecen de p53 funcional ($P < 0,01$, respectivamente). En células deficientes en p53, Hom-1 también indujo apoptosis tal como se indica mediante figuras apoptóticas.
45

Hom-1 indujo activación de caspasa-3

La caspasa-3 es un ejecutor crítico de la apoptosis. Es responsable, o bien parcial o bien totalmente, de la escisión proteolítica de muchas proteínas claves tales como la enzima nuclear poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). La caspasa-3 se ha identificado como un mediador clave de la apoptosis en células de mamífero. La inducción de la
50

apoptosis conduce a la escisión de la procaspasa-3 y a la generación de una caspasa-3 activa de 17 kDa y fragmentos de caspasa-3 de 12 kDa. La caspasa 3 activa selecciona entonces como diana moduladores clave de la ruta apoptótica incluyendo PARP y otras caspasas.

5 Para investigar si la activación de la caspasa-3 está implicada en la apoptosis mediada por Horn, se extrajeron las proteínas totales y se analizó la activación de caspasa-3 mediante ensayo de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo frente a caspasa-3 activa. Se encontró que la expresión de GFP-Hom-1, pero no la de GFP, activaba la caspasa-3 en células cancerosas tanto suficientes como deficientes en p53. Estos resultados sugirieron que Hom-1 inducía la activación de caspasa-3 de una manera independiente de p53.

10 *Hom-1 reprimió el crecimiento de tumores induciendo muerte celular apoptótica in vivo*

15 Para identificar si Hom-1 confiere actividad antitumoral *in vivo*, se transfectaron tanto la línea celular HCT116 con p53 de tipo natural (WT) como la línea celular HCT116 con inactivación de p53 (KO) con vectores de expresión que codifican para GFP o GFP-Hom-1. La tasa de transfección fue de aproximadamente el 35-40% (figura 6A). Las tasas de crecimiento de estas células transfectadas se determinaron inyectando las células por vía subcutánea en el lomo de ratones desnudos. Las células que expresaban GFP se inyectaron en el lado izquierdo del lomo, mientras que las células que expresaban GFP-Hom-1 se inyectaron en el lado derecho del lomo. Se examinaron los crecimientos de los tumores *in situ* y como escisiones (figura 6B).

20 Se encontró que GFP-Hom-1, pero no GFP, reprimió el crecimiento tumoral *in vivo* de células HCT116 tanto suficientes en p53 como deficientes en p53. La tinción con H&E y el análisis de la apoptosis *in situ* mediante tinción de TUNEL mostraron que los tumores que expresan Hom-1 demostraron un gran número de ADN fragmentado, lo que sugiere que Hom-1 reprimió el crecimiento tumoral *in vivo* mediante la inducción de muerte celular apoptótica.

25 Ejemplo 3: El inhibidor de Hom-1 redujo la expresión de citocinas

30 Se realizaron ensayos para determinar si Hom-1 regula la expresión de citocinas proinflamatorias, por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), y factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), en linfocitos. Específicamente, se determinó si inhibir Hom-1 de una célula, a través de un agente de iARN, reduciría la expresión de las citocinas.

35 Se cultivaron células U937 células monocíticas indiferenciadas durante cuatro días en medios que incluían M-CSF, que induce diferenciación de monocitos. Las células se sometieron a electroporación con un agente de iARN dirigido contra o bien Hom-1 (constructo 3) o bien GFP y luego se cultivaron durante otros tres días. Se estimó que sólo la mitad de las células sometidas a electroporación internalizaban de manera satisfactoria el agente de iARN. Entonces se incluyó lipopolisacárido (LPS, 1 µg/ml) en los medios de cultivo para iniciar la expresión de citocina; las células se recogieron veinticuatro horas más tarde. De la manera descrita anteriormente en el ejemplo I, se extrajo el ARN total de las células, se realizó RT-PCR en el ARN extraído y la PCR en tiempo real cuantificó el nivel de ARNm de IL-1, IL-6, IL-8 o TNF-alfa de las células.

40 Se encontró que los niveles de ARNm de las citocinas estaban enormemente reducidos en las células sometidas a electroporación con el agente de iARN contra Hom-1. El nivel de ARNm para cada una de las citocinas se redujo en desde el 40% hasta el 60% en relación con las células de control (es decir, las células sometidas a electroporación con un agente de iARN contra GFP). Dado que aproximadamente sólo la mitad de las células internalizaron el agente de iARN, las magnitudes reales de la inhibición fueron mayores del 40-60% y deberían ser del 100% o cerca del 100%.

50 Los resultados sugirieron que pueden usarse inhibidores de Hom-1, tales como agentes de iARN, para reducir la expresión de citocinas proinflamatorias, tratando de ese modo SDRA y otros trastornos similares de las vías respiratorias/pulmón que están mediados por estas citocinas.

Ejemplo 4: Hom-1 promovió el desarrollo de linfocitos.

55 La expresión de Hom-1 se expresa altamente en células de linaje linfóide y mielóide normales. Su expresión está regulada por incremento durante la maduración de las células hematopoyéticas.

60 En estos experimentos se usaron células U937 monocíticas indiferenciadas que contienen o bien GFP^{Tet} o bien GFPHom-1^{Tet}. GFP^{Tet} y GFPHom-1^{Tet} son transgenes que se activan cuando se exponen a tetraciclina (Tet) y de ese modo sobreexpresan GFP y una fusión de GFP y Hom-1, respectivamente. Las células se cultivaron en medios que incluían Tet durante 48 horas. Entonces se añadió LPS tal como se describió anteriormente y se recogieron las células veinticuatro horas más tarde. Se determinaron los niveles de ARNm de IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa o M-CSF de la misma manera que se describió anteriormente.

