

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 662**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2019 PCT/IB2019/059379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2020 WO20089841**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2019 E 19802268 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3874273**

54 Título: **Biomarcadores y métodos de uso para la lesión pulmonar inducida por radiación**

30 Prioridad:

31.10.2018 US 201862753802 P
05.09.2019 US 201962896483 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.07.2024

73 Titular/es:

**ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF
THE UNIVERSITY OF ARIZONA (100.0%)
The University of Arizona, Tech Launch Arizona,
University Services Annex, 4th Floor,
P.O. Box 210300A
Tucson, AZ 85721, US**

72 Inventor/es:

GARCIA, JOE G.N.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 975 662 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

Biomarcadores y métodos de uso para la lesión pulmonar inducida por radiación

5 LISTADO DE SECUENCIA

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 30 de octubre de 2019, lleva el nombre A105818_1010WO_SL.txt y tiene un tamaño de 10.316 bytes.

10

ANTECEDENTES

El desarrollo de lesión pulmonar inducida por radiación (RILI, por sus siglas en inglés) es una toxicidad incapacitante y potencialmente mortal en individuos (por ejemplo, pacientes con cáncer) sometidos a radioterapia torácica o en individuos expuestos a radiación ionizante (RI), por ejemplo, de un incidente nuclear. De los dos componentes principales de RILI, el más destacado es la neumonitis por radiación, una complicación subaguda que ocurre entre 4 y 20 semanas después de la exposición a la RI, inducida por profundas respuestas inflamatorias a la RI. Los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la neumonitis por radiación son multifactoriales, pero incluyen la dosis de radiación general, el tamaño de la fracción de la tasa de dosis (incremento diario de la dosis), el volumen del pulmón irradiado, factores comorbidos (p. ej., enfisema) y factores genéticos desconocidos. Aunque las estimaciones varían, la neumonitis por radiación generalmente ocurre en ~10 % de los pacientes después de la exposición pulmonar por rayos RI, incluido entre el 5 % y el 15 % de los pacientes con cáncer de pulmón que reciben radioterapia y ~2 % a 3 % de los pacientes con cáncer de mama con neumonitis por radiación focal cuando reciben radioterapia posoperatoria después de una cirugía de conservación de la mama. El espectro de gravedad de la neumonitis por radiación varía desde síntomas respiratorios inespecíficos leves y autolimitados hasta insuficiencia respiratoria grave que requiere ventilación mecánica, con discapacidad significativa o muerte. Por el contrario, el segundo componente de RILI, la fibrosis pulmonar inducida por radiación (RILF, por sus siglas en inglés), es una fase tardía de toxicidad retardada que se desarrolla entre 6 y 24 meses después de la exposición a RI y que puede provocar un compromiso respiratorio significativo, discapacidad y muerte si las regiones de fibrosis son extensas. Desafortunadamente, el desarrollo de RILF con función pulmonar disminuida limita el uso de la dosis de radiación necesaria para la destrucción eficaz de las células tumorales. La fisiopatología del RILF incorpora inflamación sostenida, liberación de citocinas y cambios microvasculares debido a estímulos proangiogénicos y profibrogénicos. El tratamiento del RILF tiene opciones limitadas y consiste principalmente en cuidados de apoyo. Hasta la fecha, no existen terapias validadas disponibles para limitar el desarrollo o la gravedad del RILF.

Accidentes nucleares recientes, como el incidente de Fukushima de 2011 y posibles actos de terrorismo, han aumentado la preocupación por una exposición catastrófica a la radiación RI. No es sorprendente que la exposición aguda a altas dosis de RI produzca inflamación aguda, subaguda y crónica, con eventual falla multiorgánica potencialmente fatal, incluida neumonitis y RILF. Más del 50 % de las víctimas involucradas en accidentes por radiación sufren RILI, y una sola exposición a 8Gy causa neumonitis en ~30 % de los pacientes, a veces con resultados fatales. Desafortunadamente, actualmente no existen contramedidas RILI en la reserva nacional estratégica, una grave necesidad médica y social insatisfecha.

La patobiología de RILI debido a la irradiación de todo el tórax y los pulmones (WTLI), la irradiación corporal total (TBI) o la irradiación corporal parcial (PBI) es compleja e incluye los efectos nocivos de la inflamación no controlada (p. ej., especies reactivas de oxígeno, citoquinas, células inflamatorias, etc.), que aumentan la permeabilidad vascular, alteran la transferencia de gases y promueven la fibrosis. Aunque los receptores tipo Toll (TLR) y las citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-4, etc.) contribuyen al desarrollo de RILI, las estrategias experimentales y clínicas para neutralizar los efectos de las citocinas proinflamatorias inducidas por RI o bloquear la infiltración de células inflamatorias han sido decepcionantes. Las terapias, como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (p. ej., lisinopril y captopril), la pentoxifilina y los antioxidantes (p. ej., amifostina), si bien se mostraron prometedoras en modelos preclínicos, no lograron mostrar un beneficio clínico sustancial en humanos. Además, sólo unos pocos de ellos se han ensayado en modelos animales grandes. La utilidad de las dosis altas de corticosteroides, que es el estándar de atención en RILI, sigue siendo controvertida. A pesar de la eficacia aguda, el uso de esteroides presenta complicaciones a largo plazo que incluyen malos resultados, la necesidad de un tratamiento con esteroides prolongado y recaídas frecuentes y potencialmente fatales (neumonitis "de recuerdo"). Múltiples estudios encontraron pocos beneficios de la administración profiláctica de esteroides. Los estudios preclínicos encontraron una letalidad reducida en ratones expuestos a RI mientras tomaban prednisona (10 mg/kg/día), y la abstinencia de esteroides resultó en una mortalidad acelerada, eventualmente comparable a la de los ratones no tratados con una prolongación de la duración de la neumonitis. Además, la retirada temprana exacerbó la gravedad de la neumonitis. Por lo tanto, la ausencia de un consenso sobre el uso de esteroides en RILI, su eficacia limitada y sus efectos adversos graves (recaídas potencialmente fatales) exigen la búsqueda de estrategias terapéuticas mucho más seguras y efectivas para RILI, que es una grave necesidad insatisfecha.

El documento WO 2011/109650 A1 describe métodos para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una lesión pulmonar aguda manifestada por una mayor permeabilidad vascular.

65

XIANG BIN ET AL International Journal of Radiation: Oncology biology physics, julio de 2016 describe cómo la regulación positiva de la nicotinamida fosforribosiltransferasa por la fenilefrina reduce la lesión por radiación en la glándula submandibular.

- 5 El documento WO 2018/191751 A1 describe cómo la inhibición de la expresión y/o función de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) puede reducir, prevenir o revertir los cambios vasculares fisiopatológicos asociados con la aparición y progresión de la fibrosis pulmonar.

RESUMEN DE LA INVENCION

10

La presente divulgación está dirigida a métodos (p.ej., métodos *in vitro*) para el uso de nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) como biomarcador en la lesión pulmonar inducida por radiación (RILI). La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

15

Un primer aspecto proporciona un método *in vitro* para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de RILI en un sujeto humano, que comprende detectar el nivel de nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) en una muestra biológica obtenida del sujeto humano, en donde un nivel más alto de NAMPT en comparación con un control sano o un valor de referencia es indicativo de la presencia de RILI en el sujeto humano.

20

En algunas formas de realización del aspecto anterior, la etapa (b) incluye detectar el nivel de proteína NAMPT. En determinadas formas de realización, el nivel de proteína NAMPT se detecta mediante autorradiografía. En determinadas formas de realización, el nivel de proteína NAMPT se detecta mediante análisis de transferencia Western. En determinadas formas de realización, el nivel de proteína NAMPT se detecta mediante inmunohistoquímica. En determinadas formas de realización, el nivel de proteína NAMPT se detecta mediante ELISA.

25

En algunas formas de realización, el nivel de proteína NAMPT se detecta mediante un anticuerpo anti-NAMPT. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-NAMPT está radiomarcado.

30

En otras formas de realización del aspecto anterior, la etapa (b) incluye detectar el nivel de ARNm de NAMPT. En determinadas formas de realización, el nivel de ARNm de NAMPT se detecta mediante RT-PCR. En formas de realización particulares, el nivel de ARNm de NAMPT se detecta mediante un par de cebadores que es complementario a todas o partes de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.

35

En algunas formas de realización, el sujeto humano muestra síntomas de RILI.

40

En algunas formas de realización, el sujeto humano corre el riesgo de desarrollar RILI. En determinadas formas de realización, el sujeto humano es un paciente con cáncer sometido a radioterapia. En formas de realización particulares, el sujeto humano es un paciente con cáncer sometido a radioterapia torácica. En determinadas formas de realización, el sujeto humano está expuesto a radiación ionizante (RI).

45

En algunas formas de realización del aspecto anterior, el control saludable o valor de referencia es un nivel de expresión de NAMPT en un sujeto de control. En determinadas formas de realización, el sujeto de control es un sujeto sin RILI. En formas de realización particulares, el sujeto de control es un sujeto sin ninguna enfermedad pulmonar.

50

En algunas formas de realización del aspecto antes mencionado, el tejido es tejido pulmonar. En algunas formas de realización, el tejido es tejido torácico. En algunas formas de realización, el tejido es tejido amigdalino.

55

Otro aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, proporciona un método para detectar NAMPT en un sujeto humano mediante: (a) obtención de una muestra biológica del sujeto humano; (b) detectar si NAMPT está presente en la muestra biológica poniendo en contacto la muestra biológica con un agente de captura que se une específicamente a NAMPT; y (c) detectar la unión entre NAMPT y el agente de captura.

60

En algunas formas de realización del aspecto antes mencionado, el agente de captura detecta la proteína NAMPT y la unión entre NAMPT y el agente de captura en la etapa (c) se detecta mediante autorradiografía. En algunas formas de realización del aspecto antes mencionado, el agente de captura detecta la proteína NAMPT y la unión entre NAMPT y el agente de captura en la etapa (c) se detecta mediante análisis de transferencia Western. En algunas formas de realización del aspecto antes mencionado, el agente de captura detecta la proteína NAMPT y la unión entre NAMPT y el agente de captura en la etapa (c) se detecta mediante IHC. En algunas formas de realización del aspecto antes mencionado, el agente de captura detecta la proteína NAMPT y la unión entre NAMPT y el agente de captura en la etapa (c) se detecta mediante o ELISA.

65

En algunas formas de realización del aspecto anterior, el agente de captura es un anticuerpo anti-NAMPT. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-NAMPT está radiomarcado.

En algunas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, el agente de captura detecta el ARNm de NAMPT y la unión entre NAMPT y el agente de captura en la etapa (c) se detecta mediante RT-PCR. En determinadas

formas de realización, el agente de captura es un par de cebadores que es complementario a toda o una porción de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.

En algunas formas de realización, el sujeto humano muestra síntomas de RILI.

En algunas formas de realización, el sujeto humano corre el riesgo de desarrollar RILI. En determinadas formas de realización, el sujeto humano es un paciente con cáncer sometido a radioterapia. En formas de realización particulares, el sujeto humano es un paciente con cáncer sometido a radioterapia torácica. En determinadas formas de realización, el sujeto humano está expuesto a radiación ionizante (RI).

En algunas formas de realización del aspecto anterior, el método incluye además (d) comparar el nivel de NAMPT en el sujeto humano con un control sano o un valor de referencia, en donde un nivel más alto de NAMPT en la muestra biológica del sujeto humano en comparación con el control sano o El valor de referencia es indicativo de la presencia de RILI en el sujeto humano.

En algunas formas de realización, el control saludable o el valor de referencia es un nivel de expresión de NAMPT en un sujeto de control. En determinadas formas de realización, el sujeto de control es un sujeto sin RILI. En formas de realización particulares, el sujeto de control es un sujeto sin ninguna enfermedad pulmonar.

En algunas formas de realización del aspecto anterior, la muestra biológica es un tejido o plasma. En determinadas formas de realización, el tejido es tejido pulmonar. En determinadas formas de realización, el tejido es tejido torácico. En determinadas formas de realización, el tejido es tejido amigdalino.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 es un gráfico que representa los efectos de la radiación (20 Gy) sobre la cantidad de proteína BAL en los tejidos pulmonares de ratones en las semanas 1, 2, 6, 12 y 18 después de la exposición a la radiación. También se muestran en el gráfico las cantidades de proteína BAL en los tejidos pulmonares de ratones de control no irradiados y de ratones que fueron expuestos a 0,1 mg/kg de LPS. * indica $p=0,007$

FIG. 2 es un gráfico que representa los efectos de la radiación (20 Gy) sobre el recuento de células que expresan BAL (células BAL) en tejidos pulmonares de ratones en las semanas 1, 2, 6, 12 y 18 después de la exposición a la radiación. También se muestran en el gráfico los recuentos de células BAL en tejidos pulmonares de ratones de control no irradiados y de ratones que fueron expuestos a 0,1 mg/kg de LPS. * indica $p=0,007$

FIG. 3 es una representación gráfica de los efectos de la radiación (20 Gy) en el recuento de macrófagos que expresan BAL (macrófagos BAL) y PMN que expresan BAL (PMN BAL) en tejidos pulmonares de ratones en las semanas 1, 2, 6, 12 y 18 después de la exposición a la radiación. FIG. 3A es un gráfico que muestra el recuento de macrófagos BAL en tejidos pulmonares de ratones irradiados en los momentos indicados. También se muestran en el gráfico los recuentos de macrófagos del BAL en tejidos pulmonares de ratones de control no irradiados y de ratones que fueron expuestos a 0,1 mg/kg de LPS. * indica $p=0,01$

FIG. 3B es un gráfico que muestra el recuento de BAL PMN en tejidos pulmonares de ratones irradiados en los momentos indicados. También se muestran en el gráfico los recuentos de BAL PMN en tejidos pulmonares de ratones de control no irradiados y de ratones que fueron expuestos a 0,1 mg/kg de LPS. * indica $p=0,005$

FIG. 4 proporciona micrografías de tinción H&E de tejido pulmonar de ratones no irradiados (panel izquierdo) y de tejido pulmonar murino 1 semana después de la exposición a la radiación (20 Gy) (panel derecho).

FIG. 5 representa los resultados del análisis de la expresión de NAMPT en tejidos pulmonares murinos después de la exposición a radiación de 20 Gy. FIG. 5A proporciona micrografías de tinción con NAMPT de tejido pulmonar de ratones no irradiados (panel izquierdo) y de tejido pulmonar murino 1 semana después de la exposición a la radiación (panel derecho). FIG. 5B es una micrografía que muestra la tinción con NAMPT en neumocitos y macrófagos en una sección de tejido pulmonar murino 1 semana después de la exposición a la radiación.

FIG. 6 es un gráfico que representa el cambio en la expresión de ARNm de NAMPT en tejidos pulmonares de ratones irradiados (1 semana después de la exposición a la radiación) con respecto a la expresión de ARNm de NAMPT en tejidos pulmonares de ratones de control no irradiados. También se representa en el gráfico el cambio en la expresión de ARNm de NAMPT en tejidos pulmonares de ratones tratados con LPS con respecto a la expresión de ARNm de NAMPT en tejidos pulmonares de ratones de control tratados con vehículo.

FIG. 7 es un gráfico que representa los efectos de la radiación (20 Gy) sobre el nivel plasmático de NAMPT en ratones a las 8 horas, 24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas, 6 semanas, 12 semanas y 18 semanas después de la exposición a la radiación. También se muestran en el gráfico los niveles plasmáticos de NAMPT en ratones de control no irradiados y en ratones que fueron expuestos a 0,1 mg/kg de LPS. * indica $p<0,05$

FIG. 8 es un gráfico que representa los efectos de la radiación (20 Gy) sobre la cantidad de proteína BAL en tejidos pulmonares de ratones heterocigotos de tipo salvaje (WT) y NAMPT 4 semanas después de la exposición a la radiación. También se muestran en el gráfico cantidades de proteína BAL en tejidos pulmonares de ratones WT no irradiados y ratones heterocigotos NAMPT no irradiados.

FIG. 9 es un gráfico que representa la cantidad de proteína BAL en tejidos pulmonares de ratones que recibieron radiación torácica de 20 Gy y fueron tratados con un anticuerpo policlonal neutralizante de NAMPT o con un vehículo. El gráfico muestra la cantidad de proteína BAL en los ratones indicados 4 semanas después de la exposición a la radiación. * indica $p < 0,05$

FIG. 10 es un gráfico que representa el recuento de células BAL en tejidos pulmonares de ratones que recibieron radiación torácica de 20 Gy y fueron tratados con un anticuerpo policlonal neutralizante de NAMPT o un vehículo. El gráfico muestra el recuento de células BAL en los ratones indicados 4 semanas después de la exposición a la radiación. * indica $p < 0,05$

FIG. 11 es una representación gráfica del recuento de PMN de BAL y linfocitos que expresan BAL (linfocitos BAL) en tejidos pulmonares de ratones que recibieron radiación torácica de 20 Gy y fueron tratados con un anticuerpo policlonal neutralizante de NAMPT o con un vehículo. El gráfico del panel izquierdo muestra el recuento de PMN de BAL y el gráfico del panel derecho muestra el recuento de linfocitos de BAL en los ratones indicados 4 semanas después de la exposición a la radiación. * indica $p < 0,05$

FIG. 12 es un gráfico que representa el cambio en la expresión de ARNm de NAMPT en tejidos pulmonares de ratones irradiados que fueron tratados con un anticuerpo policlonal neutralizante de NAMPT con respecto a la expresión de ARNm de NAMPT en tejidos pulmonares de ratones irradiados que fueron tratados con un control de vehículo.

FIG. 13 es un gráfico que representa los niveles plasmáticos de NAMPT en ratones irradiados que fueron tratados con un anticuerpo policlonal neutralizante de NAMPT o con un vehículo de control.

FIG. 14 es una representación gráfica de los resultados del análisis de los efectos de la radiación sobre la expresión de NAMPT en tejidos y sangre humanos. 14A proporciona micrografías que muestran tinción inmunohistoquímica (IHC) para NAMPT en tejido epitelial amigdalino humano que no fue irradiado (panel inferior) o expuesto a radiación ionizante (RI) de 8Gy durante 24 horas (panel superior). FIG. 14B es un gráfico que representa el nivel plasmático de NAMPT en sujetos de control (n=268) o en sujetos sometidos a radioterapia para cáncer de mama (n=50) o cáncer de pulmón (n=34). * indica $p < 0,0001$

FIG. 14C es un gráfico que representa el nivel plasmático de NAMPT en sujetos de control (n=70) o en pacientes con neumonitis por radiación (n=19). * indica $p < 0,001$

FIG. 14D es un gráfico que representa el nivel plasmático de NAMPT en sujetos control (n=245) o en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda inducida por radiación (ARDS).

FIG. 15 es una representación gráfica de la expresión de NAMPT en tejidos pulmonares de ratones WT C57/B6 que se expusieron a 20 Gy de irradiación de todo el tórax y los pulmones (WTLI). FIG. 15A es una micrografía que muestra la expresión de NAMPT en tejido pulmonar de ratones expuestos a WTLI 4 semanas después de la exposición a WTLI. También se muestra en el recuadro una micrografía que representa la expresión de NAMPT en tejido pulmonar de ratones expuestos de forma simulada (ratones no irradiados). FIG. 15B es una micrografía que muestra la expresión de NAMPT en tejido pulmonar de ratones expuestos a WTLI 12 semanas después de la exposición a WTLI. También se muestra en el conjunto una micrografía que representa la expresión de NAMPT en tejido pulmonar de ratones expuestos de forma simulada (ratones no irradiados). FIG. 15C es una micrografía que muestra la expresión de NAMPT en tejido pulmonar de ratones expuestos a WTLI 18 semanas después de la exposición a WTLI. También se muestra en el recuadro una micrografía que representa la expresión de NAMPT en tejido pulmonar de ratones expuestos de forma simulada (ratones no irradiados). FIG. 15D es una representación gráfica de la expresión de NAMPT (% de área) en tejido pulmonar de ratones expuestos a WTLI a las 4, 12 y 18 semanas después de la exposición a WTLI. También se representa en el gráfico como control negativo la expresión de NAMPT en tejido pulmonar de ratones expuestos de forma simulada (ratones no irradiados).

FIG. 16 es una representación gráfica de la cantidad de proteína BAL y el recuento de células BAL en tejido pulmonar de ratones WT ("Control") o ratones heterocigotos NAMPT (*Nampt*^{+/-}) que no estaban irradiados ("No irradiados"), o expuestos a 20Gy WTLI ("RILI"). FIG. 16A es un gráfico que representa la cantidad de proteína BAL en tejidos pulmonares de ratones heterocigotos WT o NAMPT 4 semanas después de la exposición a 20Gy WTLI. También se representa en el gráfico la cantidad de proteína BAL en tejidos pulmonares de ratones heterocigotos WT o NAMPT no irradiados. FIG. 16B es un gráfico que representa el recuento de células BAL en tejidos pulmonares de ratones heterocigotos WT o NAMPT 4 semanas después de la exposición a 20Gy WTLI. También se representa en el gráfico el recuento de células BAL en tejidos pulmonares de ratones heterocigotos WT o NAMPT no irradiados. * indica $p < 0,05$

FIG. 17 es una representación gráfica de la lesión e inflamación pulmonar, el nivel de proteína BAL, el recuento de células BAL y el nivel de NAMPT en plasma después de 4 semanas de exposición a WTLI en ratones WT que fueron expuestos a 20Gy WTLI, ratones WT que fueron expuestos a 20Gy WTLI y tratados con un pAb anti NAMPT o control de vehículo, o ratones heterocigotos NAMPT (*Nampt*^{+/-}) que fueron expuestos a 20Gy WTLI. FIG. 17A es una micrografía que muestra

tinción con H&E en tejido pulmonar de ratones WT expuestos a WTL1. También se muestra en el recuadro una micrografía que muestra la tinción con H&E en tejido pulmonar de ratones expuestos de forma simulada (ratones no irradiados). FIG. 17B es una micrografía que muestra tinción con H&E en tejido pulmonar de ratones heterocigotos NAMPT expuestos a WTL1. FIG. 17C es una micrografía que muestra tinción con H&E en tejido pulmonar de ratones WT expuestos a WTL1 que fueron tratados con un pAb anti-NAMPT. FIG. 17D es una representación gráfica de la cantidad de proteína BAL (FIG. 17D, panel izquierdo) y el recuento de células BAL (FIG. 17D, panel derecho) en tejidos pulmonares de ratones WT expuestos a WTL1 que fueron tratados con un anti- NAMPT pAb o un vehículo. FIG. 17E es un gráfico que representa el nivel de NAMPT en plasma en ratones WT expuestos a WTL1 ("RILI") que fueron tratados con un pAb anti-NAMPT o un vehículo ("Control"). También se muestra en el gráfico el nivel de NAMPT en plasma en ratones expuestos a RI simulado ("no irradiados"). * indica $p < 0,05$

FIG. 18 es una representación gráfica de la inflamación, la deposición de colágeno y la expresión de actina del músculo liso (SMA) e IL-6 en tejido pulmonar de ratones WT que fueron expuestos a 20 Gy WTLI, ratones WT que fueron expuestos a 20 Gy WTLI y tratados con un pAb anti-NAMPT, o ratones heterocigotos NAMPT (*Nampt*^{+/+}) que fueron expuestos a 20Gy WTLI. FIG. 18A es una micrografía que muestra tinción con H&E en tejido pulmonar de ratones WT expuestos a WTL1. FIG. 18B es una micrografía que muestra la tinción con H&E en tejido pulmonar de ratones WT expuestos a WTL1 que fueron tratados con un pAb anti NAMPT. FIG. 18C es una micrografía que muestra la deposición de colágeno, detectada mediante tinción con tricómico, en tejido pulmonar de ratones WT expuestos a WTL1. FIG. 18D es una micrografía que muestra la deposición de colágeno, detectada mediante tinción tricrómica, en tejido pulmonar de ratones heterocigotos NAMPT. FIG. 18E es una representación gráfica de análisis de transferencia Western de la expresión de SMA e IL-6 después de 12 semanas de exposición a WTLI en tejidos pulmonares de ratones heterocigotos WT o NAMPT que fueron expuestos a 20Gy WTLI (FIG. 18E, panel izquierdo), o expresión de SMA después de 18 semanas de exposición a WTLI en tejidos pulmonares de ratones WT que fueron expuestos a 20Gy WTLI y tratados en ausencia o presencia de un pAb anti-NAMPT (FIG. 18E, panel derecho). También representados en la FIG. 18E son los análisis de transferencia Western de la expresión de vinculina como control de carga.

FIG. 19 representa los resultados de pruebas *in vivo* de anticuerpos anti-NAMPT humanizados (NN, SS, K, N, XX, P y UU) sobre inflamación y lesión en modelos murinos de lesión pulmonar. FIG. 19A es un gráfico que representa la puntuación de lesión pulmonar en ratones control o en ratones del modelo de lesión pulmonar de "un solo golpe" inducida por LPS que fueron tratados con un pAb anti-NAMPT o un anticuerpo anti-NAMPT humanizado (NN, SS, K, N, XX, P o UU). FIG. 19B es un gráfico que representa la puntuación de lesión pulmonar en ratones control o en ratones del modelo de lesión pulmonar de "dos golpes" inducida por LPS/VILI que fueron tratados con un pAb anti-NAMPT o un anticuerpo anti-NAMPT humanizado (NN, SS, K, N, XX, P o UU). FIG. 19C proporciona micrografías que muestran la tinción con H&E de tejidos pulmonares de ratones del modelo de lesión pulmonar de "dos golpes" inducida por LPS/VILI que fueron tratados en presencia (FIG. 19C, panel inferior) o ausencia (FIG. 19C, panel superior) del anticuerpo P anti-NAMPT.

FIG. 20 es una representación esquemática del papel de NAMPT en la activación de la cascada inflamatoria sistémica y la disfunción multiorgánica en respuesta a una variedad de estímulos perjudiciales, incluida la radiación, y los potenciales del anticuerpo anti-nAMPT para aliviar dichos efectos nocivos de NAMPT.

FIG. 21 es una representación gráfica de la detección de la expresión de NAMPT mediante una sonda de anticuerpo monoclonal (mAb) anti-NAMPT radiomarcada. FIG. 21A es una autorradiografía que representa la detección de la expresión de NAMPT mediante la sonda de mAb anti-NAMPT marcada con ^{99m}Tc en un ratón de control (panel izquierdo) y en un ratón expuesto a irradiación corporal parcial (PBI) de 8Gy 2 semanas después de la irradiación (panel derecho). FIG. 21B proporciona una imagen ampliada de la FIG. 21A (panel izquierdo) que representa la detección de la expresión de NAMPT mediante la sonda mAb anti-NAMPT marcada con ^{99m}Tc en tejidos pulmonares de un ratón de control. FIG. 21C proporciona una imagen ampliada de la FIG. 21A (panel derecho) que representa la detección de la expresión de NAMPT mediante la sonda de mAb anti-NAMPT marcada con ^{99m}Tc en tejidos pulmonares de un ratón expuesto a 8Gy PBI 2 semanas después de la irradiación. FIG. 21D es una imagen autorradiográfica que representa la detección de la expresión de NAMPT mediante la sonda mAb anti-NAMPT marcada con ^{99m}Tc en tejidos pulmonares de ratones de control. FIG. 21E es una imagen autorradiográfica que representa la detección de la expresión de NAMPT mediante la sonda de mAb anti-NAMPT marcada con ^{99m}Tc en tejidos pulmonares de ratones expuestos a LPS 24 horas después de la inyección intratraqueal de LPS. FIG. 21F es una imagen autorradiográfica que representa la detección de la expresión de NAMPT mediante la sonda de mAb anti-NAMPT marcada con ^{99m}Tc en tejidos pulmonares de ratones expuestos a WTL1 5 días después de la exposición a 20Gy WTLI.

DEFINICIONES

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ARN o ADN, que se ha aislado libre de ácido nucleico genómico total.

Como se usan indistintamente en el presente documento, los términos "polinucleótido NAMPT" o "polinucleótido que codifica NAMPT" se refieren a una molécula de ácido nucleico que codifica NAMPT que se ha aislado esencial o sustancialmente libre de ácido nucleico genómico total para permitir la hibridación y amplificación, pero no se limita a semejante. Por lo tanto, un "polinucleótido que codifica NAMPT" se refiere a un segmento de ADN que contiene una secuencia codificante de NAMPT de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) aislada o purificada libre de ADN genómico total de

mamífero o humano. Un oligonucleótido de NAMPT se refiere a una molécula de ácido nucleico que es idéntica a al menos 5 nucleótidos contiguos de una secuencia que codifica NAMPT, tal como idéntica a al menos 5 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1, que es la secuencia de ADNc que codifica NAMPT humana. En algunas formas de realización se puede usar una secuencia complementaria del polinucleótido u oligonucleótido de NAMPT, como se menciona en el presente documento, para detectar la expresión de NAMPT humana en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) de un sujeto (por ejemplo, un sujeto de prueba).

"Cebadores" como se usa en el presente documento se refiere a oligonucleótidos que se pueden usar en un método de amplificación, tal como una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar una secuencia de nucleótidos basada en la secuencia de polinucleótidos correspondiente a un gen de interés, por ejemplo, el ADNc o secuencia genómica para NAMPT humana o una porción de la misma. Normalmente, al menos uno de los cebadores de PCR para la amplificación de una secuencia de polinucleótidos es específico de secuencia para esa secuencia de polinucleótidos. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluida la temperatura, la fuente del cebador y el método utilizado. Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleótido normalmente contiene al menos 10, 15, 20, 25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos o más nucleótidos. Los factores implicados en la determinación de la longitud apropiada del cebador son fácilmente conocidos por un experto en la técnica. En esta descripción, el término "par de cebadores" significa un par de cebadores que se hibridan con hebras opuestas de una molécula de ADN diana o con regiones del ADN diana que flanquean una secuencia de nucleótidos que se va a amplificar. En esta divulgación, el término "sitio del cebador" significa el área del ADN diana u otro ácido nucleico con el que se hibrida un cebador. En algunas formas de realización, pares de cebadores diseñados para hibridar selectivamente con un ácido nucleico, tal como el ácido nucleico correspondiente a SEQ ID NO: 1, se ponen en contacto con el ácido nucleico molde en condiciones que permiten la hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, se pueden seleccionar condiciones de hibridación de alta rigurosidad que sólo permitan la hibridación con secuencias que sean completamente complementarias a los cebadores. En otras formas de realización, la hibridación puede ocurrir bajo rigor reducido para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contienen uno o más desemparejamientos con las secuencias del cebador. Una vez hibridado, el complejo plantilla-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácidos nucleicos dependiente de plantilla. Se realizan múltiples rondas de amplificación, también denominadas "ciclos", hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

El término "ADNc" pretende referirse al ADN preparado utilizando ARN como plantilla. La ventaja de utilizar un ADNc, a diferencia del ADN genómico o un transcrito de ARN, es la estabilidad y la capacidad de manipular la secuencia utilizando tecnología de ADN recombinante. Además, un ADNc puede resultar ventajoso porque representa regiones codificantes de un polipéptido y elimina intrones y otras regiones reguladoras. En determinadas formas de realización, los ácidos nucleicos son complementarios o idénticos a secuencias que codifican ADNc, como una secuencia NAMPT.

El término "gen" se utiliza en el presente documento por simplicidad para referirse a una proteína funcional, un polipéptido o una unidad de ácido nucleico que codifica un péptido. Como entenderán los expertos en la técnica, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc y segmentos de genes modificados genéticamente más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes.

El término "gen NAMPT" o "proteína NAMPT", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier variante o mutante de origen natural, homólogos u ortólogos entre especies, o variantes artificiales del gen NAMPT o de la proteína NAMPT humana. La secuencia de ADN para un ARNm de NAMPT humano de tipo salvaje se establece en el número de acceso de GenBank NM_005746 (proporcionado en el presente documento como SEQ ID NO: 1), que codifica una proteína NAMPT (por ejemplo, una isoforma de la proteína NAMPT proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 2). Una proteína NAMPT en el sentido de esta solicitud normalmente tiene al menos aproximadamente un 80 %, o un 90 %, o un 95 % o más de identidad de secuencia con la proteína NAMPT humana de tipo salvaje.

En esta divulgación, el término "o" se emplea generalmente en el sentido que incluye "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Como se usa en el presente documento, el término "expresión génica" se usa para referirse a la transcripción de un ADN para formar una molécula de ARN que codifica una proteína particular (por ejemplo, proteína NAMPT humana) o la traducción de una proteína codificada por una secuencia de polinucleótidos. En otras palabras, tanto el nivel de ARNm como el nivel de proteína codificado por un gen de interés (por ejemplo, el gen NAMPT humano) están abarcados por el término "nivel de expresión génica" en esta divulgación.

En esta divulgación, el término "muestra biológica" o "muestra" incluye secciones de tejidos (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido torácico, tejido de amígdalas, etc.), tales como muestras de biopsia y autopsia, y secciones congeladas tomadas con fines histológicos, o formas procesadas de cualquiera de dichas muestras. Las muestras biológicas incluyen sangre y fracciones o productos sanguíneos (por ejemplo, suero, plasma, plaquetas, glóbulos rojos y similares), esputo o saliva, tejido linfático y de lengua, células cultivadas, por ejemplo, cultivos primarios, explantes y células transformadas, tejido de biopsia de pulmón, etc. Una muestra biológica se obtiene típicamente de un organismo eucariota, que puede ser un mamífero, puede ser un primate y puede ser un sujeto humano.

En esta divulgación, el término "biopsia" se refiere al proceso de extracción de una muestra de tejido (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido torácico, tejido de amígdalas, etc.) para evaluación de diagnóstico o pronóstico, y a la muestra de tejido en sí. Cualquier técnica de biopsia conocida en la técnica se puede aplicar a los métodos de diagnóstico y pronóstico de la presente invención. La técnica de biopsia aplicada dependerá del tipo de tejido (p. ej., tejido pulmonar, tejido torácico, tejido amigdalino, etc.) a evaluar, entre otros factores. Las técnicas de biopsia representativas incluyen, entre otras, biopsia por escisión, biopsia por incisión, biopsia con aguja, biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Los expertos en la técnica conocen bien una amplia gama de técnicas de biopsia, quienes elegirán entre ellas y las implementarán con una experimentación mínima.

En esta divulgación, el término molécula de ácido nucleico "aislada" significa una molécula de ácido nucleico que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que normalmente están asociadas con la molécula de ácido nucleico aislada. Así, una molécula de ácido nucleico "aislada" incluye, sin limitación, una molécula de ácido nucleico que está libre de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente uno o ambos extremos del ácido nucleico en el genoma del organismo del que se deriva el ácido nucleico aislado (p. ej., un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o digestión con endonucleasa de restricción). Dicha molécula de ácido nucleico aislada generalmente se introduce en un vector (por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión) por conveniencia de manipulación o para generar una molécula de ácido nucleico de fusión. Además, una molécula de ácido nucleico aislada puede incluir una molécula de ácido nucleico diseñada tal como una molécula de ácido nucleico recombinante o sintética. Una molécula de ácido nucleico que existe entre cientos a millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro de, por ejemplo, una biblioteca de ácidos nucleicos (por ejemplo, una biblioteca de ADNc o genómica) o un gel (por ejemplo, agarosa o poliacrilamina) que contiene ADN genómico digerido por restricción, es no es un ácido nucleico "aislado".

En esta solicitud, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidas proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), en las que los residuos de aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos covalentes.

El término "aminoácido", como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos sintéticos y de origen natural, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que posteriormente se modifican, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma carboxiglutamato y O-fosfoserina. Para los fines de esta solicitud, los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (p. ej., norleucina) o cadenas peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Para los fines de esta solicitud, los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido natural. Los aminoácidos pueden incluir aquellos que tienen D-quiralidad no natural, como se describe en el documento WO 01/12654, que puede mejorar la estabilidad (por ejemplo, vida media), biodisponibilidad y otras características de un polipéptido que comprende uno o más de tales D-aminoácidos. En algunos casos, uno o más, y potencialmente todos, los aminoácidos de un polipéptido terapéutico tienen D-quiralidad. En este documento se puede hacer referencia a los aminoácidos mediante los símbolos comúnmente conocidos de tres letras o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Asimismo, se puede hacer referencia a los nucleótidos mediante sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Como se usa en el presente documento, los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de describir dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, una proteína NAMPT variante utilizada en el método de esta invención tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, preferiblemente aproximadamente un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con una secuencia de referencia, por ejemplo, una proteína NAMPT humana de tipo salvaje), cuando se compara y se alinea para obtener la máxima correspondencia en una ventana de comparación, o se designa región medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Entonces se dice que tales secuencias son "sustancialmente idénticas". Con respecto a las secuencias de polinucleótidos, esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. Preferiblemente, la identidad existe en una región que tiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferiblemente en una región que tiene entre 75 y 100 aminoácidos o nucleótidos de longitud. Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Se pueden utilizar los parámetros predeterminados del programa o

se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, se utilizan los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 y los parámetros predeterminados que se analizan a continuación.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye referencia a un segmento de una cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Se puede realizar una alineación óptima de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin), o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. Suplemento de 1995)).

Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y Altschul et al. (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica, ncbi.nlm.nih.gov. El algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de puntuación alta (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen algún umbral de valor positivo más o T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al., supra). Estas palabras iniciales del vecindario llegan a las semillas de actas para iniciar búsquedas para encontrar PAS más largas que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden luego en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Los valores acumulativos se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización por residuos no coincidentes; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada cae en una cantidad X desde su valor máximo alcanzado; el valor acumulativo llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto un tamaño de palabra (W) de 28, una expectativa (E) de 10, M=1, N=-2 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto un tamaño de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)).

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01, 0,001.

Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene reactividad cruzada inmunológica con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por tanto, un polipéptido suele ser sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones estrictas, como se describe a continuación. Aún otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que se pueden usar los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

En esta divulgación, los términos "condiciones de hibridación estrictas" y "alta rigurosidad" se refieren a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993) y será fácilmente entendida por aquellos expertos en la materia. Generalmente, se seleccionan condiciones estrictas entre 5 y 10 °C. inferior al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidas) a la que el 50 % de las sondas complementarias

a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, en T_m , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). También se pueden lograr condiciones estrictas con la adición de agentes desestabilizadores como la formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, preferiblemente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación estrictas
 5 ejemplares pueden ser las siguientes: 50 % de formamida, 5xSSC y 1 % de SDS, incubando a 42 °C, o 5xSSC, 1 % de SDS, incubando a 65 °C, con lavado en 0,2 x SSC y 0,1 % de SDS a 65 °C.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones estrictas siguen siendo sustancialmente idénticos si los polipéptidos que encadenan son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un
 10 ácido nucleico utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos típicamente se hibridan en condiciones de hibridación moderadamente estrictas. Las "condiciones de hibridación moderadamente estrictas" de ejemplo incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en 1 x SSC a 45 °C. Una hibridación positiva tiene al menos el doble de fondo. Los expertos reconocerán fácilmente que se pueden utilizar condiciones alternativas de hibridación y lavado para proporcionar
 15 condiciones de rigurosidad similar. Se proporcionan directrices adicionales para determinar los parámetros de hibridación en numerosas referencias, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al.

Un "casete de expresión" es una construcción de ácido nucleico, generada de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico específicos que permiten la transcripción de una secuencia de polinucleótidos particular en una célula huésped. Un casete de expresión puede ser parte de un plásmido, genoma viral o fragmento de
 20 ácido nucleico. Normalmente, un casete de expresión incluye un polinucleótido a transcribir, unido operativamente a un promotor. "Unido operativamente" en este contexto significa dos o más elementos genéticos, tales como una secuencia codificante de polinucleótidos y un promotor, colocados en posiciones relativas que permiten el funcionamiento biológico adecuado de los elementos, tales como el promotor que dirige la transcripción de la secuencia codificante. Otros
 25 elementos que pueden estar presentes en un casete de expresión incluyen aquellos que mejoran la transcripción (por ejemplo, potenciadores) y terminan la transcripción (por ejemplo, terminadores), así como aquellos que confieren cierta afinidad de unión o antigenicidad a la proteína recombinante producida a partir del casete de expresión.

El término "inmunoglobulina" o "anticuerpo" (usados indistintamente en el presente documento) se refiere a una proteína de unión a antígeno que tiene una estructura básica de cadena de cuatro polipéptidos que consta de dos cadenas pesadas y dos ligeras, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro entre cadenas, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Tanto las cadenas pesadas como las ligeras están plegadas en dominios. El término "anticuerpo" también se refiere a fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno y epítopo, por
 30 ejemplo, fragmentos Fab, que pueden usarse en ensayos de afinidad inmunológica. Hay varios fragmentos de anticuerpos bien caracterizados. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo en el extremo C de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que a su vez es una cadena ligera unida a V_H-C_H mediante un enlace disulfuro. El $F(ab')_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero $(Fab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la
 35 región bisagra (véase, por ejemplo, Fundamental Immunology, Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Si bien diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que los fragmentos se pueden sintetizar de novo ya sea químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo también incluye fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados utilizando metodologías de ADN recombinante. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a
 40 cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que exhiba la actividad biológica deseada. Por tanto, se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada.

En algunas formas de realización, en el presente documento se describe un anticuerpo que se une a NAMPT, tal como un anticuerpo anti-NAMPT, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-NAMPT (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal) como agente de detección, tal como un anticuerpo de detección que se une a NAMPT y detecta NAMPT (por ejemplo, de una muestra biológica), tal como detecta NAMPT en un ensayo de detección (p. ej., en análisis de transferencia Western, análisis de
 55 inmunohistoquímica, ELISA y/o análisis de autorradiografía). En determinadas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-NAMPT (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal) como agente de captura que se une a NAMPT y detecta NAMPT (por ejemplo, a partir de una muestra biológica), tal como detecta NAMPT en un ensayo de detección (p. ej., en análisis de transferencia Western, análisis de inmunohistoquímica, ELISA y/o análisis de autorradiografía). En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une a NAMPT, tal como un anticuerpo anti-NAMPT, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se marca para facilitar la detección. En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une a NAMPT, tal como un anticuerpo anti-NAMPT, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, está radiomarcado (por ejemplo, marcado con un radioisótopo, tal como marcado con ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P , ^{99m}Tc , o similares), marcados enzimáticamente (por ejemplo, marcados con una enzima, tal como con peroxidasa de
 60 rábano picante (HRP)), marcados con fluorescencia (por ejemplo, marcado con un fluoróforo), marcado con un agente quimioluminiscente y/o marcado con un compuesto (por ejemplo, con biotina y digoxigenina).

En algunas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-NAMPT como inhibidor de anticuerpos. En algunas formas de realización, un inhibidor de anticuerpos (por ejemplo, un inhibidor de anticuerpos anti-NAMPT) puede considerarse un anticuerpo neutralizante. Dentro de la definición de un anticuerpo que se une a NAMPT se incluye un fragmento de unión al anticuerpo NAMPT. Como se usa en el presente documento, el término "fragmento de unión a NAMPT" o "fragmento de unión del mismo" abarca un fragmento o un derivado de un anticuerpo que aún conserva sustancialmente su actividad biológica de inhibición de la actividad de NAMPT. Por lo tanto, el término "fragmento de anticuerpo" o fragmento de unión a NAMPT se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, sc-FV; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Normalmente, un fragmento o derivado de unión conserva al menos el 50 % de su actividad inhibidora de NAMPT. Preferiblemente, un fragmento o derivado de unión retiene aproximadamente o al menos aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de su actividad inhibidora de NAMPT. También se pretende que un fragmento de unión a NAMPT pueda incluir sustituciones de aminoácidos conservadoras que no alteren sustancialmente su actividad biológica.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único epítipo antigénico. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales suelen incluir una multitud de anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) diferentes epítopos. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al. (1975), o puede prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de fagosanticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson et al. (1991) y Marks et al. (1991), por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como de anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

Puede usarse cualquier método adecuado para generar anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, un receptor puede ser inmunizado con NAMPT o un fragmento del mismo. Se puede utilizar cualquier método adecuado de inmunización. Dichos métodos pueden incluir adyuvantes, otros inmunoestimulantes, inmunizaciones de refuerzo repetidas y el uso de una o más rutas de inmunización.

La frase "se une específicamente", cuando se usa en el contexto de describir una relación de unión de una molécula particular a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, en condiciones de ensayo de unión no designadas, el agente de unión especificado (por ejemplo, un anticuerpo) se une a una proteína particular al menos dos veces más que el fondo y no se une sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NAMPT (por ejemplo, un anticuerpo anti-NAMPT radiomarcado (por ejemplo, marcado con un radioisótopo, tal como marcado con ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P, ^{99m}Tc, o similares), un anticuerpo anti-NAMPT marcado enzimáticamente (por ejemplo, marcado con una enzima, tal como con peroxidasa de rábano picante (HRP), un anticuerpo anti-NAMPT, un anticuerpo anti-NAMPT marcado con fluorescencia (p. ej., marcado con un fluoróforo), un anticuerpo anti-NAMPT marcado con un agente quimioluminiscente y/o un anticuerpo anti-NAMPT marcado con un compuesto) puede unirse a NAMPT al menos aproximadamente dos veces más que el fondo y no se une sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en una muestra biológica y puede usarse como agente de detección y/o como agente de captura para la detección de NAMPT en una muestra biológica (por ejemplo, en una muestra biológica de un sujeto de prueba o un sujeto de control). La unión específica de un anticuerpo en tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína o proteína particular, pero no para sus proteínas "hermanas" similares. Se puede utilizar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular o una forma particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (ver, por ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988) para una descripción de los formatos y condiciones de los inmunoensayos que pueden usarse para determinar anticuerpos específicos. inmunorreactividad). Normalmente, una reacción de unión específica o selectiva será al menos el doble de la señal o ruido de fondo y, más normalmente, más de 10 a 100 veces el fondo. Por otro lado, el término "unir específicamente" cuando se usa en el contexto de referirse a una secuencia de polinucleótidos que forma un complejo

bicatenario con otra secuencia de polinucleótidos describe "hibridación de polinucleótidos" basada en el emparejamiento de bases de Watson-Crick, como se proporciona en la definición del término "método de hibridación de polinucleótidos".

Tal como se utiliza en esta solicitud, un "aumento" o una "disminución" se refiere a un cambio positivo o negativo detectable en la cantidad de un control de comparación, por ejemplo, un nivel normal establecido o un control estándar establecido. Un aumento es un cambio positivo que normalmente es de al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o más, y puede ser tan alto como al menos aproximadamente 2 veces o al menos aproximadamente 5 veces o incluso aproximadamente 10 veces el valor normal o de control. De manera similar, una disminución es un cambio negativo que típicamente es de al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o por debajo del valor normal o de control. Otros términos que indican cambios cuantitativos o diferencias desde una base comparativa, tales como "más", "menos", "más alto" y "más bajo", se usan en esta solicitud de la misma manera que se describe anteriormente. Por ejemplo, una mayor expresión de NAMPT en un sujeto de prueba indica que el nivel de expresión de NAMPT en una muestra biológica del sujeto de prueba es al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o por encima del nivel normal, nivel de control, nivel de control saludable o nivel de referencia de expresión de NAMPT (p. ej., nivel de expresión de NAMPT en el mismo tipo de muestra biológica de un sujeto antes del inicio de RILI o nivel de expresión de NAMPT en el mismo tipo de muestra biológica de un sujeto de control, tal como un sujeto de control sano (por ejemplo, un sujeto sin RILI y/o un sujeto sin ninguna enfermedad pulmonar)). Por el contrario, el término "sustancialmente igual" o "sustancialmente sin cambios" indica poco o ningún cambio en la cantidad del valor de control estándar, típicamente dentro del +10 % del control estándar, o dentro de ± 5 %, 2 % o incluso menos variación con respecto al control estándar.