65 Se encontró que los niveles de ARNm de las citocinas estaban aumentados considerablemente en células que sobreexpresan Hom-1. Eran aproximadamente de diez a más de trescientas veces mayores que los niveles en las

células de control, que sólo sobreexpresaban GFP. Los resultados demuestran que Hom-1 promueve la maduración y diferenciación de linfocitos.

5 Se llevaron a cabo ensayos adicionales para examinar los papeles de Hom-1 en monocitos y macrófagos, que son elementos clave de la inmunidad tanto innata como adaptativa. Se encontró que Hom-1 desempeña un papel fundamental en la diferenciación de monocitos en macrófagos.

10 Más específicamente, la represión de la expresión de Hom-1 en monocitos primarios afectó profundamente a la diferenciación de macrófagos terminales. La inactivación de la expresión de Hom-1 en monocitos usando el ARNic descrito anteriormente anuló la morfogénesis de la forma de tipo fibroblasto y disminuyó sustancialmente la expresión del marcador CD71 de la superficie celular, FcγRI CD64, CD40, CD86, integrinas CD11b y CD11c, TLR4 (receptor 4 de tipo Toll), MR (receptor de manosa) y CD14. Resulta interesante que la inactivación no disminuyó la viabilidad de los monocitos primarios tal como se determina mediante exclusión de azul tripano. La expresión de otras moléculas de la superficie celular, tales como HLA-DR, no resultó afectada por la inactivación de Hom-1, descartando la posibilidad de que la diferenciación disminuida de monocitos en macrófagos puede resultar de la citotoxicidad de la supresión de Hom-1. Además, los monocitos transfectados con ARNic mostraron actividad fagocitótica reducida en comparación con las células de control, lo que sugiere que se requiere Hom-1 para el desarrollo funcional durante la diferenciación de monocitos en macrófagos.

20 A la inversa, la sobreexpresión de Hom-1 en monocitos aceleró la diferenciación de monocitos para dar macrófagos, tal como se indica por la expresión elevada de CD71 sobre la superficie de células transfectadas. De manera similar, la expresión ectópica de Hom-1 en células U937 mieloides desencadenó su diferenciación con características de macrófagos prominentes, incluyendo la expresión de los marcadores mencionados anteriormente, cambios pronunciados en la morfología (las células se vuelven adherentes y aplanadas con considerables pseudópodos), actividad fagocitótica potenciada y secreción aumentada de citocinas proinflamatorias. Los resultados mostraron adicionalmente que el receptor de M-CSF es una diana transcripcional directa de Hom-1.

30 El hecho de que la expresión de Hom-1 se correlacionara positivamente con la expresión de varias citocinas proinflamatorias en pacientes clínicos sugirió que Hom-1 desempeña un papel significativo en la patogenia y el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Lista de secuencias

35 <110> Zhu, Zhenglun Gao, Hong

<120> TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE TRASTORNOS INMUNITARIOS

<130> 218008-0002U

40 <140> Documento US 14/294.565

<141> 03-06-2014

<150> Documento US 13/382.641

<151> 12-03-2012

45

<150> Documento PCT/US10/42126

<151> 15-07-2010

50

<150> 61/225.852

<151> 15-07-2009

<160> 21

55

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 258

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

<400> 1

ES 2 707 590 T3

Met Arg Leu Ser Ser Ser Pro Pro Arg Gly Pro Gln Gln Leu Ser Ser
 1 5 10 15

Phe Gly Ser Val Asp Trp Leu Ser Gln Ser Ser Cys Ser Gly Pro Thr
 20 25 30

His Thr Pro Arg Pro Ala Asp Phe Ser Leu Gly Ser Leu Pro Gly Pro
 35 40 45

Gly Gln Thr Ser Gly Ala Arg Glu Pro Pro Gln Ala Val Ser Ile Lys
 50 55 60

Glu Ala Ala Gly Ser Ser Asn Leu Pro Ala Pro Glu Arg Thr Met Ala
 65 70 75 80

Gly Leu Ser Lys Glu Pro Asn Thr Leu Arg Ala Pro Arg Val Arg Thr
 85 90 95

Ala Phe Thr Met Glu Gln Val Arg Thr Leu Glu Gly Val Phe Gln His
 100 105 110

His Gln Tyr Leu Ser Pro Leu Glu Arg Lys Arg Leu Ala Arg Glu Met
 115 120 125

Gln Leu Ser Glu Val Gln Ile Lys Thr Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met
 130 135 140

Lys His Lys Arg Gln Met Gln Asp Pro Gln Leu His Ser Pro Phe Ser
 145 150 155 160

Gly Ser Leu His Ala Pro Pro Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

Ala Asn Gly Leu Gln Leu Leu Cys Pro Trp Ala Pro Leu Ser Gly Pro
 180 185 190

Gln Ala Leu Met Leu Pro Pro Gly Ser Phe Trp Gly Leu Cys Gln Val
 195 200 205

Ala Gln Glu Ala Leu Ala Ser Ala Gly Ala Ser Cys Cys Gly Gln Pro
 210 215 220

Leu Ala Ser His Pro Pro Thr Pro Gly Arg Pro Ser Leu Gly Pro Ala
 225 230 235 240

Leu Ser Thr Gly Pro Arg Gly Leu Cys Ala Met Pro Gln Thr Gly Asp
 245 250 255

Ala Phe

- 5 <210> 2
- <211> 777
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

- 10 <400> 2

ES 2 707 590 T3

atgcgcctct cctcctcccc acctcgtggc cgcgagcagc tctccagctt tggctccgtg 60
 gactggctct cccagagcag ctgctcaggg cgcacccaca cccccaggcc tgccgacttc 120
 tccctgggga gcctccctgg cccaggccag acatccggcg cccgggagcc ccctcaggcc 180
 gtcagcatca aggaggccgc cgggtcctca aatctgcctg cgccggagag gaccatggcc 240
 gggttgagta aggagcctaa taccttgcgg gccccccgtg tccgcacagc cttcaccatg 300
 gagcaggacc gcaccttga gggcgtctc cagcaccacc agtacctgag ccctctggag 360
 cgggaagaggc tggccagggg gatgcagctc tcagaggctc agataaaaac ctggtttcag 420
 aatcgccgca tgaaacacaa acggcaaatg caggaccccc agctgcacag cccttctctg 480
 gggctctctc atgcgcccc agctttctac tcaacgtctt ctggccttgc caatggcctg 540
 cagctgctgt gcccttgggc acccctgtcc gggccccagg ctctgatgct gccccctggc 600
 tccttctggg gtctctgcc aagggcaca gaggcctgg catctgcggg agcttctctg 660
 tgcgggcagc ctctggcgtc ccacccccct accccaggcc ggccttcgct gggaccagcc 720
 ctgtccacgg ggcgccggg cctgtgtgct atgccacaga cgggggatgc attttga 777
 5
 <210> 3
 <211> 711
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 15
 <400> 3
 cgaatgcaga ggctcctgag atggccccgg agtgagtccc ccagaggagc cggattaggg 60
 ctggaggcgg ccgagtcccc cgagaggccc ctcccacat tcccgcccc gcgcgcccgt 120
 ccccgggtcc tccgctctc tttcccggga aagcctccct cggttcctgc gggccgcac 180
 agcctggacg cagcgcacgc gggcaccggc ctgactctcc caccocgaag cctgctccca 240
 acctaagtcc gccctgactc tcccagcctg aagcctgctc gccctcgggt gtccgggctg 300
 ggcacaggcg ccagcgtccc cctggagagg agaggtcgcc cggcacctcc caggacaggc 360
 ccaagtggga gtgggaccct cctaccttcc tgcagcctcg gcccggggg tggggggtg 420
 ggagagatga aaggaggatga ccgatcccga accatcgcct ctccattaac cagggccccc 480
 agccccgcc ctccccaga catcgaggag ccggggagggt gtgaacggcc tcctttgtgc 540
 ctctgaatcg aaggcaatta ggcgctgctt atctgggcat tagccgtgta tgcaaaccgg 600
 gctcccgcc cctcctcctg ggcttataaa cgcgcgcgcc tggcgaggcc cgaggtggat 660
 cctgcgcctg gccagcccc cctggccttc cctccggccc acctggccc c 711
 <210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25

ES 2 707 590 T3

<400> 4
ttcagaatcg ccgcatgaaa cacaacgg 29

5 <210> 5
<211> 61
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 5

Ala	Pro	Arg	Val	Arg	Thr	Ala	Phe	Thr	Met	Glu	Gln	Val	Arg	Thr	Leu
1				5					10					15	

Glu	Gly	Val	Phe	Gln	His	His	Gln	Tyr	Leu	Ser	Pro	Leu	Glu	Arg	Lys
			20					25					30		

Arg	Leu	Ala	Arg	Glu	Met	Gln	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Ile	Lys	Thr	Trp
		35					40					45			

Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	His	Lys	Arg	Gln	Met	Gln
	50					55					60	

15 <210> 6
<211> 29
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 6
uucagaaucg ccgcaugaaa cacaacgg 29

30 <210> 7
<211> 29
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 7
ucuacucaac gucuucuggc cuugccaau 29

40 <210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 8
tctactcaac gtctctggc ctgccaat 29

50 <210> 9
<211> 2428
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 707 590 T3

acctggccgc catgcgcctc tctcctccc cacctcgtgg cccgcagcag ctctccagct 60
 ttggctccgt ggactggctc tcccagagca gctgctcagg gccgaccac acccccaggc 120
 ctgccgactt ctccctgggg agcctccctg gcccaggcca gacatccggc gcccgggagc 180
 cccctcaggc cgtcagcatc aaggaggccg cggggtcctc aaatctgcct gcgccggaga 240
 ggaccatggc cgggttgagt aaggagccaa ataccttgcg gccccccgt gtccgcacag 300
 ccttcacat ggagcagtc cgcaccttg agggcgtctt ccagcaccac cagtacctga 360
 gccctctgga gcggaagagg ctggccaggg agatgcagct ctgagaggtc cagataaaaa 420
 cctggtttca gaatcgccgc atgaaacaca aacggcaaat gcaggacccc cagctgcaca 480
 gccccttctc ggggtctctc catgcgcccc cagctttcta ctcaacgtct tctggccttg 540
 ccaatggcct gcagctgctg tgccctggg caccctgtc cgggcccag gctctgatgc 600
 tgccccctgg ctccctctgg ggtctctgcc aagtggcaca agaggccctg geatctgcgg 660
 gagcttctctg ctgcgggcag cctctggcgt cccaccccc taccacaggc cggccttcgc 720
 tgggaccagc cctgtccacg gggccccggg gcctgtgtgc tatgccacag acgggggatg 780
 cattttgagg aggcacctct gactcccaca ctgcggtct tgctgatcgc acctggctcc 840
 tacctggagg actcagttgt tctgtttaca tctgtgtggc acctctcacc ctgaccaca 900
 caaagttct ggagattact ggagaatata tataaatata tatatgtacg tatatatgta 960
 aatacacata tacgtatata taaatatata tatacatatg tgtgtgtata tatatatata 1020
 tttttttttt tttttttttt tttgagacgg agtgttgctc tgtcaccag gctggagtgc 1080
 aatgacgcaa tctcggtca ctgcaacctc cgctcctgg gttcaagcga ttctccagcc 1140
 tcagcctccc gagtagctgg gattacagac accgccacc acgcccggct aatttttct 1200
 atttttagta gaaatggggt ttcacatgt tagccaggct ggtctcaaac tctgaccct 1260
 gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaagtg ctgggattac aggcatgagc cactgcaccc 1320
 ggccctgaga atatattat taaagccacc tcttactga aagttaccga aagagtcggt 1380
 ttaggaagga aacgaagggt cagtgaacag agtcaaatgc agaagtgggc ttgtcatggg 1440
 tagggctttc ggcgtacgat aaaaggatca tttgtttttt aaaaggggtt ggaaaaactg 1500
 gttttccagt tggaaacagt aaagttgta agctttgtgt gtacaaaaga aaacagggaa 1560
 tgcaggtgtg tttatagcgt tgtggttcaa gtccctctta acaagaactc caaagctgga 1620
 aagcaggagg gaacaaaggt gaacatgaag gcgaggatgc tggggcctg cagtgcgctc 1680
 taggctgtgc gtgagccggg actgtacca cagcttgctg agggctgctc ttcttgggcc 1740
 agggaaagca gggcagccgg gacctcggc tgtgcctgga ctgaagctgt cccgcaggtc 1800
 cccaccctcc aacacgtgct cacctgtccc cctcctcga gcagcctcg gacaaaaca 1860
 tgactcaagg acagcacttc tcgcagaagg tctggaagtg cccagaatgg gaggcacgga 1920
 agcccctccc ggggaggact cccgcgttga tggaccgttc ttggtgcaga ctctgactg 1980
 cgtgcatgaa acctgagaca agtgcaattc cttccatgtc gcccagagt gcccaggagg 2040