El término "inhibir" o "inhibición", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier efecto negativo detectable sobre un proceso biológico objetivo, tal como transducción de señales celulares, proliferación celular, inflamación, expresión y gravedad de una enfermedad/afección. Normalmente, una inhibición se refleja en una disminución de al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o más en el proceso objetivo (p. ej., expresión de NAMPT a nivel de ARNm o de proteína) tras la aplicación de un inhibidor (p. ej., un anticuerpo anti-NAMPT), en comparación con un control en el que no se aplica el inhibidor.

Un "método de hibridación de polinucleótidos" como se usa en el presente documento se refiere a un método para detectar la presencia y/o cantidad de una secuencia de polinucleótidos predeterminada basándose en su capacidad para formar pares de bases de Watson-Crick, en condiciones de hibridación apropiadas, con una sonda de polinucleótidos de una secuencia conocida. Ejemplos de tales métodos de hibridación incluyen transferencia Southern, transferencia Northern e hibridación in situ.

Una "etiqueta", "etiqueta detectable" o "fracción detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen radioisótopos o radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o similares), tintes fluorescentes, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usan comúnmente en un ELISA, tal como HRP), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo, incorporando un componente radiactivo en el péptido o usarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido. Normalmente, se une una etiqueta detectable a una sonda o una molécula (por ejemplo, a un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-NAMPT) con características de unión definidas (por ejemplo, un polipéptido con una especificidad de unión conocida o un polinucleótido), para permitir la presencia de la sonda o la molécula y por lo tanto su objetivo de unión (por ejemplo, NAMPT como objetivo de unión de un anticuerpo anti-NAMPT marcado) sean fácilmente detectables.

"Nivel normal" o "control estándar" o "nivel de control" o "nivel de control saludable" o "nivel de referencia", como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a una cantidad o concentración predeterminada de una secuencia de polinucleótidos o polipéptido, por ejemplo, ADN genómico, ARNm o proteína de NAMPT, que está presente en una muestra biológica normal establecida libre de enfermedad, por ejemplo, en una muestra biológica de un sujeto antes del inicio de RILI o en una muestra biológica de un sujeto de control, tal como un sujeto de control sano (por ejemplo, un sujeto sin RILI y/o un sujeto sin ninguna enfermedad pulmonar). El valor de nivel normal, el valor de control estándar, el nivel de control valor, nivel de control saludable El valor o valor del nivel de referencia es adecuado para el uso de un método de la presente invención, para servir como base para comparar la cantidad de ADN genómico, ARNm o proteína de NAMPT que está presente en una muestra de prueba (por ejemplo, en un laboratorio biológico) de un sujeto de prueba). Un valor de nivel normal, un valor de control estándar, un valor de nivel de control, un valor de nivel de control saludable o valor del nivel de referencia puede variar dependiendo de la naturaleza de la muestra, así como de otros factores como el género, la edad y el origen étnico de los sujetos en función de los cuales se establece dicho valor de control.

El término "promedio", tal como se usa en el contexto de describir a un ser humano sano, libre de cualquier enfermedad pulmonar (especialmente RILI) como se define convencionalmente, se refiere a ciertas características, especialmente las copias de la secuencia genómica de NAMPT o la cantidad de ARNm de NAMPT o proteína, que se encuentra en la muestra biológica de la persona (p. ej., célula, tejido (p. ej., tejido pulmonar, tejido de amígdalas, tejido torácico, etc.) o plasma) que son representativos de un grupo seleccionado al azar de humanos sanos que están libres de cualquier

enfermedad pulmonar (especialmente RILI) y libre de riesgo conocido de desarrollar la enfermedad. Este grupo seleccionado debe comprender un número suficiente de humanos de modo que el número de copias promedio y la cantidad promedio de ARNm o proteína de NAMPT en la muestra biológica entre estos individuos reflejen, con precisión razonable, el número de copias correspondiente del gen NAMPT y la cantidad de proteína ARNm de NAMPT en la población general de seres humanos sanos. Además, el grupo seleccionado de humanos generalmente tiene una edad similar a la de un sujeto (por ejemplo, un sujeto de prueba) cuya muestra biológica se analiza para determinar la indicación de RILI. Además, también se consideran otros factores como el género, el origen étnico y el historial médico y, preferiblemente, se hace una estrecha correspondencia entre los perfiles del sujeto de prueba y el grupo seleccionado de individuos, estableciendo el valor "promedio".

El término "cantidad", tal como se utiliza en esta solicitud, se refiere a la cantidad de un polinucleótido de interés o un polipéptido de interés, por ejemplo, ADN genómico de NAMPT humano, ARNm de NAMPT o proteína NAMPT, presente en una muestra. Dicha cantidad puede expresarse en términos absolutos, es decir, la cantidad total del polinucleótido o polipéptido en la muestra, o en términos relativos, es decir, la concentración del polinucleótido o polipéptido en la muestra.

El término "tratar" o "tratado", tal como se utiliza en esta solicitud, describe un acto que conduce a la eliminación, reducción, alivio, reversión o prevención o retraso de la aparición o recurrencia de cualquier síntoma de una afección relevante. En otras palabras, "tratar" una afección abarca tanto una intervención terapéutica como profiláctica contra la afección.

El término "cantidad eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad de una sustancia determinada que es suficiente para producir un efecto deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un inhibidor de NAMPT (por ejemplo, un anticuerpo anti-NAMPT) es la cantidad de dicho inhibidor para lograr un nivel disminuido de expresión de ARNm o proteína de NAMPT o actividad biológica, de modo que los síntomas, la gravedad y/o la aparición de RILI se reducen, revierten, eliminan, previenen o retrasan en un paciente a quien se le ha administrado el inhibidor de NAMPT con fines terapéuticos. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". El rango de dosificación varía según la naturaleza del agente terapéutico que se administra y otros factores tales como la vía de administración y la gravedad del estado del paciente.

El término "sujeto" o "sujeto que necesita tratamiento", tal como se utiliza en este documento, incluye personas que buscan atención médica debido al riesgo de padecer RILI o a sufrirlo. Los sujetos también incluyen individuos actualmente en terapia que buscan manipulación del régimen terapéutico. Los sujetos o individuos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que demuestran síntomas de RILI o están en riesgo de desarrollar RILI (por ejemplo, un paciente con cáncer sometido a radioterapia torácica y/o un sujeto expuesto a radiación ionizante (RI), por ejemplo, de un incidente nuclear). Por ejemplo, un sujeto que necesita tratamiento incluye individuos que han sufrido síntomas relevantes de RILI en el pasado, aquellos que padecen RILI y aquellos que han estado expuestos a una sustancia o evento desencadenante (por ejemplo, pacientes con cáncer sometidos a radioterapia torácica y/o sujeto expuesto a RI, por ejemplo, debido a un incidente nuclear). Un "sujeto que necesita tratamiento" puede estar en cualquier edad de la vida.

Como se usa en el presente documento, "sujeto de prueba" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que va a ser evaluado para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de RILI mediante los métodos descritos en el presente documento. Los sujetos de prueba pueden incluir sujetos que demuestran síntomas de RILI, y sujetos que están en riesgo de desarrollar RILI (por ejemplo, un paciente con cáncer sometido a radioterapia torácica y/o un sujeto expuesto a RI, por ejemplo, por un incidente nuclear). En algunas formas de realización, un sujeto de prueba puede ser un individuo que ha sufrido síntomas relevantes de RILI en el pasado, un sujeto que padece RILI y/o un sujeto que ha estado expuesto a una sustancia o evento desencadenante (por ejemplo, un paciente con cáncer sometido a radioterapia torácica y/o sujeto expuesto a RI, por ejemplo, debido a un incidente nuclear).

Como se usa en el presente documento, "sujeto de control" o "sujeto de control sano" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que no tiene RILI y/o un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que no tiene ninguna enfermedad pulmonar. La muestra biológica de un sujeto de control o de un sujeto de control sano muestra un nivel normal, un nivel de control saludable o un nivel de referencia de expresión de NAMPT.

"Inhibidores", "activadores", y "moduladores" de la proteína NAMPT se utilizan para referirse a moléculas inhibidoras, activadoras o moduladoras, respectivamente, identificadas mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* para la unión o señalización de la proteína NAMPT, por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los inhibidores son agentes que, por ejemplo, bloquean parcial o totalmente la unión, disminuir, prevenir, retrasar la activación, inactivar, desensibilizar o regular negativamente la actividad de la proteína NAMPT. En algunos casos, el inhibidor se une directa o indirectamente a la proteína NAMPT, como un anticuerpo neutralizante (p. ej., un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado). Los inhibidores, tal como se utilizan en el presente documento, son sinónimos de inactivadores y antagonistas. Los activadores son agentes que, por ejemplo, estimulan, aumentan, facilitan, mejoran la activación, sensibilizan o regulan positivamente la actividad de la proteína NAMPT. Los moduladores incluyen ligandos de proteína NAMPT o compañeros de unión, incluidas modificaciones de ligandos naturales y ligandos diseñados sintéticamente, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, antagonistas, agonistas, moléculas pequeñas que incluyen moléculas que contienen carbohidratos, ARNip, aptámeros de ARN y similares.

El término "promotor", como se utiliza en este documento, se refiere a un grupo de módulos de control transcripcional que se agrupan alrededor del sitio de iniciación de la ARN polimerasa II. Gran parte de la idea sobre cómo se organizan los promotores deriva de análisis de varios promotores virales, incluidos los de las unidades de transcripción temprana HSV timidina quinasa (tk) y SV40. Estos estudios, complementados por trabajos más recientes, han demostrado que los promotores están compuestos de módulos funcionales discretos, cada uno de los cuales consta de aproximadamente 7 a 20 pb de ADN y contienen uno o más sitios de reconocimiento para proteínas activadoras de la transcripción.

Al menos un módulo en cada promotor funciona para posicionar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo más conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, como el promotor del gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamíferos y el promotor de los genes tardíos SV40, un elemento discreto que se superpone al sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de iniciación.

Un "diagnóstico" o el término "diagnóstico" en el contexto de la presente invención significa identificar la presencia o naturaleza de RILI, tal como identificar la presencia o naturaleza de RILI en un sujeto de prueba usando NAMPT como biomarcador mediante los métodos descritos en el presente documento. Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La sensibilidad de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de verdaderos positivos). Los individuos enfermos no detectados por el ensayo son falsos negativos. Los sujetos que no están enfermos y que dan negativo en el ensayo se denominan verdaderos negativos. La especificidad de un ensayo de diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de falsos positivos se define como la proporción de personas sin la enfermedad que dan positivo. Si bien un método de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente que el método proporcione una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

El término "pronóstico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un pronóstico en cuanto al resultado probable de RILI así como a la perspectiva de recuperación de RILI según lo indicado por la naturaleza y los síntomas del caso. Por ejemplo, en el presente documento se describen métodos para pronosticar el resultado probable de RILI, así como la perspectiva de recuperación de RILI en sujetos de prueba que utilizan NAMPT como biomarcador. Un pronóstico negativo o malo se define por un período o tasa de supervivencia posterior al tratamiento más bajo. Por el contrario, un pronóstico positivo o bueno se define por un plazo o tasa de supervivencia elevados después del tratamiento. Por lo general, el pronóstico se proporciona como el tiempo de supervivencia libre de progresión o supervivencia general.

El término "supervisión de la progresión" significa, a efectos de la presente invención, observar la progresión de RILI en un sujeto de prueba. En algunas formas de realización, un sujeto de prueba (por ejemplo, un sujeto con RILI) que está en terapia (por ejemplo, con un inhibidor de NAMPT, tal como un anticuerpo anti-NAMPT), se controla regularmente durante la terapia para determinar el efecto de la terapia aplicada (por ejemplo, efecto sobre la gravedad de RILI y/o efecto sobre la expresión de NAMPT), que permite al médico estimar en una etapa temprana durante la terapia si el tratamiento prescrito es eficaz o no y, por lo tanto, ajustar el régimen de tratamiento en consecuencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La lesión pulmonar inducida por radiación (RILI), la neumonitis por radiación y la fibrosis por radiación son consecuencias potencialmente mortales de la radiación torácica con una necesidad insatisfecha de biomarcadores de RILI confiables y estrategias terapéuticas novedosas. La contribución de la inflamación al desarrollo de RILI respalda un enfoque para reducir las señales de daño y la consiguiente carga inflamatoria en individuos expuestos a RI.

Nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT)

La nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) también se conoce como factor potenciador de colonias de células pre-B (PBEF) o visfatina. El gen NAMPT humano (NAMPT) se encuentra en el cromosoma 7 (segmento 7q22.3; pares de bases 106.248.285 a 106.286.326). La secuencia de ADN humano de NAMPT se proporciona en el número de acceso de GenBank NM_005746. Esta secuencia también corresponde a SEQ ID NO: 1. El gen NAMPT codifica una proteína que existe en dos formas, NAMPT intracelular (iNAMPT) y NAMPT extracelular (eNAMPT), donde iNAMPT cataliza la síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). La secuencia de la proteína codificada por el gen NAMPT se proporciona como SEQ ID NO: 2.

NAMPT se ha caracterizado como una citocina proinflamatoria basándose en su efecto sobre la maduración de las células B (Samal et al., Mol Cell Biol 14:1431-1437 (1994)) y se ha informado que regula la secreción de insulina en células beta como una enzima biosintética de NAD sistémica (Revollo et al., Cell Metab 6:363-375 (2007)). Se ha demostrado que NAMPT aumenta la producción de IL-6, TNF- α e IL-13 en monocitos, macrófagos y células dendríticas CD14+, mejora la eficacia de las células T y participa en el desarrollo de linfocitos B y T. (Sun et al., Cytokine & Growth Factor Reviews 24:433-442 (2013)). Kim et al. describen en detalle una estructura cristalina de la enzima NAMPT (J Mol Biol 362:66-77 (2006)). NAMPT es la enzima limitante de la velocidad en la vía de recuperación de NAD que convierte la nicotinamida en mononucleótido de nicotinamida en mamíferos para permitir la biosíntesis de NAD. La forma madura de la proteína NAMPT extracelular es un homodímero de aproximadamente 120 kDa (Takahashi et al., J Biochem 147:95-107(2010)).

Se ha establecido que mutaciones que reducen o inhiben la función de la enzima NAMPT pueden reducir los procesos fisiopatológicos que dan lugar a trastornos como la leucemia y la hipertensión arterial pulmonar (HAP).

NAMPT ha sido identificado como un ligando para el receptor tipo Toll 4 (TLR4), una proteína que en los humanos está codificada por el gen TLR4. TLR4 es una proteína transmembrana y un miembro de la familia de receptores tipo peaje, que pertenece a la familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). La activación de TLR4 conduce a una vía de señalización intracelular de NF-KB y a la producción de citoquinas inflamatorias, que es responsable de activar el sistema inmunológico innato. TLR4 es más conocido por reconocer el lipopolisacárido (LPS), un componente presente en muchas bacterias Gram negativas (p. ej., *Neisseria* spp.) y en bacterias Gram positivas seleccionadas. Su ligando también incluye varias proteínas virales, polisacáridos y una variedad de proteínas endógenas como lipoproteínas de baja densidad, beta defensinas y proteínas de choque térmico. El gen TLR4 humano está situado en el cromosoma 9 (segmento 9q32-q33) (Georgel et al., PLoS ONE 4(11):e7803 (2009)). Las secuencias de ácido nucleico para el producto del gen 23 TLR4 humano son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Secuencia de referencia NCBI: AAY82268.1, Receptor tipo toll 4 de homo sapiens (TLR4), ARNm. Las secuencias de aminoácidos del TLR4 humano son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, número de acceso de GenBank AAY82268.

NAMPT ha sido identificada como una potente citocina proinflamatoria con un papel en la fisiopatología del síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y la lesión pulmonar inducida por el ventilador. Tanto iNAMPT como eNAMPT se han relacionado con la regulación del metabolismo, las respuestas al estrés, la apoptosis, el envejecimiento y la fibrosis. eNAMPT amplifica profundamente la respuesta inflamatoria desregulada que resulta en disfunción orgánica, tormenta de citoquinas y muerte en varias enfermedades críticas graves. iNAMPT es una diana terapéutica altamente farmacológica en el cáncer; sin embargo, los inhibidores enzimáticos iNAMPT han fracasado en los ensayos clínicos sobre cáncer de fase II y fase III debido a una toxicidad inaceptable.

La presente divulgación está dirigida al uso de NAMPT como biomarcador en RILI. También se describen métodos y composiciones para el uso de NAMPT como diana terapéutica en RILI.

Uso de NAMPT como biomarcador en RILI

Se describen en el presente documento métodos (por ejemplo, métodos *in vitro*) y composiciones para el uso de NAMPT como biomarcador en RILI. En algunas formas de realización, la expresión de NAMPT (p. ej., expresión de ADN, ARN y/o proteína de NAMPT) es mayor (p. ej., en un 5 % o más, tal como en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o más) en un sujeto con RILI en comparación con la expresión de NAMPT en el sujeto antes del inicio de RILI o en comparación con la expresión de NAMPT en un sujeto de control, tal como un sujeto de control sano (por ejemplo, un sujeto sin RILI y/o cualquier enfermedad pulmonar). Por ejemplo, la expresión de NAMPT (p. ej., expresión de ADN, ARN y/o proteína de NAMPT) puede ser mayor (p. ej., en un 5 % o más, tal como en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o más) en un tejido (p. ej., tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o en plasma de un sujeto con RILI en comparación con la expresión de NAMPT en el tejido o plasma del sujeto antes del inicio de RILI o en comparación con la expresión de NAMPT en el tejido o plasma de un sujeto de control, tal como un sujeto de control sano (por ejemplo, un sujeto sin RILI y/o cualquier enfermedad pulmonar).

En algunas formas de realización, el aumento de la expresión de NAMPT en un tejido (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o en plasma de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene riesgo de desarrollar RILI) puede indicar la aparición de RILI en el sujeto. Alternativamente, el aumento de la expresión de NAMPT en un tejido (p. ej., tejido pulmonar, tejido de amígdalas, tejido torácico, etc.) o en el plasma de un sujeto (p. ej., un sujeto que tiene riesgo de desarrollar RILI) puede indicar la aparición de RILI en el sujeto. Adicional o alternativamente, el aumento de la expresión de NAMPT en un tejido (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o en plasma de un sujeto puede indicar que el sujeto tiene un mayor riesgo de desarrollar RILI. Un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene riesgo de desarrollar RILI puede ser un paciente con cáncer sometido a radioterapia torácica. Adicional o alternativamente, un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene riesgo de desarrollar RILI puede ser un sujeto expuesto a radiación ionizante (RI), por ejemplo, de un incidente nuclear.

En algunas formas de realización, un sujeto (p. ej., un ser humano) con un nivel superior al normal (o nivel de control estándar, nivel de control, nivel de control saludable o nivel de referencia) de expresión de NAMPT en tejido (p. ej., tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o plasma es indicativo de un sujeto con RILI. Adicional o alternativamente, un sujeto (por ejemplo, un ser humano) con un nivel superior al normal de expresión de NAMPT en tejido (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido de amígdalas, tejido torácico, etc.) o plasma es indicativo de un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar RILI. En algunas formas de realización, el nivel normal (o nivel de control estándar, nivel de control, nivel de control saludable o nivel de referencia) de expresión de NAMPT es el nivel de expresión de NAMPT en tejido (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o plasma de un sujeto antes del inicio de RILI. En algunas formas de realización, el nivel normal (o nivel de control estándar, nivel de control, nivel de control saludable o nivel de referencia) de expresión de NAMPT es el nivel de expresión de NAMPT en tejido (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o plasma de un sujeto de control, tal como un sujeto de control sano (por ejemplo, un sujeto sin RILI y/o cualquier enfermedad pulmonar).

Debe contemplarse que para los fines de los métodos actualmente divulgados, la expresión de NAMPT en una muestra biológica de un sujeto de prueba (por ejemplo, un sujeto sospechoso de tener RILI y/o un sujeto con riesgo de desarrollar RILI) debe compararse con el nivel normal (o nivel de control estándar, nivel de control, nivel de control saludable o nivel de referencia) de expresión de NAMPT en una muestra biológica del mismo tipo (por ejemplo, nivel de expresión de NAMPT en una muestra biológica del mismo tipo de un sujeto antes del inicio de RILI y/o nivel de expresión de NAMPT en muestra biológica del mismo tipo de un sujeto de control). Por ejemplo, para los fines de los métodos actualmente divulgados: la expresión de NAMPT en tejido pulmonar de un sujeto de prueba debe compararse con el nivel normal de expresión de NAMPT en tejido pulmonar; la expresión de NAMPT en tejido amigdalino de un sujeto de prueba debe compararse con el nivel normal de expresión de NAMPT en tejido amigdalino; la expresión de NAMPT en el tejido torácico de un sujeto de prueba debe compararse con el nivel normal de expresión de NAMPT en el tejido torácico; y/o la expresión de NAMPT en plasma de un sujeto de prueba debe compararse con el nivel normal de expresión de NAMPT en plasma.

Se contempla que puedan generarse uno o más estándares en los que se defina o identifique un nivel normal de expresión de NAMPT. Entonces se puede hacer referencia a ese estándar como una forma de determinar si la expresión en un sujeto determinado (por ejemplo, un sujeto de prueba, tal como un sujeto del que se sospecha que tiene RILI y/o un sujeto con riesgo de desarrollar RILI) es normal o superior a lo normal. El tipo de estándar generado dependerá del ensayo o prueba empleada para evaluar la expresión de NAMPT. En algunas formas de realización, se asigna una puntuación a una muestra basándose en ciertos criterios, y los números dentro o por encima de un cierto número o rango se consideran "por encima de lo normal". En algunas formas de realización, la expresión de NAMPT se considera por encima de lo normal si un ensayo indica que una medición, cantidad o nivel particular de expresión de NAMPT es aproximadamente o como máximo aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o por encima de la medición, cantidad o nivel observado en tejido o plasma que tiene niveles normales de expresión de NAMPT (p. ej., por encima de la medición, cantidad o nivel observado en tejido o plasma de un sujeto antes del inicio de RILI o por encima de la medición, cantidad o nivel observado en tejido o plasma de un sujeto de control (por ejemplo, un sujeto sin RILI y/o un sujeto sin ninguna enfermedad pulmonar)). En formas de realización preferidas, la expresión de NAMPT se considera por encima de lo normal si un ensayo indica que una medición, cantidad o nivel particular de expresión de NAMPT es aproximadamente o como máximo aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o por encima de la medición, cantidad o nivel observado en tejido o plasma que tienen niveles normales de expresión de NAMPT (p. ej., por encima de la medición, cantidad o nivel observado en tejido o plasma de un sujeto antes del inicio de RILI o por encima de la medición, cantidad o nivel observado en tejido o plasma de un sujeto de control (por ejemplo, un sujeto sin RILI)). Alternativamente, en algunas formas de realización, la expresión de NAMPT se considera por encima de lo normal si un ensayo indica que una medición, cantidad o nivel particular de expresión de NAMPT es aproximadamente o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más desviaciones estándar por encima de la medición, cantidad o nivel de NAMPT observado en células, tejidos o plasma que tienen niveles normales de expresión de NAMPT. En otros casos, la expresión de NAMPT puede considerarse superior a lo normal si una medición, cantidad o nivel de NAMPT es o es aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más veces mayor que la medición, cantidad o nivel de NAMPT observado en células, tejidos o plasma que tienen niveles normales de expresión NAMPT.

Evaluación de la expresión de NAMPT

Se contempla que los niveles de NAMPT puedan analizarse a partir de una muestra de un sujeto, tal como un sujeto de prueba (por ejemplo, un sujeto que se sospecha que tiene RILI y/o un sujeto que tiene un mayor riesgo de tener RILI). En algunas formas de realización, una muestra de un sujeto se refiere a una muestra biológica. En algunas formas de realización, la muestra biológica incluye, entre otras, una biopsia o sección de tejido (por ejemplo, biopsia o sección de tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.), muestra de sangre, lavado, hisopo, raspado, aspirado del pezón, u otra composición que pueda extraerse del cuerpo y que contenga células. En otras formas de realización, la muestra biológica incluye plasma. En formas de realización particulares, una muestra de un sujeto (por ejemplo, un sujeto de prueba) puede contener todo o parte de una biopsia de tejido (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.). En formas de realización adicionales, una muestra de un sujeto (por ejemplo, un sujeto de prueba) puede contener toda o parte de una biopsia de tejido pulmonar, que puede ser de una biopsia bilateral o una biopsia unilateral.

En el presente documento se proporcionan métodos para evaluar la expresión de NAMPT en células, tejidos o plasma, tal como en células, tejidos o plasma de un sujeto (por ejemplo, un sujeto de prueba). La expresión de NAMPT en células, tejidos o plasma se puede evaluar mediante varias formas que directa o indirectamente proporcionan información sobre su expresión. Por lo tanto, las formas de evaluar la expresión de NAMPT incluyen, entre otras, evaluar o medir la proteína correspondiente, evaluar o medir el transcrito correspondiente, secuenciar el transcrito o secuencia genómica correspondiente y analizar la actividad de NAMPT. NAMPT se puede detectar en una muestra biológica (por ejemplo, célula, tejido, plasma), etc. usando métodos similares a los descritos en la patente de EE. UU. nº 9.409.983.

I. Metodología general

La práctica de los métodos descritos en este documento utiliza técnicas de rutina en el campo de la biología molecular. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta divulgación incluyen Sambrook y Russell,

Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994)).

Para los ácidos nucleicos, los tamaños se dan en kilobases (kb) o en pares de bases (pb). Estas son estimaciones derivadas de electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, de ácidos nucleicos secuenciados o de secuencias de ADN publicadas. Para las proteínas, los tamaños se dan en kilodaltons (kDa) o números de residuos de aminoácidos. Los tamaños de las proteínas se estiman a partir de electroforesis en gel, de proteínas secuenciadas, de secuencias de aminoácidos derivadas o de secuencias de proteínas publicadas.

Los oligonucleótidos que no están disponibles comercialmente pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo, según el método del triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Lett 22:1859-1862 (1981), usando un sintetizador automático, como se describe en Van Devanter et. al., Nucleic Acids Res 12:6159-6168 (1984). La purificación de oligonucleótidos se realiza usando cualquier estrategia reconocida en la técnica, por ejemplo, electroforesis en gel de acrilamida nativa o cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de intercambio aniónico como se describe en Pearson y Reanier, J Chrom 255: 137-149 (1983).

La secuencia de interés utilizada en esta invención, por ejemplo, la secuencia de polinucleótidos del gen NAMPT humano, se puede verificar usando, por ejemplo, el método de terminación de cadena para plantillas bicatenarias de Wallace et al., Gene 16: 21-26 (1981).

II. Adquisición de muestras de tejido y análisis de ARNm o ADN de NAMPT

La presente divulgación se refiere a un método (por ejemplo, un método *in vitro*) para medir la cantidad de ARNm de NAMPT o ADN genómico de NAMPT encontrado en una célula, tejido (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o muestra de plasma de un sujeto, como medio para detectar la presencia, evaluar el riesgo de desarrollar, diagnosticar, pronosticar y/o controlar la progresión o la eficacia del tratamiento de RILI. Por lo tanto, los primeros pasos para practicar los métodos de esta divulgación (por ejemplo, métodos *in vitro* para usar NAMPT como biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de RILI) son obtener una muestra de células, tejido o plasma de un sujeto de prueba y extraer ARNm o ADN de la muestra.

A. Adquisición y preparación de muestras

Una muestra biológica (p. ej., célula, tejido (p. ej., tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o plasma) se obtiene de una persona a la que se va a analizar o controlar para detectar RILI usando un método de la presente divulgación. Se deben tomar muestras biológicas del mismo tipo tanto de un sujeto de prueba (p. ej., un sujeto con sospecha de tener RILI y/o un sujeto en riesgo de desarrollar RILI) como de un sujeto de control (p. ej., un sujeto que no padece RILI y/o cualquier trastorno pulmonar). La recogida de una muestra biológica de un sujeto, tal como un sujeto de prueba, se realiza de acuerdo con el protocolo estándar que generalmente siguen los hospitales o clínicas. Se recoge una cantidad apropiada de muestra biológica (p. ej., células, tejido (p. ej., tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o plasma) y se puede almacenar según procedimientos estándar antes de una preparación adicional.

El análisis del ARNm o ADN de NAMPT encontrado en una muestra biológica de un sujeto (por ejemplo, un sujeto de prueba) según el método descrito en el presente documento se puede realizar usando, por ejemplo, células, tejidos o plasma. Los métodos para preparar muestras biológicas para la extracción de ácidos nucleicos son bien conocidos entre los expertos en la técnica. Por ejemplo, primero se debe tratar el tejido de un sujeto (por ejemplo, un sujeto de prueba) para alterar la membrana celular y liberar los ácidos nucleicos contenidos dentro de las células.

B. Extracción y cuantificación de ADN y ARN

Los métodos para extraer ADN de una muestra biológica son bien conocidos y se practican de forma rutinaria en la técnica de la biología molecular (por ejemplo, descritos por Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d ed., 2001). Debe eliminarse la contaminación por ARN para evitar interferencias con el análisis de ADN.

Asimismo, existen numerosos métodos para extraer ARNm de una muestra biológica. Pueden seguirse los métodos generales de preparación de ARNm, véase, por ejemplo, Sambrook and Russell, supra; diversos reactivos o kits disponibles comercialmente, tales como reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California), kits de ARNm OligotexDirect (Qiagen, Valencia, California), RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Alemania) y PolyATtract.RTM. Serie 9600.TM. (Promega, Madison, Wisconsin), también puede usarse para obtener ARNm de una muestra biológica de un sujeto de prueba. También se pueden utilizar combinaciones de más de uno de estos métodos. Es esencial que todo el ADN contaminante sea eliminado de las preparaciones de ARN. Por lo tanto, se debe utilizar un manejo cuidadoso de las muestras, un tratamiento exhaustivo con ADNasa y controles negativos adecuados en los pasos de amplificación y cuantificación.

1. Determinación cuantitativa del nivel de ADN o ARNm basada en PCR

Una vez que se extrae el ADN o el ARNm de una muestra, se puede cuantificar la cantidad de ADN genómico o ARNm de NAMPT humano. El método preferido para determinar el nivel de ADN o ARNm es un método basado en amplificación, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), especialmente reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para análisis cuantitativo de ARNm.

Si bien el ADN genómico de NAMPT está sujeto directamente a amplificación, el ARNm debe primero transcribirse de manera inversa. Antes del paso de amplificación, se debe sintetizar una copia de ADN (ADNc) del ARNm de NAMPT humano. Esto se logra mediante transcripción inversa, que se puede llevar a cabo como un paso separado, o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa homogénea (RT-PCR), una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el ARN. Romero y Rotbart describen métodos adecuados para la amplificación por PCR de ácidos ribonucleicos en *Diagnostic Molecular Bio/ogy: Principles and Applications*, págs. 401-406, Persing et al., eds., Mayo Foundation, Rochester, Minn (1993); Egger y col., *J Clin Microbio/* 33:1442-1447, (1995); y la patente de EE. UU. nº 5.075.212.

Los métodos generales de PCR son bien conocidos en la técnica y, por tanto, no se describen en detalle en el presente documento. Para una revisión de los métodos, protocolos y principios de PCR en el diseño de cebadores, véase, por ejemplo, Innis y otros, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y., 1990. Los reactivos y protocolos de PCR también están disponibles en proveedores comerciales, como Roche Molecular Systems.

La PCR suele realizarse como un proceso automatizado con una enzima termoestable. En este proceso, la temperatura de la mezcla de reacción circula automáticamente a través de una región desnaturalizante, una región de hibridación del cebador y una región de reacción de extensión. Se encuentran disponibles comercialmente máquinas específicamente adaptadas para este fin.

Aunque la amplificación por PCR del ADN o ARNm genómico diana se usa típicamente en la práctica de la presente divulgación, un experto en la técnica reconocerá, sin embargo, que la amplificación de estas especies de ADN o ARNm en una muestra se puede lograr mediante cualquier método conocido, tal como reacción en cadena de ligasa (RCL), amplificación mediada por transcripción y replicación de secuencia autosostenida o amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), cada una de las cuales proporciona suficiente amplificación. La tecnología de ADN ramificado desarrollada más recientemente también se puede utilizar para determinar cuantitativamente la cantidad de ADN o ARNm en la muestra. Para una revisión de la amplificación de señales de ADN ramificadas para la cuantificación directa de secuencias de ácidos nucleicos en muestras clínicas, véase Nolte, *Adv Clin Chem* 33:201-235 (1998).

Un método de amplificación isotérmica, en el que se utilizan endonucleasas y ligasas de restricción para lograr la amplificación de moléculas diana que contienen nucleótidos 5'-[alfa-tio]trifosfatos en una cadena de un sitio de restricción, también puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención. Amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), descrita en la patente de EE. UU. La patente de EE. UU. número 5.916.779 es otro método para llevar a cabo la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica múltiples rondas de desplazamiento y síntesis de hebras, es decir, traducción de mellas.

Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS), incluida la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y 3SR (solicitud PCT WO 88/10315). La solicitud europea nº 329 822 describe un proceso de amplificación de ácido nucleico que implica la síntesis cíclica de ARN monocatenario ("ARNss"), ADNss y ADN bicatenario (ADNbc), que puede usarse de acuerdo con la presente divulgación. La solicitud PCT WO 89/06700 describe un esquema de amplificación de secuencia de ácido nucleico basado en la hibridación de una región promotora/secuencia cebadora con un ADN monocatenario diana ("ADNss") seguido de la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevos moldes a partir de las transcripciones de ARN resultantes. Otros métodos de amplificación incluyen "RACE" y "PCR unilateral" (Frohman, 1990; Ohara et al., 1989).

Después de cualquier amplificación o paso como la extensión del cebador, puede ser deseable separar el producto de amplificación o extensión del cebador de la plantilla y/o el exceso de cebador. En una forma de realización, los productos de amplificación se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poliacrilamida usando métodos estándar (Sambrook et al., 2001). Los productos de amplificación separados se pueden cortar y eluir del gel para manipulación adicional. Utilizando geles de agarosa de bajo punto de fusión, la banda separada se puede eliminar calentando el gel, seguido de la extracción del ácido nucleico.

La separación de ácidos nucleicos también se puede efectuar mediante técnicas cromatográficas conocidas en la técnica. Hay muchos tipos de cromatografía que se pueden usar en la práctica de la presente invención, incluyendo adsorción, partición, intercambio iónico, hidroxipatita, tamiz molecular, fase inversa, columna, papel, capa fina y cromatografía de gases, así como HPLC.

En determinadas formas de realización, se visualizan los productos de amplificación. Un método de visualización típico implica teñir un gel con bromuro de etidio y visualizar bandas bajo luz ultravioleta. Alternativamente, si los productos de amplificación están marcados integralmente con nucleótidos marcados radio o fluorométricamente, los productos de

amplificación separados pueden exponerse a una película de rayos X o visualizarse bajo los espectros excitadores apropiados.

En una forma de realización, tras la separación de los productos de amplificación, se pone en contacto una sonda de ácido nucleico marcada con la secuencia marcadora amplificada. La sonda preferiblemente está conjugada con un cromóforo pero puede estar radiomarcada. En otra forma de realización, la sonda se conjuga con un compañero de unión, tal como un anticuerpo o biotina, u otro compañero de unión que porta un resto detectable.

En formas de realización particulares, la detección se realiza mediante transferencia Southern e hibridación con una sonda marcada. Las técnicas implicadas en la transferencia Southern son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase Sambrook et al., 2001). Un ejemplo de lo anterior se describe en la patente de EE. UU. 5.279.721, que describe un aparato y un método para la electroforesis y transferencia automatizadas de ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y la transferencia sin necesidad de pruebas externas manipulación del gel y es ideal para llevar a cabo métodos según la presente invención.

Otros métodos de detección de ácidos nucleicos que pueden usarse en la práctica de la presente divulgación se describen en las patentes de EE. UU. N^{os} 5,840,873, 5,843,640, 5,843,651, 5,846,708, 5,846,717, 5,846,726, 5,846,729, 5,849,487, 5,853,990, 5,853,992, 5,853,993, 5,856,092, 5,861,244, 5,863,732, 5,863,753, 5,866,331, 5,905,024, 5,910,407, 5,912,124, 5,912,145, 5,919,630, 5,925,517, 5,928,862, 5,928,869, 5,929,227, 5,932,413 y 5,935,791.

La transcripción inversa (TI) de ARN a ADNc seguida de PCR cuantitativa relativa (RT-PCR) se puede utilizar para determinar las concentraciones relativas de especies de ARNm específicas aisladas de una célula, tal como una transcripción que codifica NAMPT. Al determinar que la concentración de una especie de ARNm específica varía, se demuestra que el gen que codifica la especie de ARNm específica se expresa diferencialmente. Se contemplan específicamente tecnologías de ADN basadas en chips tales como las descritas por Hacia et al. (1996) y Shoemaker et al. (1996). Brevemente, estas técnicas implican métodos cuantitativos para analizar una gran cantidad de genes de forma rápida y precisa. Al etiquetar genes con oligonucleótidos o utilizar conjuntos de sondas fijas, se puede emplear tecnología de chip para segregar moléculas diana como conjuntos de alta densidad y seleccionar estas moléculas sobre la base de la hibridación (ver también, Pease et al., 1994; y Fodor et al., 1991). Se contempla que esta tecnología pueda usarse junto con la evaluación del nivel de expresión de NAMPT con respecto a los métodos de diagnóstico de la presente divulgación.

2. Otros métodos cuantitativos

El ADN o ARNm de NAMPT también se puede detectar usando otras técnicas estándar, bien conocidas por los expertos en la técnica. Aunque la etapa de detección suele estar precedida por una etapa de amplificación, la amplificación no es necesaria en los métodos de la invención. Por ejemplo, el ADN o el ARNm pueden identificarse mediante fraccionamiento por tamaños (por ejemplo, electroforesis en gel), procedido o no por una etapa de amplificación. Después de analizar una muestra en un gel de agarosa o poliacrilamida y marcarla con bromuro de etidio según técnicas bien conocidas (ver, por ejemplo, Sambrook y Russell, supra), la presencia de una banda del mismo tamaño que la comparación estándar es una indicación de la presencia de un ADN o ARNm diana, cuya cantidad luego puede compararse con el control en función de la intensidad de la banda. Alternativamente, se pueden usar sondas oligonucleotídicas específicas de ADN o ARNm de NAMPT para detectar la presencia de dichas especies de ADN o ARNm e indicar la cantidad de ADN o ARNm en comparación con la comparación estándar, basándose en la intensidad de la señal impartida por la sonda.

La hibridación de sondas específicas de secuencia es un método bien conocido para detectar un ácido nucleico particular que comprende otras especies de ácidos nucleicos. En condiciones de hibridación suficientemente estrictas, las sondas se hibridan específicamente sólo con secuencias sustancialmente complementarias. La rigurosidad de las condiciones de hibridación se puede relajar para tolerar cantidades variables de discrepancia de secuencia.

Varios formatos de hibridación bien conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, ensayos de hibridación en fase de solución, fase sólida o fase mixta. Los siguientes artículos proporcionan una visión general de los diversos formatos de ensayo de hibridación: Singer et al., *Biotechniques* 4:230, 1986; Haase et al., *Methods in Virology*, págs. 189-226, 1984; Wilkinson, *Hibridación in situ*, Wilkinson ed., IRL Press, Oxford University Press, Oxford; y Hames y Higgins eds., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press, 1987.

Los complejos de hibridación se detectan según técnicas bien conocidas. Las sondas de ácido nucleico capaces de hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana, es decir, el ARNm o el ADN amplificado, pueden marcarse mediante cualquiera de varios métodos utilizados normalmente para detectar la presencia de ácidos nucleicos hibridados. Un método común de detección es el uso de autorradiografía utilizando sondas marcadas con ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P, ^{99m}Tc o similares. La elección del isótopo radiactivo depende de las preferencias de investigación debido a la facilidad de síntesis, la estabilidad y las vidas medias de los isótopos seleccionados. Otras etiquetas incluyen compuestos (p. ej., biotina y digoxigenina), que se unen a antilgandos o anticuerpos marcados con fluoróforos, agentes quimioluminiscentes y enzimas. Alternativamente, las sondas se pueden conjugar directamente con marcadores tales como fluoróforos, agentes quimioluminiscentes o enzimas. La elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con la sonda, los requisitos de estabilidad y la instrumentación disponible.

Las sondas y cebadores necesarios para practicar la presente invención se pueden sintetizar y marcar usando técnicas bien conocidas. Los polinucleótidos y oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios al polinucleótido u oligonucleótido NAMPT) usados como sondas y cebadores pueden sintetizarse químicamente de acuerdo con el método del triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letts, 22:1859-1862, 1981, usando un sintetizador automatizado, como se describe en Needham-VanDevanter et al., Nucleic Acids Res 12:6159-6168, 1984. La purificación de oligonucleótidos se realiza mediante electroforesis en gel de acrilamida nativa o mediante HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson y Regnier, J Chrom., 255:137-149, 1983.

En algunas formas de realización de la invención, la expresión de NAMPT se evalúa evaluando la transcripción de NAMPT. La transcripción de NAMPT se puede evaluar mediante una variedad de métodos, incluidos aquellos que implican la amplificación de transcripciones de NAMPT o la forma de realización de transferencias de Northern en transcripciones de NAMPT. La amplificación de transcripciones de NAMPT se puede utilizar en reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas, que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Alternativamente, se pueden implementar ensayos de protección de nucleasas para cuantificar los transcripciones de NAMPT. También se contemplan otros métodos que aprovechan la hibridación entre una sonda y una diana para evaluar la transcripción de NAMPT, como la hibridación fluorescente in situ (FISH) o la hibridación in situ de ARN (RISH). En otra forma de realización, la expresión de ARN de NAMPT se mide usando micromatrices que pueden fabricarse que contienen contenido de secuencia genómica global o biomarcadores específicos de la enfermedad.

C. Polinucleótidos y oligonucleótidos para la detección de NAMPT

En el presente documento se describen polinucleótidos y oligonucleótidos que son capaces de detectar la expresión de NAMPT. Los polinucleótidos u oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden ser complementarios de toda o parte de una secuencia de ácido nucleico que codifica NAMPT (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). Estos ácidos nucleicos se pueden usar directa o indirectamente para valorar, evaluar, cuantificar o determinar la expresión de NAMPT.

Se contempla una secuencia de ácido nucleico complementaria a toda o parte de una secuencia NAMPT para su uso con los métodos descritos en el presente documento. En determinadas formas de realización, hay un ácido nucleico que es complementario de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, o nucleótidos, nucleósidos o pares de bases más contiguos (o cualquier rango derivable de los mismos), incluidas dichas secuencias de SEQ ID NO: 1.

Las diversas sondas y cebadores diseñados alrededor de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento pueden tener cualquier longitud, tal como se describe anteriormente. Al asignar valores numéricos a una secuencia, por ejemplo, el primer residuo es 1, el segundo residuo es 2, etc., se puede proponer un algoritmo que defina todos los cebadores: n a $n+y$, donde n es un número entero del 1 al último número de la secuencia e y es la longitud del cebador menos uno, donde $n+y$ no excede el último número de la secuencia. Así, para un 10-mer, las sondas corresponden a las bases 1 a 10, 2 a 11, 3 a 12... y así sucesivamente. Para los de 15-mer, las sondas corresponden a las bases 1 a 15, 2 a 16, 3 a 17... y así sucesivamente. Para un 20-mer, las sondas corresponden a las bases 1 a 20, 2 a 21, 3 a 22... y así sucesivamente.

El uso de una sonda o cebador de entre 13 y 100 nucleótidos, preferiblemente entre 17 y 100 nucleótidos de longitud, o en algunos aspectos, hasta 1-2 kilobases o más de longitud, permite la formación de una molécula dúplex que es a la vez estable y selectivo. Dichas sondas o cebadores pueden ser complementarios a las longitudes, como se describió anteriormente, de SEQ ID NO: 1. Generalmente se prefieren las moléculas que tienen secuencias complementarias en tramos contiguos de más de 20 bases de longitud, para aumentar la estabilidad y/o selectividad de las moléculas híbridas obtenidas. Generalmente se preferirá diseñar moléculas de ácido nucleico para hibridación que tengan una o más secuencias complementarias de 20 a 30 nucleótidos, o incluso más cuando se desee. Dichos fragmentos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para la producción recombinante.

Las sondas pueden ser complementarias (también denominadas "complementariedad") de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 o 1000 bases contiguas, o cualquier rango derivable en las

mismas, de secuencias divulgadas en el presente documento. En algunas formas de realización, la secuencia es SEQ ID NO: 1.

Alternativamente, las sondas pueden ser complementarias (también denominadas "complementariedad") a como máximo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 o 1000 bases contiguas, o cualquier rango derivable en el mismo, de secuencias divulgadas en el presente documento. En algunas formas de realización, la secuencia es SEQ ID NO: 1.

Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento se pueden usar por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios de ADN y/o ARN o para proporcionar cebadores para la amplificación de ADN o ARN a partir de muestras. Dependiendo de la aplicación prevista, se desearía emplear diferentes condiciones de hibridación para lograr distintos grados de selectividad de la sonda o cebadores para la secuencia diana.

Para aplicaciones que requieren alta selectividad, normalmente se deseará emplear condiciones relativamente estrictas para formar los híbridos. Por ejemplo, condiciones de sal relativamente baja y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,1 M a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Tales condiciones de alta rigurosidad toleran poco o ningún desajuste entre la sonda o los cebadores y la plantilla o cadena diana y serían particularmente adecuadas para aislar genes específicos (por ejemplo, gen NAMPT) o para detectar transcripciones de ARNm específicos (por ejemplo, ARNm de NAMPT). Generalmente se aprecia que las condiciones pueden hacerse más estrictas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

Para determinadas aplicaciones, por ejemplo, mutagénesis dirigida, se aprecia que se prefieren condiciones de menor rigor. En estas condiciones, la hibridación puede ocurrir incluso aunque las secuencias de las cadenas que se hibridan no sean perfectamente complementarias, sino que no coincidan en una o más posiciones. Las condiciones pueden volverse menos estrictas aumentando la concentración de sal y/o disminuyendo la temperatura. Por ejemplo, una condición de rigurosidad media podría proporcionarse con aproximadamente 0,1 a 0,25 M de NaCl a temperaturas de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 55 °C, mientras que una condición de rigurosidad baja podría proporcionarse con aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M de sal, a temperaturas que oscilan entre unos 20 °C a unos 55 °C. Las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

En otras formas de realización, la hibridación se puede lograr en condiciones de, por ejemplo, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotritol 1,0 mM, a temperaturas entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 37 °C. Otras condiciones de hibridación utilizadas podrían incluir Tris-HCl aproximadamente 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, a temperaturas que oscilan entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 72 °C.

En determinadas formas de realización, será ventajoso emplear ácidos nucleicos de secuencias definidas descritas en el presente documento en combinación con un medio apropiado, tal como un marcador, para determinar la hibridación. En la técnica se conoce una amplia variedad de medios indicadores apropiados, incluidos ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros, tales como avidina/biotina, que son capaces de detectarse. En formas de realización preferidas, se puede desear emplear un marcador fluorescente o un marcador enzimático tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radiactivos u otros reactivos ambientalmente indeseables. En el caso de etiquetas enzimáticas, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que pueden emplearse para proporcionar un medio de detección que sea visible o espectrofotométricamente detectable, para identificar la hibridación específica con muestras que contienen ácido nucleico complementario.