ES 2 707 590 T3

	caggcagtgc ggggtgccca ggcagacggg ttcagcctgc agaactggag gcgacctgtg	2100
	aaaccacccc gggcacccca acaggaacag aagcgtggtc ctgcggctgc gtccccagcg	2160
	agtttcaactt tccccttgct cgtttctccc ttgttgtaag tgtttacaac tggcatgtgc	2220
	ttttaaacgt caggtaaagag ggaacagct gctgtacatc gtccctggcga gtgacaatgt	2280
	gacagaagcc tgggcgaggc cctcggaggg cagcagctgg acaggggcta ctgggtttgg	2340
	cctggacagc actgatttgt ggatgtggat gggggcacgt tgtccgtgat aaaagtacaa	2400
	gtgccctca caaaaaaaaa aaaaaaaaa	2428
5	<210> 10 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 10 caaatctgcc tgcgccggag aggaccatg	29
15	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 11 cggactacag gggagtttg ttg	23
25	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 12 tccagcatcc aggtggcgac gat	23
35	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 13 aaccctttc cccctcgtct	20
45	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<400> 14	

agcacctgtg aggtggctgc 20
 <210> 15
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 10 <400> 15
 aaggcaatta ggcgtgctt 20
 <210> 16
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 16
 acagaacaac tgagtcctcc a 21
 25 <210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 17
 35 aattgaattc aatgcgctc tcctcctcc 29
 <210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 18
 45 ttaatctaga tcatcaaaat gcatccccg tctg 34
 <210> 19
 <211> 60
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 55 <400> 19

ES 2 707 590 T3

Arg Leu Arg Thr Ala Phe Thr Ser Asp Gln Ile Ser Thr Leu Glu Lys
1 5 10 15

Thr Phe Gln Lys His Arg Tyr Leu Gly Ala Ser Glu Arg Gln Lys Leu
20 25 30

Ala Ala Lys Leu Gln Leu Ser Glu Val Gln Ile Lys Thr Trp Phe Gln
35 40 45

Asn Arg Arg Met Lys Tyr Lys Arg Glu Ile Gln Asp
50 55 60

<210> 20

<211> 258

<212> PRT

<213> *Pan troglodytes*

<400> 20

Met Arg Leu Ser Ser Ser Pro Pro Arg Gly Arg Gln Gln Leu Ser Ser
1 5 10 15

Phe Gly Ser Val Asp Trp Leu Ser Gln Ser Ser Cys Ser Gly Pro Thr
20 25 30

His Thr Pro Arg Pro Ala Asp Phe Ser Leu Gly Ser Leu Pro Gly Pro
35 40 45

Gly Gln Thr Ser Gly Ala Arg Glu Pro Pro Gln Ala Val Ser Ile Lys
50 55 60

Glu Ala Ala Arg Ser Ser Asn Leu Pro Ala Pro Glu Arg Thr Val Ala
65 70 75 80

Gly Leu Ser Lys Glu Pro Asn Thr Leu Arg Val Pro Arg Val Arg Thr
85 90 95

Ala Phe Thr Met Glu Gln Val Arg Thr Leu Glu Gly Val Phe Gln His
100 105 110

His Gln Tyr Leu Ser Pro Leu Glu Arg Lys Arg Leu Ala Arg Glu Met
115 120 125

10 Gln Leu Ser Glu Val Gln Ile Lys Thr Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met

ES 2 707 590 T3

130

135

140

Lys His Lys Arg Gln Met Gln Asp Pro Gln Leu His Ser Pro Phe Ser
145 150 155 160

Gly Ser Leu Pro Ala Pro Pro Ala Phe Tyr Ser Pro Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Ala Asn Gly Leu Gln Leu Leu Cys Pro Trp Ala Pro Leu Ser Gly Pro
180 185 190