En general, se prevé que las sondas o cebadores descritos en el presente documento serán útiles como reactivos en hibridación en solución, como en PCR, para la detección de la expresión de NAMPT, así como en formas de realización que emplean una fase sólida. En formas de realización que implican una fase sólida, el ADN (o ARN) de prueba se adsorbe o se fija de otro modo a una matriz o superficie seleccionada. Este ácido nucleico monocatenario fijado se somete luego a hibridación con sondas seleccionadas en las condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias particulares (dependiendo, por ejemplo, del contenido de G+C, tipo de ácido nucleico diana, fuente de ácido nucleico, tamaño de la sonda de hibridación, etc.). La optimización de las condiciones de hibridación para la aplicación particular de interés es bien conocida por los expertos en la técnica. Después del lavado de las moléculas hibridadas para eliminar las moléculas sonda unidas no específicamente, la hibridación se detecta y/o se cuantifica determinando la cantidad de marcador unido. Se describen métodos de hibridación en fase sólida representativos en las patentes de EE. UU. N^{os} 5.843.663, 5.900.481 y 5.919.626. Otros métodos de hibridación que pueden usarse en la práctica de la presente divulgación se describen en las patentes de EE. UU. N^{os} 5.849.481, 5.849.486 y 5.851.772.

Los ácidos nucleicos utilizados como plantilla para la amplificación (p. ej., ácidos nucleicos utilizados como plantilla para la amplificación de NAMPT) pueden aislarse de células, tejidos, plasma u otras muestras según metodologías estándar (Sambrook et al., 2001). En determinadas formas de realización, el análisis se realiza en homogeneizados de células o tejidos completos o muestras de fluidos biológicos sin una purificación sustancial del ácido nucleico de plantilla. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN fraccionado o de células completas. Cuando se utiliza ARN, puede ser deseable convertir primero el ARN en un ADN complementario.

III. Cuantificación de polipéptidos

10 A. Obtención de muestras

La presente divulgación se refiere a un método (por ejemplo, método *in vitro*) para medir la cantidad de proteína NAMPT encontrada en una célula, tejido (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido de amígdalas, tejido torácico, etc.) o muestra de plasma de un sujeto, como medio para detectar la presencia, evaluar el riesgo de desarrollar, diagnosticar, pronosticar y/o monitorear la progresión o la eficacia del tratamiento de RILI. Por lo tanto, los primeros pasos para practicar los métodos de esta divulgación (p. ej., métodos *in vitro* para usar NAMPT como biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de RILI) son obtener una muestra de célula, tejido o plasma de un sujeto de prueba y extraer proteína de la muestra.

20 A. Adquisición y preparación de muestras

Se obtiene una muestra biológica (p. ej., célula, tejido (p. ej., tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o plasma) de una persona a la que se le realizará la prueba o el seguimiento de RILI utilizando un método del presente divulgación. Se deben tomar muestras biológicas del mismo tipo tanto de un sujeto de prueba (p. ej., un sujeto con sospecha de tener RILI y/o un sujeto en riesgo de desarrollar RILI) como de un sujeto de control (p. ej., un sujeto que no padece RILI y/o cualquier trastorno pulmonar). La recogida de una muestra biológica de un sujeto, tal como un sujeto de prueba, se realiza de acuerdo con el protocolo estándar que generalmente siguen los hospitales o clínicas. Se recoge una cantidad apropiada de muestra biológica (p. ej., células, tejido (p. ej., tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) o plasma) y se puede almacenar según procedimientos estándar antes de una preparación adicional.

El análisis de la proteína NAMPT encontrada en una muestra biológica de un sujeto (por ejemplo, un sujeto de prueba) según el método descrito en el presente documento se puede realizar usando, por ejemplo, células, tejidos o plasma. Los métodos para preparar muestras biológicas para la extracción de proteínas son bien conocidos entre los expertos en la técnica. Por ejemplo, primero se debe tratar el tejido de un sujeto (por ejemplo, un sujeto de prueba) para alterar la membrana celular y liberar la proteína contenida dentro de las células.

Con el fin de detectar la presencia de RILI o evaluar el riesgo de desarrollar RILI en un sujeto de prueba, se puede recolectar una muestra biológica del sujeto y se puede medir el nivel de proteína NAMPT humana y luego compararlo con el nivel normal de proteína NAMPT (por ejemplo, en comparación con el nivel de proteína NAMPT en el mismo tipo de muestra biológica en el sujeto antes del inicio de RILI y/o en comparación con el nivel de proteína NAMPT en el mismo tipo de muestra biológica de un sujeto de control). Si se observa un aumento en el nivel de proteína NAMPT humana en comparación con el nivel normal de NAMPT, se considera que el sujeto de prueba tiene RILI o tiene un riesgo elevado de desarrollar RILI. Con el fin de monitorear la progresión de la enfermedad o evaluar la efectividad terapéutica en pacientes con RILI, se pueden tomar muestras biológicas de un paciente individual en diferentes momentos, de modo que se pueda medir el nivel de proteína NAMPT humana para proporcionar información que indique el estado de la enfermedad. Por ejemplo, cuando el nivel de proteína NAMPT de un paciente muestra una tendencia general de disminución con el tiempo, se considera que el paciente está mejorando en la gravedad de RILI o que la terapia que ha estado recibiendo se considera efectiva. Por otro lado, la falta de cambio en el nivel de proteína NAMPT de un paciente o una tendencia continua de aumento indicaría un empeoramiento de la condición y la ineficacia de la terapia administrada al paciente. Generalmente, un nivel más alto de proteína NAMPT observado en un paciente indica una forma más grave de RILI que padece el paciente y un peor pronóstico de la enfermedad.

B. Preparación de muestras para la detección de proteínas NAMPT

La muestra de tejido o plasma de un sujeto es adecuada para la presente invención y puede obtenerse mediante métodos bien conocidos y como se describe en la sección anterior. En determinadas aplicaciones de esta invención, el tejido pulmonar puede ser el tipo de muestra preferido.

C. Determinación del nivel de proteína NAMPT humana

Una proteína de cualquier identidad particular, tal como la proteína NAMPT, puede detectarse usando una variedad de ensayos inmunológicos. En algunas formas de realización, se puede realizar un ensayo sándwich capturando el polipéptido de una muestra de prueba con un anticuerpo que tenga afinidad de unión específica por el polipéptido. A continuación, el polipéptido puede detectarse con un anticuerpo marcado que tenga afinidad de unión específica por él. Un método común de detección es el uso de autorradiografía mediante el uso de un agente de detección radiomarcado (por ejemplo, un anticuerpo anti-NAMPT radiomarcado) que está marcado con radioisótopos (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S ,

¹⁴C o ³²P, ^{99m}Tc o similares). La elección del isótopo radiactivo depende de las preferencias de investigación debido a la facilidad de síntesis, la estabilidad y las vidas medias de los isótopos seleccionados. Otras etiquetas que pueden usarse para marcar agentes de detección (p. ej., para marcar anticuerpos anti NAMPT) incluyen compuestos (p. ej., biotina y digoxigenina), que se unen a anticuerpos anti-ligandos o marcados con fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, fluoróforos y enzimas (p. ej., PRH). Dichos ensayos inmunológicos se pueden llevar a cabo utilizando dispositivos de microfluidos, como chips de proteínas de micromatrices. Una proteína de interés (p. ej., proteína NAMPT humana) también puede detectarse mediante electroforesis en gel (tal como electroforesis en gel bidimensional) y análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos. En algunas formas de realización, se pueden usar técnicas ELISA estándar para detectar una proteína dada (por ejemplo, proteína NAMPT humana), usando los anticuerpos apropiados. En otras formas de realización, se pueden usar técnicas de análisis de transferencia Western estándar para detectar una proteína dada (por ejemplo, proteína NAMPT humana), usando los anticuerpos apropiados. Alternativamente, se pueden utilizar técnicas inmunohistoquímicas (IHC) estándar para detectar una proteína determinada (p. ej., proteína NAMPT humana), utilizando los anticuerpos apropiados. Para la detección específica del polipéptido se pueden utilizar tanto anticuerpos monoclonales como polidionales (incluido un fragmento de anticuerpo con especificidad de unión deseada). Dichos anticuerpos y sus fragmentos de unión con afinidad de unión específica a una proteína particular (por ejemplo, proteína NAMPT humana) pueden generarse mediante técnicas conocidas.

En algunas formas de realización, la proteína NAMPT (por ejemplo, la proteína NAMPT en una muestra biológica) se puede detectar (por ejemplo, se puede detectar en un ensayo de detección) con un anticuerpo que se une a NAMPT, tal como un anticuerpo anti-NAMPT o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-NAMPT como agente de detección, tal como un anticuerpo de detección que se une a NAMPT y detecta NAMPT (por ejemplo, de una muestra biológica), tal como detecta NAMPT en un ensayo de detección (por ejemplo, en occidental análisis de transferencia, análisis inmunohistoquímico, análisis de autorradiografía y/o ELISA). En determinadas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-NAMPT como agente de captura que se une a NAMPT y detecta NAMPT (por ejemplo, a partir de una muestra biológica), tal como detecta NAMPT en un ensayo de detección (por ejemplo, en análisis de transferencia Western, análisis de inmunohistoquímica, análisis de autorradiografía y/o ELISA). En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une a NAMPT, tal como un anticuerpo anti-NAMPT, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se marca para facilitar la detección. En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une a NAMPT, tal como un anticuerpo anti NAMPT, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, está radiomarcado (por ejemplo, marcado con un radioisótopo, tal como marcado con ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P, ^{99m}Tc, o similares), marcado enzimáticamente (por ejemplo, marcado con una enzima, tal como con peroxidasa de rábano picante (HRP)), marcado fluorescente (por ejemplo, marcado con un fluoróforo), marcado con un agente quimioluminiscente y/o marcado con un compuesto (por ejemplo, con biotina y digoxigenina).

También se pueden emplear otros métodos para medir el nivel de proteína NAMPT en la práctica de la presente invención. Por ejemplo, se han desarrollado diversos métodos basados en la tecnología de espectrometría de masas para cuantificar de forma rápida y precisa las proteínas diana incluso en una gran cantidad de muestras. Estos métodos implican equipos altamente sofisticados como el instrumento de triple cuadrupolo (triple Q) que utiliza la técnica de monitoreo de reacciones múltiples (MRM), un espectrómetro de masas en tándem de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistido por matriz (MALDI TOF/TOF), una trampa de iones instrumento que utiliza el modo SIM de monitoreo selectivo de iones y el espectrómetro de masas QTOP basado en ionización por electropulverización (ESI). Véase, por ejemplo, Pan et al., J Proteome Res, febrero de 2009; 8(2):787-797.

En aspectos específicos, la expresión de NAMPT se evalúa evaluando la proteína NAMPT. En algunas formas de realización, se puede usar un anticuerpo anti-NAMPT para evaluar la proteína NAMPT. Dichos métodos pueden implicar el uso de IHC, análisis de transferencia Western, ELISA, inmunoprecipitación, autorradiografía o una matriz de anticuerpos. En formas de realización particulares, la proteína NAMPT se evalúa usando IHC. El uso de IHC puede permitir la cuantificación y caracterización de la proteína NAMPT. La IHC también puede permitir una puntuación inmunorreactiva para la muestra en la que se va a determinar la expresión de la proteína NAMPT. El término "puntuación inmunorreactiva" (IRS) se refiere a un número que se calcula basándose en una escala que refleja el porcentaje de células positivas (en una escala del 1 al 4, donde 0=0 %, 1=<10 %, 2=10 %-50 %, 3=50 %-80 % y 4=>80 %) multiplicado por la intensidad de la tinción (en una escala de 1-3, donde 1=débil, 2=moderada y 3=fuerte). El IRS puede oscilar entre 0 y 12.

IV. Establecimiento de un control estándar

Para establecer un control estándar para practicar el método de esta invención, primero se selecciona un grupo de personas sanas libres de cualquier enfermedad pulmonar (especialmente cualquier forma de lesión pulmonar, tal como RILI) como se define convencionalmente. Estos individuos están dentro de los parámetros apropiados, si corresponde, con el fin de detectar y/o monitorear RILI utilizando los métodos de la presente invención. Opcionalmente, las personas son del mismo sexo, edad similar u origen étnico similar.

El estado de salud de los individuos seleccionados (por ejemplo, sujetos de control) se confirma mediante métodos bien establecidos y empleados de forma rutinaria que incluyen, entre otros, un examen físico general de los individuos y una revisión general de su historial médico.

Además, el grupo seleccionado de individuos sanos debe tener un tamaño razonable, de modo que la concentración promedio de ADN genómico de NAMPT humano, ARNm de NAMPT o proteína NAMPT en la muestra de tejido obtenida del grupo pueda considerarse razonablemente representativa del nivel normal de NAMPT o nivel medio de NAMPT entre la población general de personas sanas. Preferiblemente, el grupo seleccionado comprende al menos 10 sujetos humanos.

Una vez que se establece un valor promedio para el ADN genómico, ARNm o proteína NAMPT con base en los valores individuales encontrados en cada sujeto del grupo sano o de control seleccionado, este valor o perfil promedio o mediana o representativo se considera un control estándar o se considera el nivel normal de expresión de NAMPT. También se determina una desviación estándar durante el mismo proceso. En algunos casos, se pueden establecer controles estándar separados para grupos definidos por separado que tengan características distintas, como edad, género u origen étnico.

En formas de realización adicionales, la expresión de NAMPT se evalúa analizando el nivel de actividad de NAMPT.

Uso de NAMPT como objetivo terapéutico en RILI

Se describen en el presente documento métodos y composiciones para el uso de NAMPT como objetivo terapéutico en RILI. En algunas formas de realización, la presente divulgación describe el uso de un inhibidor de NAMPT para tratar RILI. En algunas formas de realización, se usan uno o más inhibidores de NAMPT para tratar RILI en un sujeto expuesto a radiación, tal como irradiación de todo el tórax (WTI), irradiación de cuerpo total (TBI) o irradiación de cuerpo parcial (PBI). En algunas formas de realización, se usan uno o más inhibidores de NAMPT para tratar RILI en un sujeto que se somete a radioterapia (por ejemplo, radioterapia torácica), tal como en un paciente con cáncer que se somete a radioterapia (por ejemplo, radioterapia torácica). En algunas formas de realización, se usan uno o más inhibidores de NAMPT para tratar RILI en un sujeto que se sometió a radioterapia (por ejemplo, radioterapia torácica), tal como en un paciente con cáncer que se sometió a radioterapia (por ejemplo, radioterapia torácica). En algunas formas de realización, se usan uno o más inhibidores de NAMPT para tratar RILI en un sujeto expuesto a radiación (por ejemplo, WTI, TBI o PBI), por ejemplo, de un incidente nuclear. En algunas formas de realización, se usan uno o más inhibidores de NAMPT para tratar RILI en un sujeto al que se le diagnostica RILI usando los métodos de diagnóstico descritos anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, mediante los métodos descritos anteriormente en el presente documento, se puede evaluar la expresión de NAMPT en un sujeto que está expuesto a radiación y/o en un sujeto que tiene riesgo de desarrollar RILI, y una vez que al sujeto se le diagnostica RILI, se puede tratar al sujeto con uno o más inhibidores de NAMPT. Los inhibidores de NAMPT, como se describen en el presente documento, pueden incluir, sin limitaciones, ARNip de NAMPT, ribozimas de NAMPT, anticuerpos de NAMPT y otras proteínas de unión a NAMPT o proteínas que inhiben la expresión de transcripciones de NAMPT. En particular, se puede usar un anticuerpo anti-NAMPT (por ejemplo, como inhibidor de NAMPT) para tratar RILI en un sujeto (por ejemplo, un sujeto (por ejemplo, paciente con cáncer) que se somete a radioterapia torácica, o un sujeto expuesto a RI, por ejemplo, de un incidente nuclear).

En algunas formas de realización, un inhibidor de NAMPT (p. ej., un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto, puede disminuir la expresión de NAMPT en uno o más tejidos (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) y/o plasma del sujeto. En algunas formas de realización, un inhibidor de NAMPT (p. ej., un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto, puede disminuir la inflamación (p. ej., puede disminuir la expresión de una o más citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF, IFN-gamma, etc.) en uno o más tejidos (p. ej., tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) del sujeto. En algunas formas de realización, un inhibidor de NAMPT (por ejemplo, un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto, puede disminuir la activación de NFkB (por ejemplo, puede disminuir la fosforilación de NFkB) en uno o más tejidos (por ejemplo, tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido torácico, etc.) del sujeto. En algunas formas de realización, un inhibidor de NAMPT (p. ej., un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto, puede disminuir la lesión pulmonar en el sujeto. En algunas formas de realización, un inhibidor de NAMPT (p. ej., un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto, puede disminuir la fibrosis pulmonar (tal como la fibrosis pulmonar inducida por radiación (RILF)) en el tema. En algunas formas de realización, un inhibidor de NAMPT (p. ej., un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto, puede disminuir la deposición de colágeno en el tejido pulmonar del sujeto. En algunas formas de realización, un inhibidor de NAMPT (p. ej., un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto, puede disminuir la expresión de actina del músculo liso del tejido pulmonar (SMA) en el sujeto. En algunas formas de realización, un inhibidor de NAMPT (p. ej., un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto, puede disminuir la transición de miofibroblastos y/o la fibrosis del tejido pulmonar en el sujeto.

En algunas formas de realización, se puede administrar al sujeto por vía parenteral u oral un inhibidor de NAMPT (p. ej., un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto. En particular, se puede administrar al sujeto por vía intravenosa un inhibidor de NAMPT (por ejemplo, un anticuerpo anti-NAMPT, tal como un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT humanizado), que puede usarse para tratar RILI en un sujeto.

Ácidos nucleicos

En este documento, se describen polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico relacionadas con secuencias NAMPT para uso en aplicaciones diagnósticas, terapéuticas y preventivas en RILI. En determinadas formas de realización, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico que se puede usar para diagnosticar RILI basándose en la detección de la sobreexpresión de una secuencia NAMPT en condiciones de hibridación estrictas o muy estrictas. En otras formas de realización, la presente divulgación se refiere específicamente a un ácido nucleico que sirve como inhibidor de NAMPT para la prevención o el tratamiento de RILI. Los ácidos nucleicos o polinucleótidos divulgados en el presente documento pueden ser ADN o ARN, y pueden ser oligonucleótidos (100 residuos o menos) en determinadas formas de realización. Además, pueden producirse de forma recombinante o sintéticamente. Estos polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico pueden aislarse y purificarse a partir de células o pueden producirse sintéticamente. En algunas formas de realización, un ácido nucleico que codifica NAMPT es el objetivo de un inhibidor de NAMPT de ácido nucleico, tal como una ribozima o ARNip que reduce el nivel de expresión de NAMPT.

La molécula de ácido nucleico que se hibrida con NAMPT puede comprender una secuencia de ácido nucleico contigua que es complementaria de las siguientes longitudes o al menos de las siguientes longitudes: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, 9900, 10000, 10100, 10200, 10300, 10400, 10500, 10600, 10700, 10800, 10900, 11000, 11100, 11200, 11300, 11400, 11500, 11600, 11700, 11800, 11900, 12000 o más (o cualquier rango derivable en los mismos) nucleótidos, nucleósidos o pares de bases del NAMPT Secuencia T. Dichas secuencias pueden ser idénticas o complementarias a la SEQID NO: 1.

Por consiguiente, las secuencias que tienen o tienen al menos o como máximo aproximadamente 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, y cualquier rango derivable en el mismo, de ácidos nucleicos que son complementarios a una secuencia de ácido nucleico de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900 o 5000 bases contiguas (o cualquier rango derivable allí) de SEQ ID NO: 1 se contemplan como parte de la presente divulgación. Pueden usarse como inhibidores de NAMPT o como sondas de detección o cebadores para usar en los métodos descritos en el presente documento.

Secuencias antisentido, incluidos ARNip

En algunas formas de realización, un ácido nucleico descrito en el presente documento puede encadenar una construcción antisentido. La metodología antisentido aprovecha el hecho de que los ácidos nucleicos tienden a emparejarse con secuencias complementarias. Por complementario se entiende que los polinucleótidos son aquellos que son capaces de aparearse bases según las reglas de complementariedad estándar de Watson-Crick. La inclusión de bases menos comunes como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras en secuencias de hibridación no interfiere con el emparejamiento.

Los polinucleótidos antisentido, cuando se introducen en una célula diana, se unen específicamente a su polinucleótido diana e interfieren con la transcripción, el procesamiento del ARN, el transporte, la traducción y/o la estabilidad. Se pueden emplear construcciones de ARN antisentido, o ADN que codifica dichos ARN antisentido, para inhibir la transcripción o traducción de genes o ambas dentro de una célula huésped, ya sea *in vitro* o *in vivo*, tal como, dentro de un animal huésped, incluido un sujeto humano.

Se pueden diseñar construcciones antisentido para unirse al promotor y otras regiones de control, exones, intrones o incluso límites exón-intrón de un gen. Se contempla que las construcciones antisentido más eficaces incluirán regiones complementarias a las uniones de empalme intrón-exón. Por tanto, se propone que una forma de realización preferida incluya una construcción antisentido con complementariedad con regiones dentro de 50-200 bases de una unión de empalme intrón-exón. Se ha observado que algunas secuencias de exones pueden incluirse en la construcción sin afectar seriamente la selectividad objetivo de la misma. La cantidad de material exónico incluido variará dependiendo de las secuencias de exones e intrones particulares utilizadas. Se puede comprobar fácilmente si se incluye demasiado ADN de exón simplemente probando las construcciones *in vitro* para determinar si la función celular normal está afectada o si está afectada la expresión de genes relacionados que tienen secuencias complementarias.

Las secuencias de polinucleótidos complementarias o antisentido son sustancialmente complementarias en toda su longitud y tienen muy pocos desajustes de bases. Por ejemplo, secuencias de quince bases de longitud pueden denominarse complementarias cuando tienen nucleótidos complementarios en trece o catorce posiciones. Naturalmente, las secuencias que son completamente complementarias serán secuencias que son completamente complementarias en toda su longitud y no tienen desapareamientos de bases. También se contemplan otras secuencias con grados inferiores de homología. Por ejemplo, podría diseñarse una construcción antisentido que tenga regiones limitadas de alta homología, pero que también contenga una región no homóloga (por ejemplo, ribozima; véase más adelante). Estas moléculas, aunque tienen menos del 50 % de homología, se unirían a secuencias diana en condiciones apropiadas. Puede resultar ventajoso combinar porciones de ADN genómico con ADNc o secuencias sintéticas para generar construcciones específicas. Por ejemplo, cuando se desea un intrón en la construcción definitiva, será necesario utilizar un clon genómico. El ADNc o un polinucleótido sintetizado puede proporcionar sitios de restricción más convenientes para la parte restante de la construcción y, por lo tanto, se usaría para el resto de la secuencia.

En determinadas formas de realización, el ácido nucleico encadena un ARN o ARNip de interferencia. La interferencia de ARN (también conocida como interferencia mediada por ARN o ARNi) es un mecanismo mediante el cual se puede reducir o eliminar la expresión genética. Se ha observado que el ARN bicatenario (ARNbc) media la reducción, que es un proceso de varios pasos. El ARNbc activa mecanismos de vigilancia de la expresión génica postranscripcional que parecen funcionar para defender a las células de la infección por virus y la actividad de los transposones (Fire et al., 1998; Grishok et al., 2000; Ketting et al., 1999; Lin y Avery, 1999; Montgomery et al. al., 1998; Sharp y Zamore, 2000; Tabara et al., 1999). La activación de estos mecanismos apunta al ARNm maduro complementario del ARNbc para su destrucción. Las ventajas del ARNi incluyen una especificidad muy alta, facilidad de movimiento a través de las membranas celulares y una regulación negativa prolongada del gen objetivo. Además, se ha demostrado que el ARNbc silencia genes en una amplia gama de sistemas, incluidos plantas, protozoos, hongos, *C. elegans*, *Trypanosoma*, *Drosophila* y mamíferos. Generalmente se acepta que el ARNi actúa postranscripcionalmente, dirigiéndose a las transcripciones de ARN para su degradación. Parece que se puede atacar tanto el ARN nuclear como el citoplasmático (Bosher y Labouesse, 2000).

Los ARNip están diseñados para que sean específicos y eficaces a la hora de suprimir la expresión de los genes de interés. Los métodos para seleccionar las secuencias diana, es decir, aquellas secuencias presentes en el gen o genes de interés para los cuales los ARNip guiarán la maquinaria degradativa, están dirigidos a evitar secuencias que puedan interferir con la función guía del ARNip, al tiempo que incluyen secuencias que son específicas del gen o genes. Normalmente, las secuencias diana de ARNip de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud son las más eficaces. Esta longitud refleja las longitudes de los productos de digestión resultantes del procesamiento de ARN mucho más largos como se describió anteriormente (Montgomery et al., 1998). La elaboración de ARNip se ha realizado principalmente mediante síntesis química directa; o mediante un sistema *in vitro* derivado de células S2. La síntesis química se produce mediante la producción de dos oligómeros de ARN monocatenario seguido de la hibridación de los dos oligómeros monocatenarios en un ARN bicatenario. Los métodos de síntesis química son diversos. Se proporcionan ejemplos no limitantes en las patentes de EE. UU. N^{os} 5.889.136, 4.415.723 y 4.458.066, y en Wincott et al. (1995).

Se han sugerido varias modificaciones adicionales a las secuencias de ARNip para alterar su estabilidad o mejorar su eficacia. Se sugiere que los ARN sintéticos complementarios de 21-mer que tienen protuberancias de dinucleótidos (es decir, 19 nucleótidos complementarios + dímeros 3' no complementarios) pueden proporcionar el mayor nivel de supresión. Estos protocolos utilizan principalmente una secuencia de dos nucleótidos de timidina (2'-desoxi) como salientes del dinucleótido. Estos dinucleótidos salientes a menudo se escriben como dTaT para distinguirlos de los nucleótidos típicos incorporados al ARN. La literatura ha indicado que el uso de excedentes de dT está motivado principalmente por la necesidad de reducir el costo de los ARN sintetizados químicamente. También se sugiere que los salientes de dTaT podrían ser más estables que los salientes de UU, aunque los datos disponibles muestran solo una ligera mejora (<20 %) del saliente de dTdT en comparación con un ARNip con un saliente de UU.

En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un ARNip que es capaz de desencadenar interferencia de ARN, un proceso mediante el cual se destruye una secuencia de ARN particular. Los ARNip son moléculas

de ARNbc que tienen 100 bases o menos de longitud (o tienen 100 pares de bases o menos en su región de complementariedad). En algunos casos, tiene un saliente 3' de 2 nucleótidos y un fosfato 5'. La secuencia de ARN particular es el objetivo como resultado de la complementariedad entre el ARNbc y la secuencia de ARN particular. Se entenderá que el ARNbc o ARNip de la presente divulgación puede afectar al menos aproximadamente el 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más reducción de la expresión de un ARN diana en una célula. El ARNbc descrito en el presente documento (se entenderá que el término "ARNbc" incluye "ARNip") es distinto y distinguible de las moléculas antisentido y de ribozima en virtud de la capacidad de activar ARNi. Estructuralmente, las moléculas de ARNbc para ARNi se diferencian de las moléculas antisentido y de ribozima en que el ARNbc tiene al menos una región de complementariedad dentro de la molécula de ARN. La región complementaria (también denominada "complementariedad") comprende al menos o como máximo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 bases contiguas, o cualquier rango derivable en el mismo, a secuencias (o sus complementos) divulgadas en el presente documento. En algunas formas de realización, la secuencia es SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, se emplean ARNbc largos en los que "largo" se refiere a ARNbc que tiene 1000 bases o más (o 1000 pares de bases o más en la región de complementariedad). El término "ARNbc" incluye "ARNbc largo" y "ARNbc intermedio" a menos que se indique lo contrario. En algunas formas de realización, el ARNbc puede excluir el uso de ARNip, ARNbc largo y/o ARNbc "intermedio" (longitudes de 100 a 1000 bases o pares de bases en la región de complementariedad). Se contempla específicamente que un ARNbc puede ser una molécula con dos hebras de ARN separadas en las que una hebra tiene al menos una región complementaria a una región de la otra hebra. Alternativamente, un ARNbc incluye una molécula que es monocatenaria, pero que tiene al menos una región de complementariedad como se describió anteriormente (ver Sui et al., 2002 y Brummelkamp et al., 2002), en la que se encuentra una sola hebra con un bucle en forma de horquilla utilizado como ARNbc para RNAi. Por conveniencia, se puede hacer referencia a las longitudes de ARNbc en términos de bases, que simplemente se refiere a la longitud de una sola hebra o en términos de pares de bases, que se refieren a la longitud de la región de complementariedad. Se contempla específicamente que las formas de realización analizadas en el presente documento con respecto a un ARNbc compuesto de dos cadenas se contemplan para su uso con respecto a un ARNbc que comprende una sola cadena, y viceversa. En una molécula de ARNbc de dos cadenas, la cadena que tiene una secuencia complementaria al ARNm objetivo se denomina cadena antisentido y la cadena con una secuencia idéntica al ARNm objetivo se denomina cadena sentido. De manera similar, con un ARNbc que comprende sólo una hebra única, se contempla que la región antisentido tenga la secuencia complementaria al ARNm diana, mientras que la región sentido tenga la secuencia idéntica al ARNm diana. Además, se entenderá que las regiones sentido y antisentido, al igual que las cadenas sentido y antisentido, son complementarias (es decir, pueden hibridarse específicamente) entre sí.

La hebra única de ARN o dos hebras dobles complementarias de una molécula de ARNbc pueden tener al menos o como máximo las siguientes longitudes: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, 9900, 10000 o más (incluida la longitud completa del ARNm de un gen particular sin el poli-A cola) bases o pares de bases. Si el ARNbc está compuesto por dos hebras separadas, las dos hebras pueden tener la misma longitud o diferentes longitudes. Si el ARNbc es de una sola hebra, además de la región de complementariedad, la hebra puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más bases en uno o ambos extremos (5' y/o 3') o formando un bucle en forma de horquilla entre las regiones de complementariedad.

En algunas formas de realización, la cadena o cadenas de ARNbc tienen 100 bases (o pares de bases) o menos, en cuyo caso también pueden denominarse ARNip. En formas de realización específicas, la cadena o cadenas del ARNbc tienen menos de 70 bases de longitud. Con respecto a esas formas de realización, la cadena o cadenas de ARNbc pueden tener una longitud de 5-70, 10-65, 20-60, 30-55, 40-50 bases o pares de bases. Un ARNbc que tiene una región de complementariedad igual o menor a 30 pares de bases (tal como un ARN en horquilla monocatenario en el que el tallo o porción complementaria es menor o igual a 30 pares de bases) o uno en el que las hebras tienen 30 bases o menos en Se contempla específicamente la longitud, ya que tales moléculas evaden la respuesta antiviral de una célula de mamífero. Por lo tanto, un ARNbc en horquilla (una hebra) puede tener 70 bases o menos de longitud con una región complementaria de 30 pares de bases o menos. En algunos casos, un ARNbc puede procesarse en la célula para convertirlo en ARNip.

Se ha descubierto que los ARNip sintetizados químicamente funcionan de manera óptima cuando se encuentran en cultivos celulares en concentraciones de 25 a 100 nM, pero concentraciones de aproximadamente 100 nM han logrado una supresión eficaz de la expresión en células de mamíferos. Los ARNip han sido más eficaces en cultivos de células de mamíferos a aproximadamente 100 nM. Sin embargo, en varios casos se han utilizado concentraciones más bajas de ARNip sintetizado químicamente (Caplen et al., 2000; Elbashir et al., 2001). Las publicaciones PCT WO 99/32619 y WO 01/68836 sugieren que el ARN para uso en ARNip puede sintetizarse química o enzimáticamente.

Las construcciones contempladas proporcionan plantillas que producen ARN que contienen secuencias de nucleótidos idénticas a una parte del gen diana. Normalmente, la longitud de secuencias idénticas proporcionadas es de al menos 25 bases y puede tener hasta 400 o más bases de longitud. Los ARNbc más largos se pueden digerir en longitudes de 21 a 25 unidades con un complejo de nucleasa endógeno que convierte los ARNbc largos en ARNip *in vivo*. No se hace distinción entre las propiedades esperadas del ARNbc sintetizado químicamente o enzimáticamente en su uso en la interferencia de ARN.

De manera similar, el documento WO 00/44914 sugiere que las hebras individuales de ARN pueden producirse enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial/total. La patente de EE. UU. 5.795.715 informa sobre la transcripción simultánea de dos cadenas de secuencias de ADN complementarias en una única mezcla de reacción, en la que las dos transcripciones se hibridan inmediatamente.

Vectores

También se describen en el presente documento vectores que están diseñados, principalmente, para transformar células con un inhibidor de NAMPT terapéutico o preventivo, codificando así una secuencia de ácido nucleico inhibidor de NAMPT bajo el control de un promotor eucariota (es decir, constitutivo, indudable, reprimible, específico de tejido). Además, los vectores pueden contener un marcador seleccionable, si, por ningún otro motivo, facilitan su manipulación *in vitro*. Sin embargo, los marcadores seleccionables pueden desempeñar un papel importante en la producción de células recombinantes.

Los promotores y potenciadores que controlan la transcripción de genes que codifican proteínas en células eucariotas están compuestos de múltiples elementos genéticos. La maquinaria celular es capaz de recopilar e integrar la información reguladora transmitida por cada elemento, lo que permite que diferentes genes desarrollen patrones de regulación transcripcional distintos, a menudo complejos.

En algunas formas de realización, el promotor para uso en los métodos descritos en el presente documento es el promotor temprano inmediato (TI) de citomegalovirus (CMV). Este promotor está disponible comercialmente en INVITROGEN en el vector pcDNAIII, que puede usarse en los métodos descritos en el presente documento. En los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar otros promotores virales, promotores/potenciadores celulares y promotores/potenciadores inducibles. Además, también podría usarse cualquier combinación de promotor/potenciador (según la base de datos EPDB de Eukaryotic Promoter) para impulsar la expresión de un ácido nucleico de interés.

Otra señal que puede resultar útil es una señal de poliadenilación. Dichas señales pueden obtenerse del gen de la hormona del crecimiento humano (hGH), del gen de la hormona del crecimiento bovino (BGH) o del SV40.

Los elementos de los sitios de unión a ribosomas internos (IRES) se pueden utilizar para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES pueden eludir el modelo de escaneo de ribosomas de traducción dependiente de la tapa 5-metilada y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia de los picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES pueden vincularse a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos de lectura abiertos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas para una traducción eficiente. Se pueden expresar de forma eficaz múltiples genes utilizando un único promotor/potenciador para transcribir un único mensaje.

En cualquier caso, se entenderá que los promotores son elementos del ADN que, situados funcionalmente aguas arriba de un gen, conducen a la expresión de dicho gen. La mayoría de las construcciones transgénicas descritas en el presente documento están situadas funcionalmente aguas abajo de un elemento promotor.

También se proporcionan métodos para administrar las composiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, una composición que contiene uno o más inhibidores de NAMPT) a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto con RILI). Cualquier molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede estar comprendida en un vector. Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar, que se describen en Sambrook et al., 2001 y Ausubel et al.

Además de codificar un polipéptido modificado, tal como gelonina modificada, un vector puede codificar secuencias polipeptídicas no modificadas, tales como una etiqueta o una molécula de direccionamiento. Los vectores útiles que codifican tales proteínas de fusión incluyen vectores pIN (Inouye et al., 1985), vectores que codifican una serie de histidinas y vectores pGEX, para su uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión S-transferasa (GST) para su posterior purificación y separación o escisión. Una molécula diana es aquella que dirige el polipéptido modificado a un órgano, tejido, célula u otra ubicación particular en el cuerpo de un sujeto.

Un vector es una molécula portadora de ácido nucleico en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula donde se puede replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser exógena, lo que significa que es extraña a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula pero está en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que la secuencia normalmente no se encuentra. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (p. ej., YAC). Un vector de expresión es un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen luego en una proteína, polipéptido o péptido. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de secuencias de control, que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que cumplen también otras funciones y se describen más adelante.

Un método para la administración del ADN recombinante implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Los vectores de expresión de adenovirus incluyen aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento de la construcción y (b) para expresar en última instancia una construcción genética recombinante que se ha clonado en el mismo. El vector de adenovirus puede tener una replicación defectuosa, o al menos condicionalmente defectuosa, no se cree que la naturaleza del vector de adenovirus sea crucial para la práctica exitosa de la presente divulgación. El adenovirus puede ser de cualquiera de los 42 serotipos o subgrupos A-F diferentes conocidos. El adenovirus tipo 5 del subgrupo C es el material de partida para obtener el vector de adenovirus con replicación defectuosa condicional para su uso en los métodos actualmente divulgados. Como se indicó anteriormente, el vector típico según la presente divulgación tiene una replicación defectuosa y no tendrá una región E1 de adenovirus. Por tanto, será más conveniente introducir la construcción transformadora en la posición de la que se han eliminado las secuencias codificantes de E1. Sin embargo, la posición de inserción de la construcción dentro de las secuencias de adenovirus no es crítica para la práctica exitosa de la presente divulgación. El polinucleótido que codifica el gen de interés también puede insertarse en lugar de la región E3 eliminada en vectores de reemplazo E3 como describen Karlsson et al. (1986) o en la región E4 donde una línea celular auxiliar o un virus auxiliar complementa el defecto E4.

Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenario caracterizados por la capacidad de convertir su ARN en ADN bicatenario en células infectadas mediante un proceso de transcripción inversa (Coffin, 1990). Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico que codifica un gen de interés en el genoma viral en lugar de ciertas secuencias virales para producir un virus que tiene una replicación defectuosa. Para producir viriones, se construye una línea celular empaquetadora que contiene los genes gag, pol y env pero sin LTR ni componentes de empaquetado (Mann et al., 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la LTR retroviral y las secuencias de empaquetamiento se introduce en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato cálcico, por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite que la transcripción de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas virales que luego se secretan en los medios de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). A continuación, se recogen los medios que contienen los retrovirus recombinantes, opcionalmente se concentran y se utilizan para la transferencia de genes. Los vectores retrovirales pueden infectar una gran variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células huésped (Paskind et al., 1975).

Otros vectores virales incluyen virus adenoasociados (AAV) (descritos en las patentes de EE. UU. 5.139.941 y 4.797.368), virus vaccinia, otros poxvirus, lentivirus, virus de Epstein Barr y picornavirus.

Administración de protamina de ácidos nucleicos

La protamina también puede usarse para formar un complejo con una construcción de expresión. A continuación, dichos complejos se pueden formular con las composiciones lipídicas descritas anteriormente para su administración a una

célula. Las protaminas son pequeñas nucleoproteínas muy básicas asociadas con el ADN. Su uso en la administración de ácidos nucleicos se describe en la patente de EE. UU. Nº 5.187.260.

Formulaciones lipídicas para la administración de ácidos nucleicos

En una forma de realización adicional, un ácido nucleico puede quedar atrapado en un liposoma o una formulación lipídica. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y sal disueltas entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contempla una construcción genética complejada con LIPOFECTAMINA (GIBCO BRL).

Los avances en las formulaciones de lípidos han mejorado la eficacia de la transferencia de genes *in vivo* (Smyth Templeton et al., 1997; WO 98/07408). Una nueva formulación lipídica compuesta por una proporción equimolarra de 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP) y colesterol mejora significativamente la transferencia genética sistémica *in vivo*, aproximadamente 150 veces. Se dice que la formulación DOTAP:colesterol-lípido forma una estructura única denominada "liposoma sándwich". Se informa que esta formulación "intercala" ADN entre una estructura de vaso o bicapa invaginada. Las características beneficiosas de estas estructuras lipídicas incluyen una estabilización coloidal positiva por el colesterol, empaquetamiento bidimensional del ADN y una mayor estabilidad sérica.

En formas de realización adicionales, el liposoma se define además como una nanopartícula. Una nanopartida se refiere a una partícula submicrónica. La partícula submicrónica puede ser de cualquier tamaño. Por ejemplo, la nanopartícula puede tener un diámetro de aproximadamente 0,1, 1, 10, 100, 300, 500, 700, 1000 nanómetros o mayor. Las nanopartículas que se administran a un sujeto pueden tener más de un tamaño. Se puede utilizar cualquier método conocido por los expertos en la técnica para producir nanopartículas. En algunas formas de realización, las nanopartículas se extruyen durante el proceso de producción. La información relativa a la producción de nanopartículas se puede encontrar en la solicitud de patente de EE. UU. Pub. Nº 20050143336, solicitud de patente de EE. UU. Pub. Nº 20030223938, solicitud de patente de EE. UU. Pub. Nº 2003.0147966.

En ciertas formas de realización, se administra un agente antiinflamatorio con el lípido para prevenir o reducir la inflamación secundaria a la administración de un complejo de lípido:ácido nucleico. Por ejemplo, el agente antiinflamatorio puede ser un agente antiinflamatorio no esteroideo, un salicilato, un agente antirreumático, un esteroide o un agente inmunosupresor.

Las nanopartidas DOTAP:Chol se pueden sintetizar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el método puede estar de acuerdo con el establecido en Chada et al., 2003, o Templeton et al., 1997.

Un experto en la técnica estaría familiarizado con el uso de liposomas o formulaciones lipídicas para atrapar secuencias de ácidos nucleicos. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio interno acuoso. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas lipídicas separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se autoreorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y sales disueltas entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contempla una construcción genética complejada con LIPOFECTAMINA (GIBCO BRL).

La administración de ácidos nucleicos mediada por lípidos y la expresión de ADN extraño *in vitro* han tenido mucho éxito (Nicolau y Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987). Wong et al. (1980) demostraron la viabilidad de la administración mediada por lípidos y la expresión de ADN extraño en células cultivadas de embrión de pollo, HeLa y hepatoma. Las formulaciones no virales basadas en lípidos proporcionan una alternativa a las terapias génicas adenovirales. Aunque muchos estudios de cultivos celulares han documentado la transferencia de genes no virales basados en lípidos, la administración sistémica de genes a través de formulaciones basadas en lípidos ha sido limitada. Una limitación importante de la administración de genes basada en lípidos no virales es la toxicidad de los lípidos catiónicos que componen el vehículo de administración no viral. La toxicidad *in vivo* de los liposomas explica parcialmente la discrepancia entre los resultados de la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo*. Otro factor que contribuye a estos datos contradictorios es la diferencia en la estabilidad de los liposomas en presencia y ausencia de proteínas séricas. La interacción entre los liposomas y las proteínas séricas tiene un impacto espectacular en las características de estabilidad de los liposomas (Yang y Huang, 1997). Los liposomas catiónicos atraen y se unen a proteínas séricas cargadas negativamente. Los liposomas recubiertos por proteínas séricas se disuelven o son absorbidos por los macrófagos, lo que los elimina de la circulación. Los métodos actuales de administración liposomal *in vivo* utilizan inyección subcutánea, intradérmica, intratumoral o intracraneal para evitar los problemas de toxicidad y estabilidad asociados con los lípidos catiónicos en la circulación. La interacción de liposomas y proteínas plasmáticas es responsable de la disparidad entre la eficiencia de la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo*.

La producción de formulaciones lipídicas a menudo se logra mediante sonicación o extrusión en serie de mezclas liposomales después de (I) evaporación en fase inversa, (II) deshidratación-rehidratación, (III) diálisis con detergente y (IV) hidratación en película delgada. Una vez fabricadas, las estructuras lipídicas se pueden utilizar para encapsular

compuestos que son tóxicos (quimioterapéuticos) o lábiles (ácidos nucleicos) cuando están en circulación. La encapsulación liposomal ha dado como resultado una menor toxicidad y una vida media sérica más larga para dichos compuestos (Gabizon et al., 1990). Numerosos tratamientos de enfermedades utilizan estrategias de transferencia de genes basadas en lípidos para mejorar terapias convencionales o establecer nuevas terapias, en particular terapias para tratar enfermedades hiperproliferativas. El liposoma puede formar complejos con un virus hemaglutinante (HVJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada celular del ADN encapsulado en liposomas. En otras formas de realización, el liposoma puede formar complejos o emplearse junto con proteínas cromosómicas nucleares no histonas (HMG-1). En aún otras formas de realización, el liposoma puede formar complejos o emplearse junto con HVJ y HMG-1.

Un ácido nucleico para administración no viral puede purificarse en geles de poli(acrilamida), gradientes de centrifugación de cloruro de cesio, cromatografía en columna o mediante cualquier otro medio conocido por un experto en la técnica. En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que es un ácido nucleico aislado. Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN o ADN) que se ha aislado libre o de otro modo libre de la mayor parte de componentes celulares o componentes de reacción *in vitro*, y/o la mayor parte del total de ácidos nucleicos genómicos y transcripciones de una o más células. Los métodos para aislar ácidos nucleicos (por ejemplo, centrifugación de densidad en equilibrio, separación electroforética, cromatografía en columna) son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Proteínas y polipéptidos

También se describen en el presente documento inhibidores de NAMPT que son polipéptidos. En determinadas formas de realización, los inhibidores del polipéptido NAMPT se usan en el tratamiento o prevención de RILI. Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento y ambos cubren lo que se entiende como un "péptido" (una molécula de polipéptido que tiene 100 o menos residuos de aminoácidos). En determinadas formas de realización, el inhibidor de NAMPT es una proteína, polipéptido o péptido; en formas de realización particulares, el inhibidor de NAMPT es una proteína o polipéptido que es un anticuerpo.

Como entenderán los expertos en la técnica, se pueden realizar modificaciones y cambios en la estructura de un polipéptido o péptido inhibidor de NAMPT y aún producir una molécula que tenga características similares o deseables. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos o incluir eliminaciones, adiciones o truncamientos en la secuencia de proteínas sin una pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con las estructuras. Dado que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, se pueden realizar ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos en una secuencia de proteína (o su secuencia codificante de ADN subyacente) y, sin embargo, obtener una proteína con propiedades inhibidoras similares. Por tanto, se contempla que se pueden realizar diversos cambios en la secuencia de polipéptidos o péptidos inhibidores de NAMPT (o ADN subyacente) sin una pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica. También se entiende bien que cuando se demuestra que ciertos residuos son particularmente importantes para las propiedades biológicas o estructurales de una proteína o péptido, por ejemplo, residuos en el sitio de unión de un anticuerpo, dichos residuos generalmente no pueden intercambiarse.

Las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Un análisis del tamaño, forma y tipo de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos revela que la arginina, la lisina y la histidina son todos residuos cargados positivamente; que la alanina, la glicina y la serina tienen un tamaño similar; y que la fenilalanina, el triptófano y la tirosina tienen una forma generalmente similar. Por lo tanto, basándose en estas consideraciones, los siguientes subconjuntos se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales: arginina, lisina e histidina; alanina, glicina y serina; y fenilalanina, triptófano y tirosina.

Para efectuar cambios más cuantitativos, se puede considerar el índice hidropático de aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a su hidrofobicidad y características de carga, estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos para conferir una función biológica interactiva a una proteína se comprende generalmente en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen una puntuación indexada hidropática similar y aún conservar una actividad biológica similar. Al realizar cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , son particularmente preferidos aquellos que están dentro de ± 1 , y aquellos que están dentro de $\pm 0,5$ son incluso más particularmente preferidos. También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar eficazmente sobre la base de la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína o péptido biológicamente funcional equivalente así creado está destinado a su uso en formas de realización inmunológicas, como en el presente caso. La patente de EE. UU. 4.554.101 establece que la mayor hidrofiliidad media local de una proteína, gobernada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la patente de EE. UU. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0±1); glutamato (+3,0±1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5±1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

Al realizar cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, se contempla la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad estén dentro de +2, ±1 o ±0,5. Si bien la discusión se ha centrado en polipéptidos funcionalmente equivalentes que surgen de cambios de aminoácidos, se apreciará que estos cambios pueden efectuarse mediante alteración del ADN codificante, teniendo en cuenta también que el código genético está degenerado y que dos o más codones pueden encadenar el mismo aminoácido.

Producción de proteínas in vitro

Además de los métodos de purificación proporcionados en los ejemplos, se analizan los procedimientos generales para la producción de proteínas *in vitro*. Después de la transducción con un vector viral según algunas formas de realización de la presente divulgación, se pueden preparar cultivos primarios de células de mamíferos de diversas maneras. Para que las células se mantengan viables mientras están *in vitro* y en contacto con la construcción de expresión, es necesario garantizar que las células mantengan contacto con la proporción correcta de oxígeno, dióxido de carbono y nutrientes pero estén protegidas de la contaminación microbiana. Las técnicas de cultivo celular están bien documentadas y se describen en el presente documento como referencia (Freshney, 1992).