Gln Ala Leu Met Leu Pro Pro Gly Ser Phe Trp Gly Leu Cys Gln Val
195 200 205

Ala Gln Glu Ala Leu Ala Ser Val Gly Ala Ser Cys Cys Gly Gln Pro
210 215 220

Leu Ala Ser His Pro Pro Thr Pro Gly Arg Pro Thr Leu Gly Pro Ala
225 230 235 240

Leu Ser Thr Gly Pro Arg Gly Leu Cys Ala Met Pro Gln Thr Gly Asp
245 250 255

Ala Phe

<210> 21

<211> 260

5 <212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<400> 21

Met Arg Leu Ser Ser Ser Pro Pro Arg Gly Gln Gln Gln Pro Ser Ser
1 5 10 15

Phe Gly Ser Val Asp Trp Leu Ser Gln Ser Ser Cys Ser Gly Leu Thr
20 25 30

Pro Ser Pro Arg Pro Ala Asp Val Ser Pro Gly Ser Leu Pro Gly Pro
35 40 45

Gly Gln Ile Ser Gly Ala Arg Glu Pro Pro Gln Ala Ile Ser Ile Lys
50 55 60

Glu Ala Val Arg Arg Ser Ala Leu Pro Ser Pro Gln Pro Ser Met Pro
65 70 75 80

10 Gly Leu Ser Lys Glu Pro Asn Thr Leu Arg Gly Pro Arg Val Arg Thr

ES 2 707 590 T3

				85						90					95
Ala	Phe	Thr	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Thr	Leu	Glu	Gly	Val	Phe	Gln	His
			100					105					110		
His	Gln	Tyr	Leu	Ser	Pro	Leu	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu	Ala	Arg	Glu	Met
		115					120					125			
Gln	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Ile	Lys	Thr	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met
	130					135					140				
Lys	His	Lys	Arg	Gln	Met	Gln	Glu	Val	Pro	Pro	Asn	Ser	Pro	Phe	Leu
145					150					155					160
Gly	Ser	Leu	His	Val	Pro	Pro	Ala	Phe	His	Ser	Pro	Ser	Ser	Gly	Leu
				165					170					175	
Ala	Asn	Gly	Leu	Gln	Leu	Leu	Cys	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Pro	Gly	Pro
			180					185						190	
Gln	Ala	Leu	Met	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Phe	Trp	Gly	Leu	Cys	Gln	Val
		195					200					205			
Glu	Gln	Glu	Ala	Leu	Ala	Ser	Thr	Gly	Ala	Ser	Cys	Cys	Arg	Gln	Pro
		210				215					220				
Leu	Ala	His	His	Pro	Pro	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly
225					230					235					240
Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly	Pro	Trp	Gly	Leu	Cys	Ala	Leu	Pro	Glu	Thr
				245					250					255	
Gly	Asp	Ala	Phe												
			260												

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para gestionar el tratamiento de pacientes que comprende
- 5 determinar el nivel de expresión de un gen que codifica para un polipéptido que contiene la SEQ ID NO: 1 en una muestra obtenida del paciente en tratamiento para un trastorno inflamatorio o autoinmunitario,
- 10 comparar el nivel del gen que codifica para el polipéptido que contiene la SEQ ID NO: 1 con un nivel predeterminado para determinar si el paciente es adecuado para el tratamiento, en el que el nivel predeterminado se obtiene a partir de un sujeto normal o se obtiene a partir del paciente antes del tratamiento; y en el que una disminución del nivel de expresión del gen que codifica para el polipéptido que contiene la SEQ ID NO: 1 en el paciente después del tratamiento cuando se compara con el nivel predeterminado indica que el sujeto puede tratarse adicionalmente mediante el mismo tratamiento.
- 15 2. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que el método comprende además comunicar el nivel de expresión al paciente o a un médico o a un cuidador del paciente.
3. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que el estado es LES, EII, AR o rechazo de trasplante.
- 20 4. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es un inmunosupresor.
5. Método *in vitro* según la reivindicación 4, en el que el estado es LES, EII, AR o rechazo de trasplante.

A

Xom 176 RLRTAFTSDQISTLEKTFQKHYLGASEROKLAAKLQSEVQIKTUFQRRRMYKREIQD 235
 R+RTAFT +Q+ TLE FQ H+YL ER++LA ++QLSEVQIKTUFQRRRMYK+KR++QD
 Hom-1 93 RVRTAFTMEQVRTLEGVFQHHQYLSPLERKRLAREMQLSEVQIKTUFQRRRMYKHKROMQD 152