Una forma de realización de lo anterior implica el uso de transferencia de genes para inmortalizar células para la producción y/o presentación de proteínas. El gen para la proteína de interés puede transferirse como se describió anteriormente a células huésped apropiadas seguido de cultivo de células en las condiciones apropiadas. De esta manera se puede emplear el gen para prácticamente cualquier polipéptido. La generación de vectores de expresión recombinantes y los elementos incluidos en ellos se analizan anteriormente. Alternativamente, la proteína a producir puede ser una proteína endógena normalmente sintetizada por la célula en cuestión.

Otra forma de realización de la presente divulgación utiliza líneas celulares de linfocitos B autólogas, que se transfectan con un vector viral que expresa un producto inmunógeno y, más específicamente, una proteína que tiene actividad inmunogénica. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos incluyen células Vero y Hela, otras líneas celulares B y T, tales como CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji, etc., así como líneas celulares del ovario de hámster chino, W138, BHK, COS-7, 293, células HepG2, 3T3, RIN y MDCK. Además, se puede elegir una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la manera deseada. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación postraducciona de proteínas. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada.

Se pueden usar varios sistemas de selección que incluyen, entre otros, genes de timidina quinasa de HSV, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa, en células th, hgprt o aprt, respectivamente. Además, se puede utilizar la resistencia a antimetabolitos como base de selección: para dhfr, que confiere resistencia a la pirimetamina; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina.

Las células animales se pueden propagar *in vitro* de dos modos: como células no dependientes de anclaje que crecen en suspensión a lo largo de la mayor parte del cultivo o como células dependientes de anclaje que requieren unión a un sustrato sólido para su propagación (es decir, un tipo de crecimiento celular de monocapa). Los cultivos no dependientes de anclaje o en suspensión de líneas celulares establecidas continuas son los medios más utilizados para la producción a gran escala de células y productos celulares. Sin embargo, las células cultivadas en suspensión tienen limitaciones, como el potencial tumorigénico y una menor producción de proteínas que las células adherentes.

Producción de anticuerpos

Algunas formas de realización de la presente divulgación pertenecen a métodos y composiciones que implican un inhibidor de NAMPT, en donde el inhibidor es un anticuerpo que se une a NAMPT.

Puede usarse cualquier método adecuado para generar anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, un receptor puede ser inmunizado con NAMPT o un fragmento del mismo. Se puede utilizar cualquier método adecuado de inmunización. Dichos métodos pueden incluir adyuvantes, otros inmunoestimulantes, inmunizaciones de refuerzo repetidas y el uso de una o más rutas de inmunización.

Puede usarse cualquier fuente adecuada de NAMPT como inmunógeno para la generación del anticuerpo no humano de las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Dichas formas incluyen, entre otras, proteínas completas, péptidos y epítomos, generados mediante medios de degradación recombinantes, sintéticos, químicos o

enzimáticos conocidos en la técnica. Puede usarse cualquier forma del antígeno para generar el anticuerpo que sea suficiente para generar un anticuerpo biológicamente activo. Por tanto, el antígeno provocado puede ser un epítipo único, múltiples epítopos o la proteína completa sola o en combinación con uno o más agentes potenciadores de la inmunogenicidad conocidos en la técnica. El antígeno desencadenante puede ser una proteína aislada de longitud completa, una proteína de la superficie celular (por ejemplo, inmunizando con células transfectadas con al menos una parte del antígeno), o una proteína soluble (por ejemplo, inmunizando sólo con la parte del dominio extracelular de la proteína). El antígeno puede producirse en una célula modificada genéticamente. El ADN que codifica el antígeno puede ser genómico o no genómico (por ejemplo, ADNc) y codifica al menos una parte del dominio extracelular. Como se usa en el presente documento, el término "parte" se refiere al número mínimo de aminoácidos o ácidos nucleicos, según corresponda, para constituir un epítipo inmunogénico del antígeno de interés. Se puede emplear cualquier vector genético adecuado para la transformación de las células de interés, incluidos, entre otros, vectores adenovirales, plásmidos y vectores no virales, tales como lípidos catiónicos.

EJEMPLOS

En el presente documento se describen estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar NAMPT como biomarcador y diana terapéutica en RILI. Los siguientes ejemplos se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Ejemplo 1. Exploración del papel de NAMPT en RILI

Dada la importante función de las cascadas inflamatorias en RILI, se exploraron los efectos de la radiación sobre la expresión de NAMPT, que es un ligando de TLR4 y una proteína de patrón molecular asociado a daños. Se utilizaron tres grupos de ratones C57/B6 para evaluar el papel de NAMPT en RILI.

El primer grupo estaba formado por ratones de tipo salvaje (WT) que recibieron una dosis única de radiación torácica (20 Gy). Los ratones tratados con 0,1 mg/kg de LPS sirvieron como control positivo, mientras que los ratones no irradiados sirvieron como control negativo ("Controles"). Se recolectaron tejidos pulmonares de los ratones en momentos específicos durante un período de 18 semanas. Se midió la cantidad de proteína del lavado broncoalveolar (BAL) y citoquinas, se obtuvieron recuentos/diferenciales celulares y se evaluó la expresión de NAMPT mediante RT-PCR en los tejidos pulmonares. Los tejidos pulmonares también se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y NAMPT. Además, se extrajo sangre de los ratones para medir la expresión de NAMPT en plasma. Los resultados de los análisis correspondientes se proporcionan en las Figuras 1-7.

Como se describe en la Figura 1, en comparación con los ratones de control, los ratones que fueron expuestos a la radiación mostraron niveles de proteína BAL significativamente mayores ($p = 0,007$) comenzando en la semana 1 después de la exposición a la radiación y continuando durante todo el período de 18 semanas, observándose un aumento máximo en la semana 18 (6 veces). De manera similar, como se describe en la Figura 2, el recuento de células que expresan BAL (células BAL) aumentó significativamente ($p=0,007$) en ratones que fueron expuestos a irradiación, observándose un aumento máximo en la semana 12 (9 veces). Como se describe en la Figura 3, el aumento de células BAL reflejó principalmente un mayor recuento de macrófagos que expresan BAL (macrófagos BAL; $p = 0,01$) (Figura 3A) y un mayor recuento de PMN que expresan BAL (PMN BAL; $p = 0,005$) (Figura 3B) en las semanas 1, 12 y 18, después de la exposición a la radiación. El desarrollo de RILI en ratones 1 semana después de la exposición a la radiación se confirmó mediante tinción con H&E de tejidos pulmonares que mostraban daño alveolar difuso agudo en comparación con los tejidos pulmonares de controles no irradiados (Figura 4). Como se describe en la Figura 5, se observó una mayor expresión de NAMPT en tejidos pulmonares de ratones irradiados 1 semana después de la exposición a la radiación (Figura 5A, panel derecho; Figura 5B) en comparación con tejidos pulmonares de controles no irradiados (Figura 5A, panel izquierdo). El aumento de la expresión de NAMPT en tejidos pulmonares irradiados se confirmó mediante análisis de RT-PCR. Como se describe en la Figura 6, la expresión del ARNm de NAMPT aumentó en los tejidos pulmonares 1 semana después de la exposición a la radiación (1,4 veces). El aumento en la expresión del ARNm de NAMPT en tejidos pulmonares irradiados persistió hasta la semana 12 y disminuyó posteriormente (datos no mostrados). Además, como se describe en la Figura 7, la radiación de 20 Gy aumentó el nivel de NAMPT en plasma tan pronto como 8 horas después de la exposición a la radiación; El nivel plasmático de NAMPT aumentó significativamente ($p<0,05$) 1 semana después de la exposición a la radiación (1,5 veces), observándose un aumento máximo en la semana 2 (2,4 veces).

El segundo grupo estaba formado por ratones heterocigotos NAMPT (*Nampt*^{+/−}; "Nampt het") que recibieron radiación torácica de 20 Gy y fueron observados durante 4 semanas. Como controles se utilizaron ratones heterocigotos WT y NAMPT no irradiados y ratones WT irradiados. Se recogieron tejidos pulmonares de los ratones después de 4 semanas y se midió la cantidad de proteína BAL en los tejidos pulmonares. Los resultados de los análisis correspondientes se proporcionan en la Figura 8.

Como se describe en la Figura 8, la proteína BAL aumentó significativamente en ratones WT en comparación con el control no irradiado 4 semanas después de la exposición a la radiación. Sin embargo, los ratones NAMPT (+/−) demostraron una RILI reducida (índices BAL, tinción H&E) a las 4 semanas con una reducción significativa (~20 % de reducción) en el nivel de proteína BAL en comparación con el control WT irradiado, pero sin cambios observados en conteo total de células BAL.

El tercer grupo estaba formado por ratones irradiados que recibieron radiación torácica de 20 Gy y a los que se les inyectó por vía intraperitoneal un anticuerpo policlonal neutralizante de NAMPT (pAb) (3 veces por semana) o PBS ("Vehículo"). Se recogieron tejidos pulmonares de los ratones después de 4 semanas. Se midió la cantidad de proteína BAL, se obtuvieron recuentos/diferenciales celulares y se evaluó la expresión de NAMPT mediante RT-PCR en los tejidos pulmonares. Además, se extrajo sangre de los ratones para medir la expresión de NAMPT en plasma. Los resultados de los análisis correspondientes se proporcionan en las Figuras 9 a 13.

Como se describe en las Figuras 9 y 10, los ratones tratados con el pAb neutralizante de NAMPT demostraron un RILI reducido a las 4 semanas en comparación con los ratones irradiados tratados con vehículo con una reducción del 40 %-60 % en nivel de proteína BAL (Figura 9) y células BAL totales (Figura 10). La disminución de células BAL después del tratamiento con pAb neutralizante de NAMPT reflejó principalmente una disminución del recuento de PMN de BAL (Figura 11, panel izquierdo) y una disminución del recuento de linfocitos que expresan BAL (linfocitos BAL; Figura 11, panel derecho) 4 semanas después de la radiación. Además, como se describe en la Figura 12, se observó una disminución del 11 % en el nivel de expresión del ARNm de NAMPT en tejidos pulmonares de ratones irradiados que fueron tratados con el pAb neutralizante de NAMPT en comparación con el control tratado con vehículo. Además, como se describe en la Figura 13, el nivel de NAMPT en plasma se redujo en ~36 % en ratones irradiados que fueron tratados con pAb neutralizante de NAMPT en comparación con el control tratado con vehículo.

Por lo tanto, los resultados descritos en las Figuras 1 a 13 demuestran claramente una desregulación de la expresión y secreción de NAMPT en RILI. Estos hallazgos indican que NAMPT es un nuevo biomarcador y objetivo terapéutico en RILI que contribuye a la patobiología de las lesiones inducidas por radiación en los tejidos pulmonares.

Ejemplo 2. Efecto de la radiación sobre la expresión de NAMPT en tejidos y sangre humanos

Para explorar más a fondo el papel de NAMPT en RILI, se exploraron los efectos de la radiación sobre la expresión de NAMPT en tejidos y sangre humanos. Los resultados se describen en la Figura 14.

Para evaluar el efecto de la radiación sobre la expresión de NAMPT, se expuso tejido epitelial amigdalino humano a radiación ionizante (RI) de 8Gy durante 24 horas. Como se describe en la Figura 14A, la expresión de NAMPT en tejidos amigdalares humanos se reguló rápida y notablemente después de la exposición a RI de 8Gy. El efecto de la radiación sobre la expresión de NAMPT se evaluó en mayor detalle mediante el estudio de la expresión de NAMPT en pacientes con cáncer sometidos a radioterapia. Como se describe en la Figura 14B, los sujetos sometidos a radioterapia para cáncer de mama (n = 50) o cáncer de pulmón (n = 34) exhibieron un nivel plasmático de NAMPT significativamente mayor en comparación con los sujetos de control (n = 268) (p <0,0001). También se evaluó el efecto de la radiación sobre la expresión de NAMPT mediante el estudio de la expresión de NAMPT en pacientes con neumonitis por radiación. Estos sujetos estaban recibiendo radioterapia para cáncer de pulmón o esófago con inicio de RILI un promedio de 6 semanas después del inicio de la radioterapia. Como se describe en la Figura 14C, los pacientes con neumonitis por radiación (n=19) exhibieron un nivel plasmático de NAMPT que era 4-5 veces mayor que los sujetos de control (n=70) (p <0,001). El efecto de la radiación sobre la expresión de NAMPT se evaluó más a fondo mediante el estudio de la expresión de NAMPT en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS). Como se describe en la Figura 14D, los pacientes con ARDS (n=338) exhibieron un nivel plasmático de NAMPT que era 4-5 veces mayor que los sujetos de control (n=245).

Por tanto, los resultados resumidos en la Figura 14 indican claramente una desregulación de la expresión y secreción de NAMPT en RILI humano.

Ejemplo 3. Evaluación del papel de NAMPT en RILI usando un modelo *in vivo* de neumonitis por radiación

Para evaluar más a fondo el papel de NAMPT en RILI, se expusieron ratones WT C57/B6 y ratones heterocigotos NAMPT (*Nampt*^{+/-}) a una irradiación total del pulmón torácico de 20 Gy (WTLI) y se evaluó en puntos de tiempo específicos durante un período de 18 semanas. Los resultados se describen en las Figuras 15 y 16.

Como se describe en las Figuras 15A-15C, los ratones WT expuestos a WTLI exhibieron una mayor expresión de NAMPT, especialmente en macrófagos alveolares y células epiteliales, y un aumento de la inflamación, la fuga vascular y la lesión pulmonar inflamatoria a las 4 semanas (Figura 15A), 12 semanas (Figura 15B) y 18 semanas (Figura 15C) después de 20Gy WTLI en comparación con ratones expuestos de forma simulada (ratones no irradiados; se muestra en el recuadro). La Figura 15D resume la tinción NAMPT en tejidos pulmonares 4 semanas, 12 semanas y 18 semanas después de la exposición a RI; Los ratones expuestos de forma simulada (ratones no irradiados) sirvieron como control negativo. Por otro lado, los ratones heterocigotos NAMPT (*Nampt*^{+/-}) mostraron una lesión pulmonar inflamatoria reducida en comparación con los ratones WT, como se refleja en la reducción del nivel de proteína BAL (Figura 16A) y el recuento de células BAL (Figura 16B) en ratones heterocigotos NAMPT 4 semanas después de la exposición a 20Gy WTLI.

Por lo tanto, los resultados descritos en las Figuras 15 y 16 subrayan un papel clave de NAMPT en la patogénesis de RILI e indican el potencial del uso de NAMPT como biomarcador de RILI.

Ejemplo 4. Validación de NAMPT como objetivo terapéutico en RILI usando un modelo *in vivo* de neumonitis por radiación

Para validar NAMPT como objetivo terapéutico en RILI, se expusieron ratones WT C57/B6 y ratones heterocigotos NAMPT (*Nampt^{f/f}*) a 20Gy WTLI (ratones RILI) o IR simulado (ratones no irradiados), como se describe en el Ejemplo 3. A los ratones WT se les inyectó por vía intraperitoneal 3 veces por semana 50 µg de un pAb anti-NAMPT o control de vehículo. Se evaluó en los ratones la lesión e inflamación pulmonar, el nivel de proteína BAL, el recuento de células BAL y el nivel de NAMPT en plasma después de 4 semanas de exposición a RI. Los resultados se describen en la Figura 17.

En comparación con los ratones expuestos a RI simulado (que se muestran en el recuadro), la tinción con H&E de tejidos pulmonares de ratones WT expuestos a WTL1 mostró un marcado aumento en la lesión e inflamación pulmonar (Figura 17A). Por el contrario, los ratones heterocigotos NAMPT expuestos a 20 Gy RI mostraron una lesión significativamente reducida (Figura 17B). También se observó una lesión pulmonar significativamente reducida en ratones a los que se les inyectó el pAb anti-NAMPT (Figura 17C). La disminución de la lesión inducida por RI tras el tratamiento con anticuerpo anti-NAMPT también se reflejó en la reducción del nivel de proteína BAL (Figura 17D, panel izquierdo) y el recuento de células BAL (Figura 17D, panel derecho) en ratones a los que se les inyectó el pAb anti-NAMPT. El anticuerpo anti-NAMPT también disminuyó los niveles de NAMPT en sangre de ratones expuestos a RI después de 4 semanas de exposición a RI (Figura 17E).

Por lo tanto, los resultados descritos en la Figura 17 subrayan el papel de un anticuerpo anti-NAMPT en la mejora de la neumonitis por radiación y la lesión pulmonar inducida por WTL1, y validan a NAMPT como un objetivo terapéutico en RILI.

Ejemplo 5. Validación de NAMPT como objetivo terapéutico en RILI utilizando un modelo *in vivo* de fibrosis pulmonar inducida por radiación

Para validar aún más NAMPT como objetivo terapéutico en RILI, se expusieron ratones WT C57/B6 y ratones heterocigotos NAMPT (*Nampt^{f/f}*) a 20Gy WTLI, como se describe en el Ejemplo 3. A los ratones WT se les inyectó por vía intraperitoneal 3 veces por semana 50 µg de un pAb anti-NAMPT o control de vehículo, como se describe en el Ejemplo 4. Se evaluó la fibrosis pulmonar inducida por radiación (RILF) en los ratones mediante la evaluación de la inflamación, la deposición de colágeno y la expresión de actina del músculo liso (SMA) del tejido pulmonar, que es un reflejo de la transición de miofibroblastos y la fibrosis. Los resultados se describen en la Figura 18.

Como se describe en la Figura 18, 20 Gy RI indujo RILF a las 12 y 18 semanas, lo que se reflejó por un aumento de la inflamación (tinción H&E de los tejidos pulmonares, que se muestra en la Figura 18A; y una mayor expresión de IL-6 en análisis de transferencia Western, mostrado en la Figura 18E), aumento de la deposición de colágeno (detectado mediante tinción tricrómica de tejidos pulmonares, mostrado en la Figura 18C), y aumento de la expresión de SMA del tejido pulmonar (detectado mediante análisis de transferencia Western, mostrado en la Figura 18E). El pAb anti-NAMPT redujo significativamente la lesión inducida por RI a las 12 y 18 semanas, lo que se reflejó en una disminución de la inflamación (tinción H&E de tejidos pulmonares, mostrada en la Figura 18B), y una disminución de la expresión de SMA en el tejido pulmonar (análisis de transferencia Western, mostrados en Figura 18E). De manera similar, se observaron los efectos protectores del genotipo *Nampt+1* con tinción tricrómica reducida (18 semanas) (Figura 18D), así como niveles reducidos de SMA e IL-6 en tejidos pulmonares 12 semanas después de la exposición a RI (análisis de transferencia Western), mostrado en la Figura 18E).

Por lo tanto, los resultados descritos en la Figura 18 subrayan el papel de un anticuerpo anti-NAMPT y un genotipo *Nampt+1* heterocigoto en la atenuación de RILF y validan aún más a NAMPT como objetivo terapéutico en RILI.

Ejemplo 6. Desarrollo de una plataforma de anticuerpos anti-NAMPT humanizados para reducir la lesión inflamatoria sistémica

En una búsqueda para amortiguar la activación de vías inflamatorias conservadas evolutivamente, desarrollamos anticuerpos anti-NAMPT humanizados. Después de varias rondas de subclonación, se generó un panel de anticuerpos monoclonales murinos (mAb) anti-NAMPT que fueron altamente eficaces para reducir significativamente la fosforilación de NFκB inducida por NAMPT y atenuar la lesión pulmonar inflamatoria murina. Se seleccionaron para la humanización dos de estos mAb anti-NAMPT murinos de alta afinidad (AL303, AL310), con K_d de 6 y 9 nM. La detección integral *in vitro* e *in vivo* de 50 mAb humanizados (25 derivados de cada mAb murino) utilizando células endoteliales humanas y modelos preclínicos de lesión inflamatoria de ratón y rata, dieron como resultado la selección de nuestros principales anticuerpos anti-NAMPT humanizados. La capacidad de los anticuerpos anti-NAMPT humanizados para tratar la lesión pulmonar se probó *in vivo*, utilizando dos modelos murinos de lesión pulmonar: un modelo de lesión pulmonar de "un solo golpe" que se desarrolló mediante administración intratraqueal de LPS en ratones, y un modelo de "dos golpes" de lesión pulmonar que se desarrolló al exponer ratones a LPS y VILI mecánico. Se administró a estos ratones cualquiera de los anticuerpos anti-NAMPT humanizados para evaluar la capacidad de los anticuerpos para atenuar la inflamación y las lesiones agudas. Los resultados de las pruebas se proporcionan en la Figura 19.

Como se representa en la Figura 19A, el análisis de la puntuación de lesión pulmonar integrada mostró que todos los anticuerpos anti-NAMPT humanizados probados fueron eficaces para reducir la lesión pulmonar en el modelo de "un solo golpe" inducido por LPS. Sin embargo, el efecto más sustancial se observó con el anticuerpo P anti-NAMPT (reducción del 45 %). Como se describe en la Figura 19B, el análisis de la puntuación de lesión pulmonar integrada mostró que todos los anticuerpos anti-NAMPT humanizados probados fueron eficaces para reducir la lesión pulmonar en el modelo de "dos golpes" inducido por LPS/VILI. Sin embargo, el efecto más sustancial se observó con el anticuerpo P anti-NAMPT (reducción del 42 %). Como se describe en la Figura 19C, el anticuerpo P anti-NAMPT también fue eficaz para reducir los índices de lesión histológica en el modelo de lesión inflamatoria aguda de "dos golpes" inducido por LPS/VILI. En consecuencia, se seleccionó el anticuerpo "P" anti-NAMPT humanizado como una estrategia terapéutica viable para RILI.

El mAb "P" anti-NAMPT humanizado se ha sometido a una optimización de secuencia que afecta a sustituciones de aminoácidos relevantes dentro de las secuencias VH y VL para un mejor desarrollo, una mayor expresión de mAb en líneas celulares de mamíferos inestables y una inmunogenicidad reducida. Las alteraciones de la secuencia se basaron en datos estructurales y secuenciales, como agregación o modificaciones postraduccionales (oxidación, desamidación, isomerización), epítomos de células T y motivos de glicosilación ligados a N. Los detalles del desarrollo y selección de anticuerpos monoclonales anti-NAMPT humanizados se proporcionan en el documento U.S.S.N. 62/883.952.

Los resultados descritos en la Figura 19 subrayan el anticuerpo anti-NAMPT como una nueva plataforma antiinflamatoria basada en el sistema inmunitario. Como se resume en el diagrama esquemático proporcionado en la Figura 20, NAMPT es una molécula efectora inmune liberada por una variedad de estímulos dañinos, incluida la radiación, que funciona como una proteína de patrón molecular asociada a daño o DAMP. Mediante la ligadura de TLR4, NAMPT contribuye a la activación de la cascada inflamatoria sistémica, al aumento de la permeabilidad vascular y a la insuficiencia multiorgánica. El anticuerpo anti-NAMPT inhibe la NAMPT y, por lo tanto, amortigua las cascadas inflamatorias inducidas por la radiación, la toxicidad pulmonar y la inflamación sistémica para aliviar los síntomas de RILI.