B

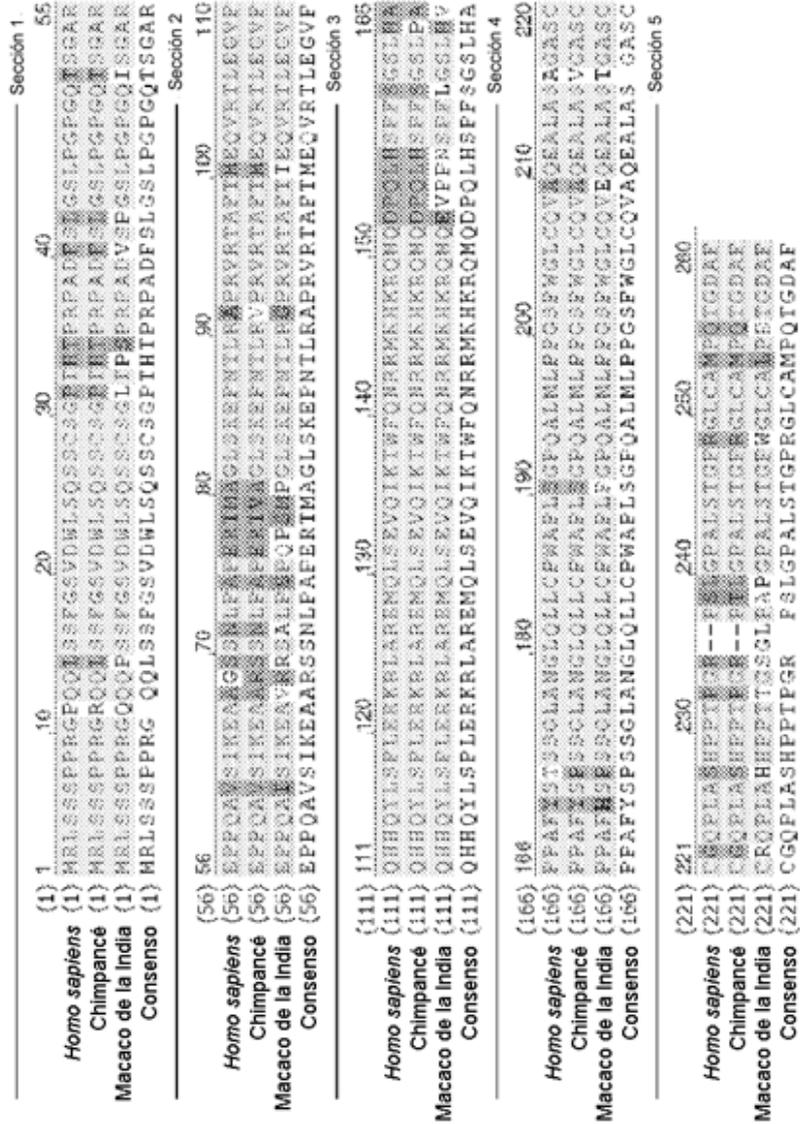


Figura 1

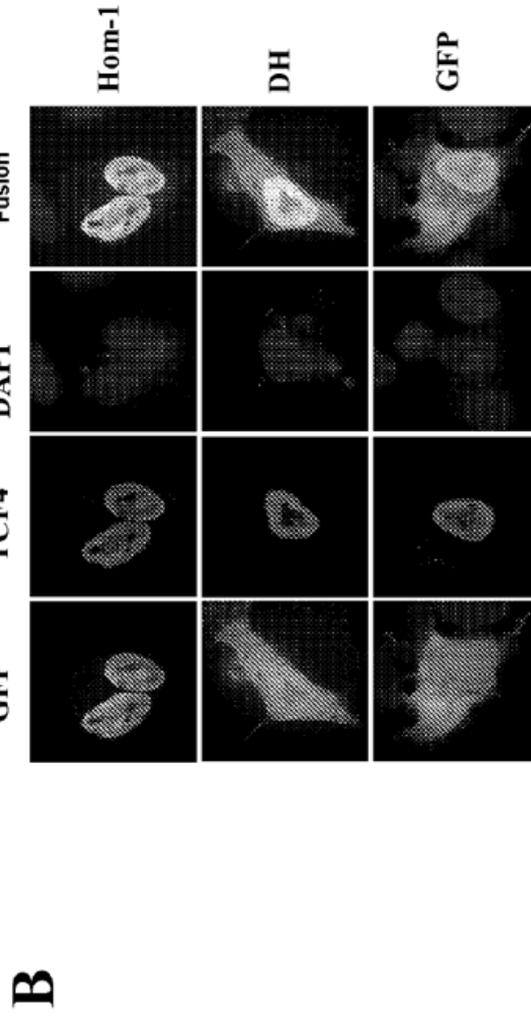
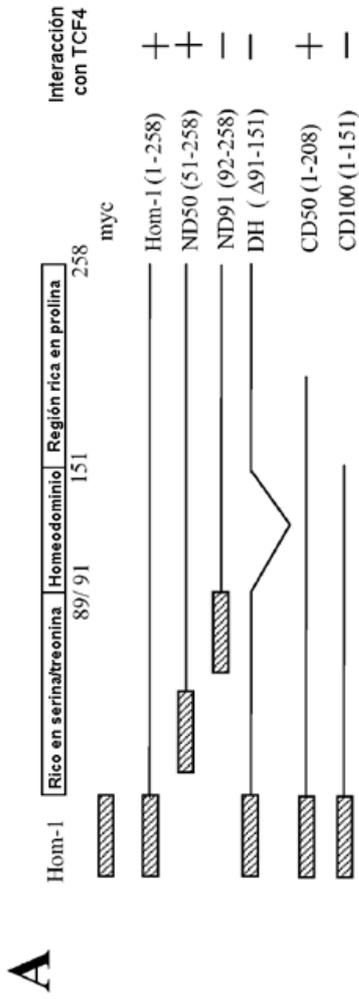


Figura 2

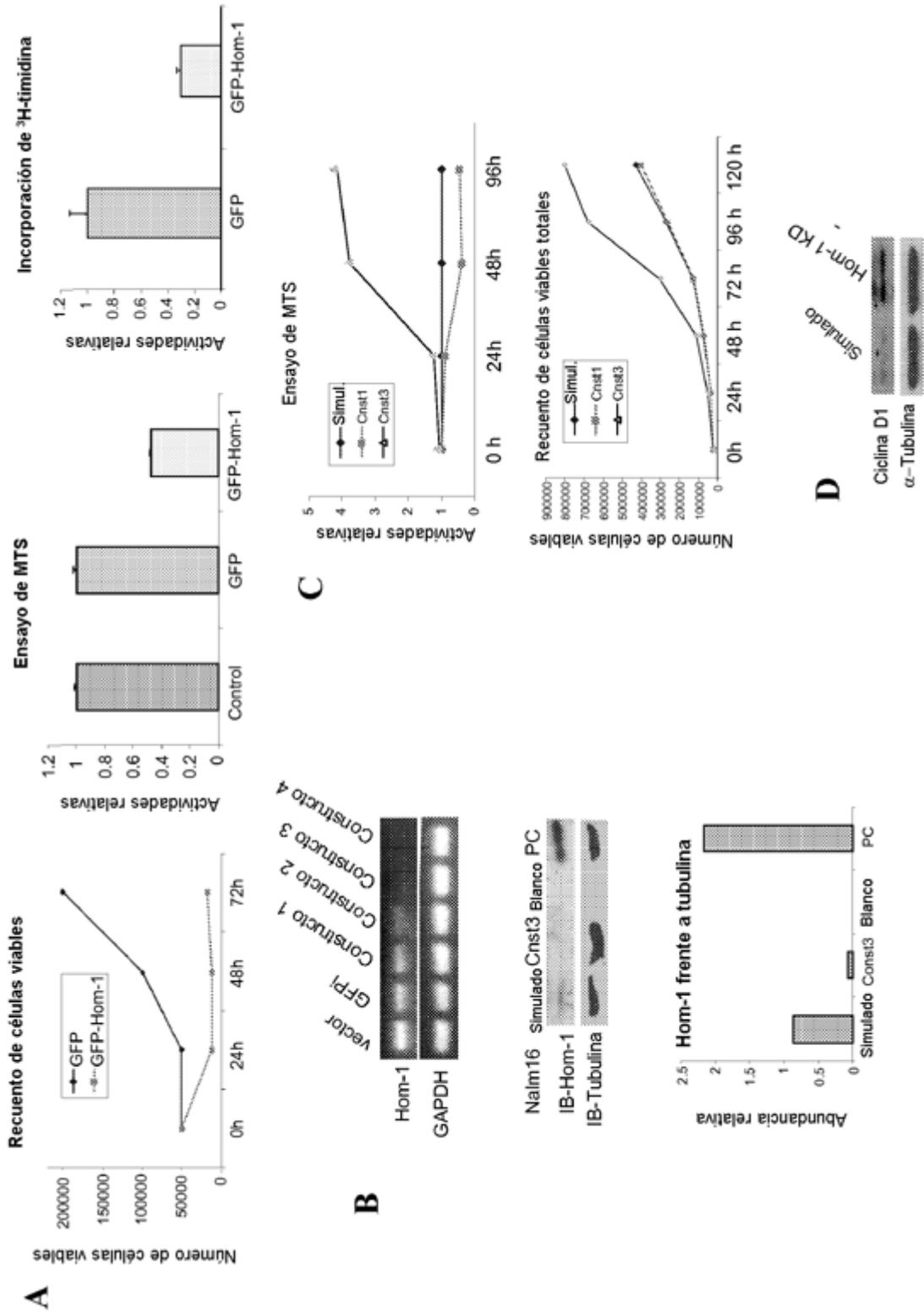


Figura 3

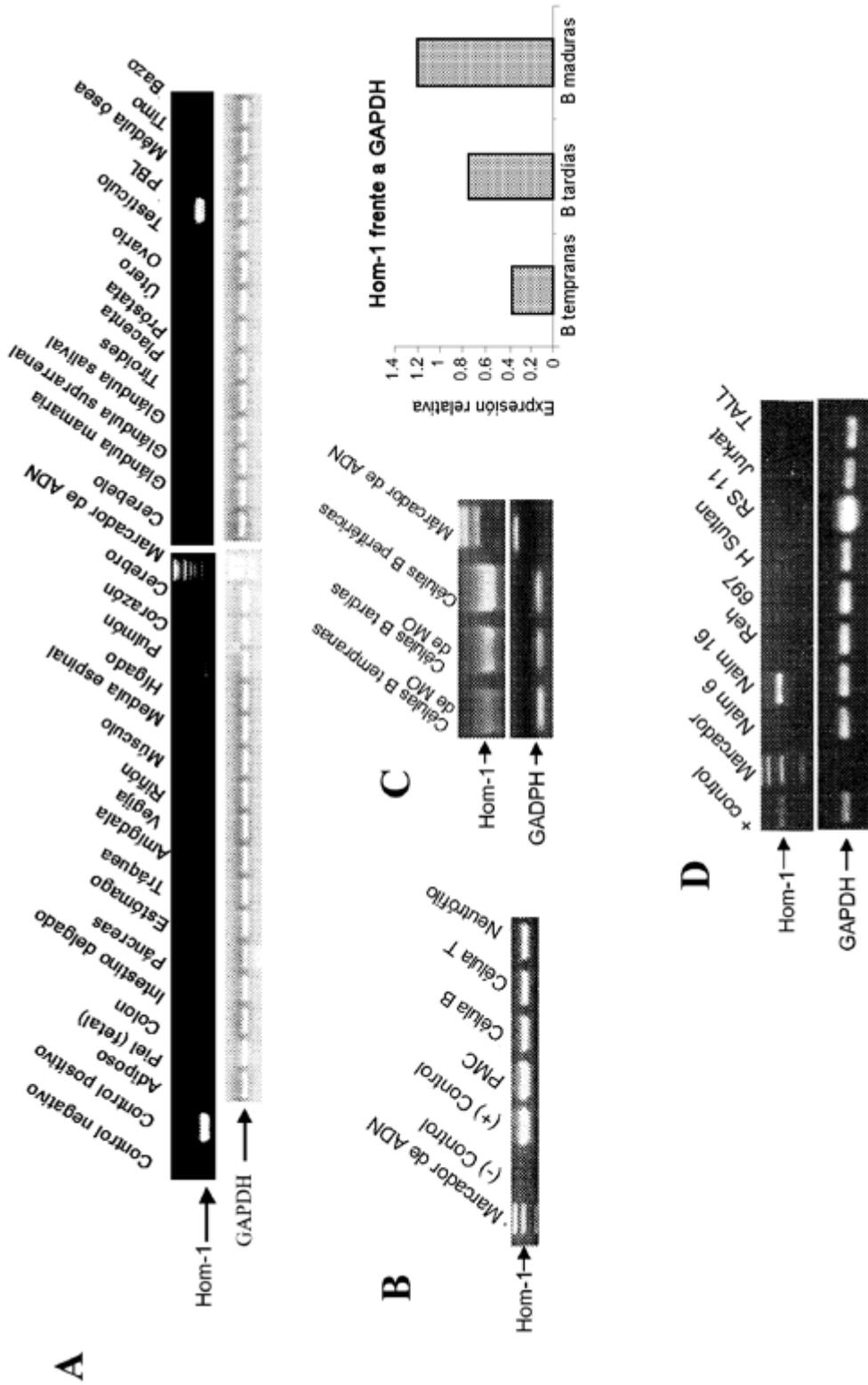


Figura 4

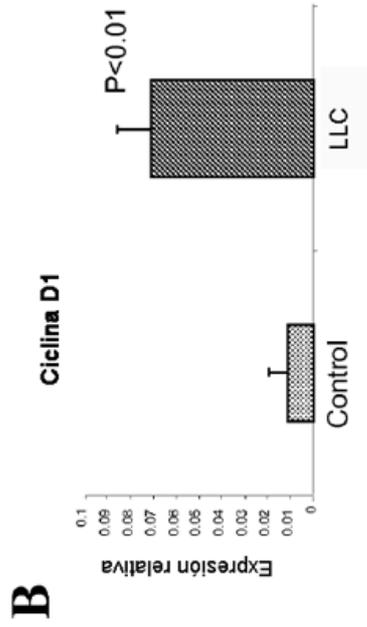
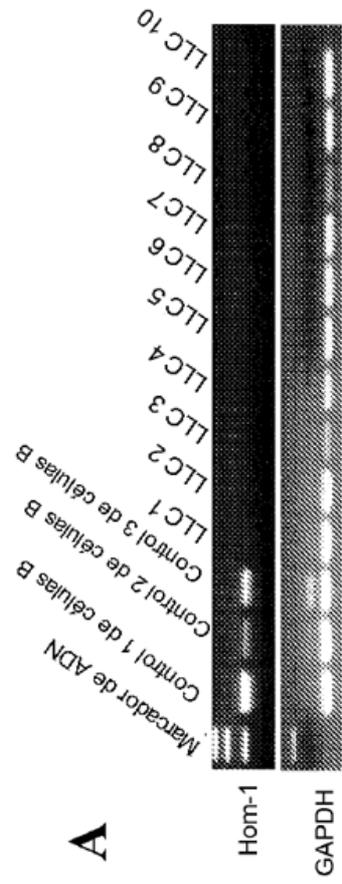


Figura 5

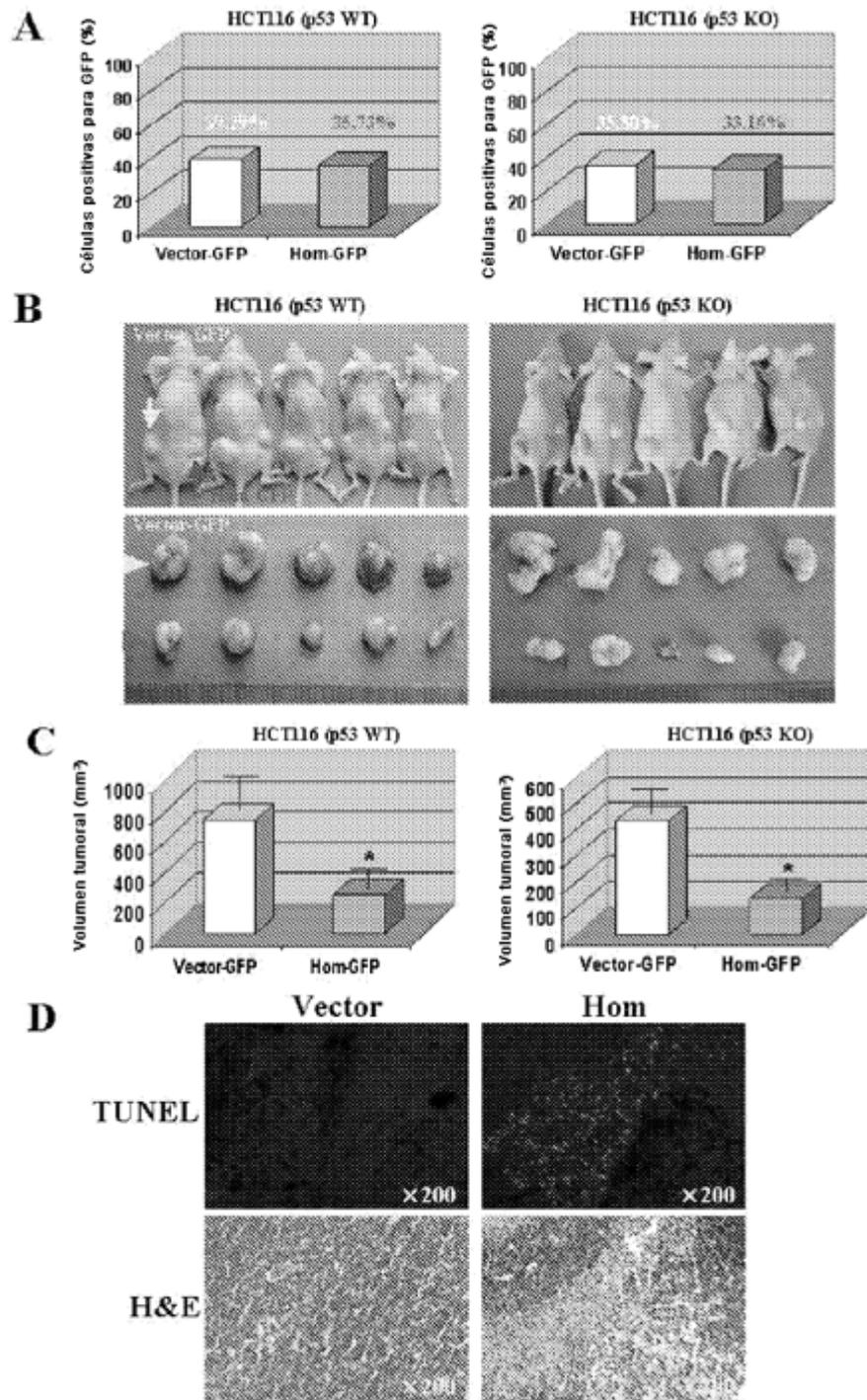


Figura 6