Ejemplo 7. El anticuerpo anti-NAMPT radiomarcado identifica una mayor expresión de NAMPT en tejidos pulmonares inflamados

Los anticuerpos anti-NAMPT radiomarcados se desarrollaron con el objetivo de detectar de forma no invasiva la vía de señalización de NAMPT y la expresión de NAMPT en diferentes tejidos *in vivo*. La obtención de imágenes de los modelos de ratón con RILI utilizando mAb anti-NAMPT radiomarcado nos permitiría definir el momento óptimo para implementar mAb anti-NAMPT como intervención terapéutica y examinar los órganos principales en busca de inflamación y apoptosis celular, empleando otros radiomarcadores específicos, después de la irradiación corporal total (TBI) o irradiación corporal parcial (PBI), como en un incidente nuclear. Anteriormente se optimizó un protocolo para radiomarcado específicamente anticuerpos con ^{99m}Tc . Con una metodología similar, radiomarcamos un mAb anti-NAMPT para la detección de la expresión tisular de NAMPT en pulmón y otros órganos utilizando un protocolo de marcaje indirecto mediante la conjugación del mAb con un conector heterobifuncional. Para probar la detección de la expresión de NAMPT mediante el anticuerpo anti-NAMPT radiomarcado, se inyectó la sonda mAb anti-NAMPT marcada con ^{99m}Tc en ratones de control y en ratones que fueron expuestos a 8Gy PBI, y se realizaron mediciones de biodistribución e imágenes de autorradiografía rápida. Como se describe en las Figuras 21A-21C, se observó una mayor absorción radiactiva (1,8 veces mayor) en los pulmones de ratones expuestos a PBI en comparación con los ratones de control, 2 semanas después de la exposición a PBI. Para confirmar aún más la detección de NAMPT mediante el anticuerpo anti-NAMPT radiomarcado, se inyectó la sonda mAb anti-NAMPT marcada con ^{99m}Tc en ratones que fueron expuestos a LPS o 20 Gy WTLLI, y se realizaron mediciones de biodistribución e imágenes de autorradiografía rápida. Como se describe en las Figuras 21D-21F, las imágenes de autorradiografía mostraron una fuerte detección de la expresión de NAMPT mediante la sonda mAb anti-NAMPT marcada con ^{99m}Tc en tejidos pulmonares 24 horas después de la inyección de LPS (intratraqueal) y 5 días después de la radiación torácica (20 Gy) en ratones C57/B6.

Así, como se describe en la Figura 21, el anticuerpo anti-NAMPT radiomarcado fue eficaz para detectar una expresión aumentada de NAMPT en tejidos pulmonares inflamados. Esto subraya el potencial de utilizar el anticuerpo anti-NAMPT radiomarcado como herramienta para la detección de NAMPT, lo que podría ser fundamental en el uso de NAMPT como biomarcador en RILI mediante los métodos descritos en este documento.

TABLA 1. TABLA DE SECUENCIAS

IDENTIFICADOR DE SECUENCIAS	SECUENCIA
SEQ ID NO: 1	AGTGACTTAAGCAAACGGAGCGCGGCTGAAGCTCATTTTCTCCTTCCTCGCAGCCGCGCCAGG GAGCTCGCGCGCGCGCGCGCCCTGTCTCTCGCGCCGAGAGATEAATCTCTCGCGCAGAAGCCGAGT TCAACATCTCTCTCGGCCACCGACTCCTACAAGGTTACTCACTATAAACAAATATCCACCCAAC ACAAGCAAAGTTTATTTCTACTTTGAATGCCGTGAAAAGAAGACAGAAAACCTCCAAATTAAG GAAGGTGAAATATGAGGAAACAGTATTTTATGGGTTGCACTACATTTCTTAATAAGTACTTAA AAGGTAAAGTAAGTAACCAAAGAGAAAATCCAGCAAGCCAAAGATCTCTACAAGCAACATTTCT CAAGATGATGCTTTAATGAAAAGGGATGGAACTACATTTCTTGAGAAG TATGATGGGCATCTTCCAATAGAAATAAAAGCTGTTCTCGAGGGCTTTGTCAATCCAGAGG AAATGTTCTCTTCAAGGTGGAAAACAAGATCCAGAGTGTACTGGCTTACAAATTGGATTG AGACTATTTCTGTTCACTCCTGGTATCCAATCACAGTGGCCACAAATTTAGAGAGCAGAAG AAAATATTTGCCAAATATTTGTTAGAAACTCTCTGGTAACTTAGATGGTCTGGAATACAAGTT ACATGATTTTGGCTACAGAGGAGTCTCTTCCAAAGAGACTGCTGGCATAGGAGCATCTGCTC ACTTGGTTAACTTCAAAGGAACAGATACAGTAGCAGGACTTGCTCTAATTAATAAAATATTAT GGACCGAAAGATCCTGTTCCAGGCTATTCTGTCTCAGCAGCAGAACAC AGTACCATAACAGCTTTGGGGGAAAGACCATGAAAAGATGCTTTTGAAACATATTGTAAACACA GTTTTCTATCAGTGCCTGTATCTGTGGTCAGCGATAGCTATGACATTTATAATGCCTGTGAGA AAATATGGGGTGAAGATCTAAGACATTTAATAGTATCAAGAACTACACAGGCACCACATAATA ATCAGACCTGATTTCTGGAACCCCTCTTGACACTGTGTTAAAGTTTTGGAGATTTTAGGTAA GAAGTTTCTCTGTTACTGAGAACTCAAAGGGTTACAACTTCTCTCCACTTATCTTAGAGTTA TTCAAAGGGGATGGAGTAGATATTAATACCTTACAAGAGATTTGTAAGGCATGAAACAAAAA ATGTGGAGTATTTGAAAATATTGCCTTCGGTCTCTGGTGGAGGTTTGCTA CAGAAGTTGACAAGAGATCTCTTGAATTTGTTCTTCAAGTGTAGCTATGTTGTAACATAATGG CCTTGGGATTAACGTCTTCAAGGACCCAGTGTCTGATCCCAACAAAAGGTCCAAAAGGGCC GATTATCTTTACATAGGACGCCAGCAGGGAATTTGTTACACTGGAGGAAAGGAAAAGGAGAC CTTGAGGAATATGCTCAGGATCTTCTCCATACTGTCTTCAAGATGGCAAGGTGACAAAAAG CTATTCATTTGATGAAATAAGAAAAAATGCACAGCTGAATATTGAACTGGAAACAGCACATC ATTAGGCTTTATGACTGGGTGTGTGTGTGTGTATGTAATACATAATGTTTATTGTACAGAT GTGTGGGTTTGTGTTTTATGATACATTACAGCCAAATATTGTGTTGG TTTATGGACATACTGCCCTTTTCAATTTTCTTCTTCCAGTGTTTAGGTGATCTCAAATTAG GAAATGCATTTAACCATGTAAAGATGAGTGCTAAAGTAAGCTTTTATAGGGCCCTTTGCCAA TAGGTAGTCAATCAATCTGGTATTGATCTTTTCAAAATAACAGAACTGAGAACTTTTATA TATAACTGATGATCACATAAAACAGATTTGCAATAAAATACCATTGATTTCTTTATGTTTATA TTTAACTTGTATTTTTTGTACAAACAAGATTCTGTAAAGATATATTTGAAAGTTTCAGTGATTTA ACAGTCTTTTCCAACCTTTTCATGATTTTATGAGCACAGACTTTCAAGAAAATACTTGAAAAT AAATACATTGCCCTTTTGTCATTAAATCAGCAAAATAAACATGGCCTT AACAAAGTTGTTTGTGTTATTGTACAATTTGAAAATATGTCTGGGACATACCTATAGAATT ACTAACCTTACTGCCCTTGTAGAATATGTATTAATCATTTACATTAAGAGAAAATAATGGT TCTTACTGGAATGTCTAGGCACTGTACAGTTATTATATATCTTGGTGTGTTGATTGTACCAG TGAAATGCCAAATTTGAAAGCCCTGTACTGCAATTTTATATGTCAGAGATGGCTGTGGCTC TAATATGCACCTCAAGATTTTAAGGAGATAATGTTTTFAGAGAGAATTCTGTCTTCCACTAT AGAAATATATACATAAATGTAAAATACTTACAAAAGTGGAAAGTAGTGATTTTAAAGTAATTA CACTTCTGAATTTTATTTTTCATATTTCTATAGTTGGTATGACTTAAATG AATTACTGGAGTGGGTAGTGAGTGACTTAAATGTTTCAATTTCTGTATATTTTTTTATTAAG TTTTTAAAAAATTAAATTGGATATTAAATTTGATGGACATCATTTATTAATTTTAAACTGAA

(Continuación)

IDENTIFICADOR DE SECUENCIAS	SECUENCIA
	TGCCCTCAATAAGTAATACTGAAGCACATTCTTAAATGAAGATAAAATTATCTCCAATGAAAA GCATGACATGTGTTTTCAATAGAAGAATCTTAAAGTTGGCTAAATTCAAAAGTGCCTTGACATCAA AATGTTCTAGAGTGATTAGCTACTAGATTCTGAATCATACATCACATCTGACTAGAGACCAG TTTCTTTCCGAATGATTCCTTTTATGTATGTAGATCTGTTCTTCTGAGGCAGCGGTTGGCCAAAC TATAGCCCAAAGGCCAAATTTGGACTTCCTTTTATAAAATGCAGATTGT CTATGGCTGCTTTCCCACTACTCCAGCCTAAGGTAACACAGCTGCAATAGAAGCCAAATGAGA ATCGCAAAGCCCAAATGTTTATTAACTGCGCTTTACACAAAATTACACAAAAGTTTCCT GATCTCTGTTCTAAGAAAAGGAGTGTGCTTGCAATTAAAAGGAAAATGTTGGTTCTAGGGA AGGAGGAGGCTAAATAAATTGATACGGAATTTTCCTCTTTGTCCTCTTTTCTCCTACTTAA GAATCCGATACTGGAAGACTGATTAGAAAAGTTTAAACATGACATTAAATGTGAAATTTT AAAAATGAAAAGCCATAAATCATCTGTTTAAATAGTTACATGAGAAAATGATCACTAGAA TAACCTAATFAGAAGTGTATCTTCATTAAATGTTTFTGTAAGTGGT ATTAGAAAGCAATATGTTTTTCAGATGGTTCTTTAAACATGTAGTGAGAACAAATAGCATTAT TCACITTTAGTAAGTCTTCTGTAATCCATGATATAAAATAATTTAAAAATGATTTTTTAATG TATTTGAGTAAAGATGAGTAGTATTAAGAAAAACACACATTTCTTCACAAAATGTGCTAAGG GGCGTGTAAGCAATCAAAAGAACTATTACCAATAATAGTTTGTATATCACCCATAATTTT GTGTTTAAACATTGAAATATAGTACAGACAGTATTCTCTGTGTTCTGTGAAATTCAGCAGC TTTCAAAATAGAGTTTAAATTTAGAAATTTGCACTGAAAAAAGCTATCTCTTTGTTCAACAACCA TAAATCAGGAGATGGAGATTAAATCTATTGGCTCTTAGTCACTTGGAA CTGATTAATTTCTGACTTTCTGTCACTAAGCACTTGGTATTTGGCCATCTCCATTTCTGAGCAC CAAACGTTTAAACAGCAATGTCCACTAGAATCTGCTGTGTCTCACCCTTAAATCAGTCTAAAT TCTTCCAGACAAAAGCAAATGGCATTATATGAGTTTAAGTCAATAGATTTTCAACTGACATTAA ATTAATCCCTCTTGATTTGATTATATCATCAAGTATTATATCTTAAATAGGAGCTAGGATTT CTGTGTAAAGACTCTTATTTGTACCCTATAATTAAGTAAAATGTTTTTATGAGTATCCCT TGTTTTCCCTCTTAAATTTGTTATCAACAATTTTATAATGAAATCTATCTTGGAATTA GAAAGAAAAATGGCAAGGTATTTATTGTTCTGTTTGGCATAATTTAGA ACTCACACTTAAGTATTTTGTAGTTTACATTCCTTTTAAACCATTCAGTGGAGAATGTCA GCTTTTCTCCCAAGTTGTATGTTAAGTCTATTTCTAAATATGTAATCAACATCAAGTTATAAAC ATGTAATAAACATGGAAATAAGTTTAGCTCTATTA
SEQ ID NO: 2	MNPAEAEFNI LLATDSYKVTHYKQYPPNTSKVYSYFECKEKTENSKLKVKYEE TVFYGL QYILNKYLKGVVTKKIQEARDVYKEHFQDDVFNEKGNWYILEKYDGHLPLEIKAVPEGFV IPRGNVLTVENTDPECYWLTNWIETILVQSWYPITVATNSREQKKILAKYLLETSGNLDGL EYKLHDFGYRGVSSQETAGIGASAHLVNFKGTDVAGLALIKKYGTGKDFVPGYSVPAAEHS TIITAWGKDHEKDAFENIVTQFSSVFPVSVDSDYDIYNACEKIWGEDLRHLIVSRSTQAPLII RPDSGNPLDTVLKVLLEILGKKFPVTENSKGYKLLPPYLRVVIQGDGV DINTLQEIIVEGMNQEM WSIENIAFGSGGGLLQKLTRDLNCSFKCSYVVTNGLGINVFNDPVAD PNKRSKKGRSLHRTFAGNFVTLLEGKGDLEEYQDILLHTVFNKGKVTKSYSFDEIRKNAQL NIELEAAHH

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de lesión pulmonar inducida por radiación (RILI) en un sujeto humano, que comprende detectar el nivel de fosforribosiltransferasa de nicotinamida (NAMPT) en una muestra biológica del sujeto humano, en el que un nivel más alto de NAMPT en comparación con un control sano o un valor de referencia es indicativo de la presencia de RILI en el sujeto humano.
2. El método de la reivindicación 1, en el que detectar el nivel de NAMPT comprende detectar el nivel de proteína NAMPT, opcionalmente, en el que el nivel de proteína NAMPT se detecta mediante autorradiografía, análisis de transferencia Western, inmunohistoquímica o ELISA.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el nivel de proteína NAMPT se detecta mediante un anticuerpo anti-NAMPT, opcionalmente, en el que el anticuerpo anti-NAMPT está radiomarcado.
4. El método de la reivindicación 1, en el que detectar el nivel de NAMPT comprende detectar el nivel de ARNm de NAMPT, opcionalmente, en el que el nivel de ARNm de NAMPT se detecta mediante RT-PCR.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el nivel de ARNm de NAMPT se detecta mediante un par de cebadores complementarios de toda o parte de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el sujeto humano muestra síntomas de RILI.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el sujeto humano tiene riesgo de desarrollar RILI.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el sujeto humano es un paciente con cáncer sometido a radioterapia.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el sujeto humano es un paciente con cáncer sometido a radioterapia torácica.
10. El método de la reivindicación 7, en el que el sujeto humano está expuesto a radiación ionizante (RI).
11. El método de la reivindicación 1, en el que el control sano o valor de referencia es un nivel de expresión de NAMPT en un sujeto de control.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el sujeto de control es un sujeto sin RILI.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el sujeto de control es un sujeto sin ninguna enfermedad pulmonar.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es una muestra de tejido o plasma.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el tejido es tejido pulmonar, tejido torácico o tejido amigdalino.

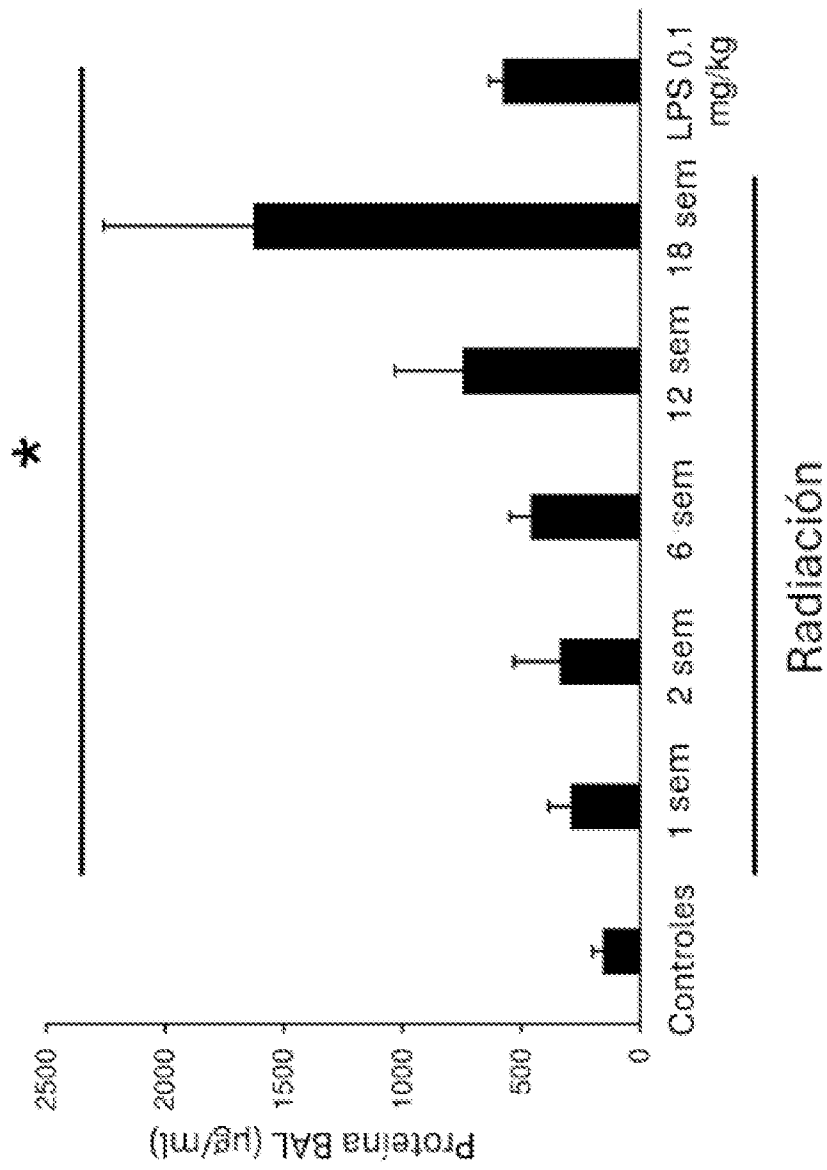


FIG. 1

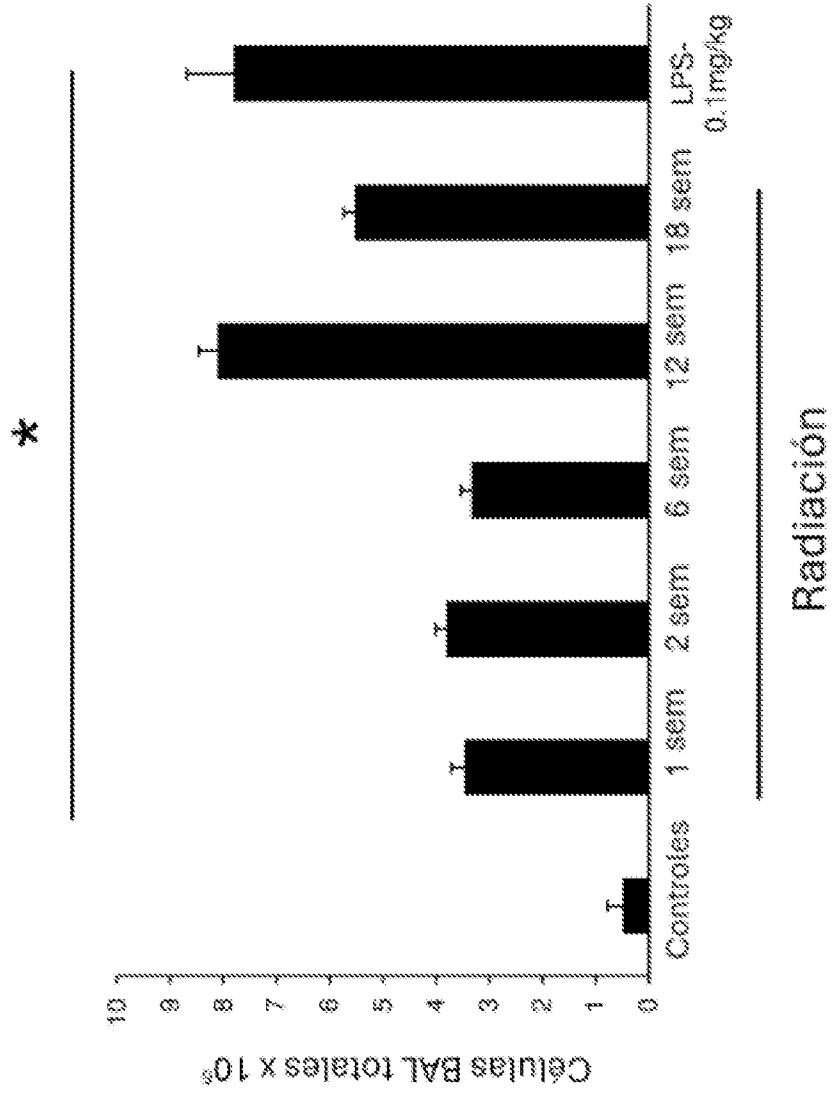


FIG. 2

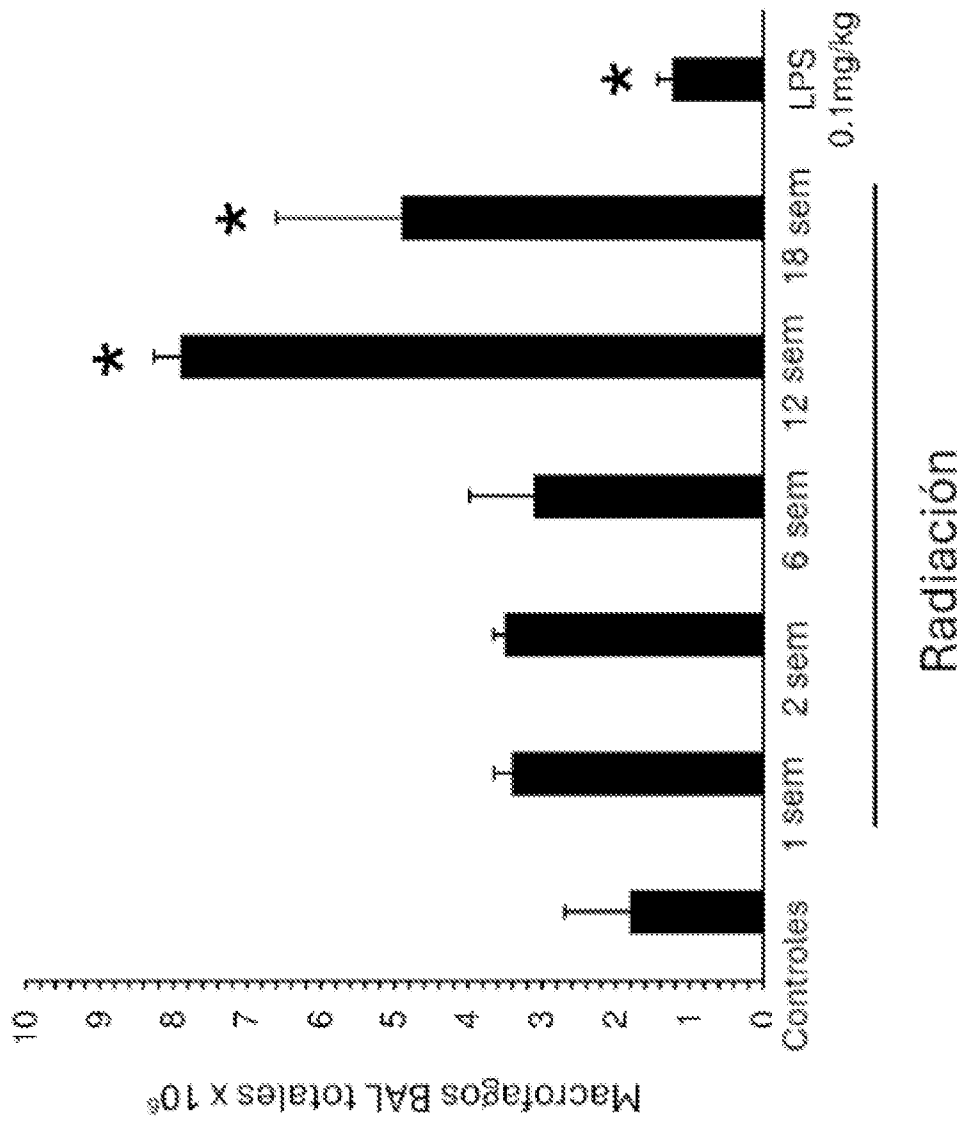


FIG. 3A

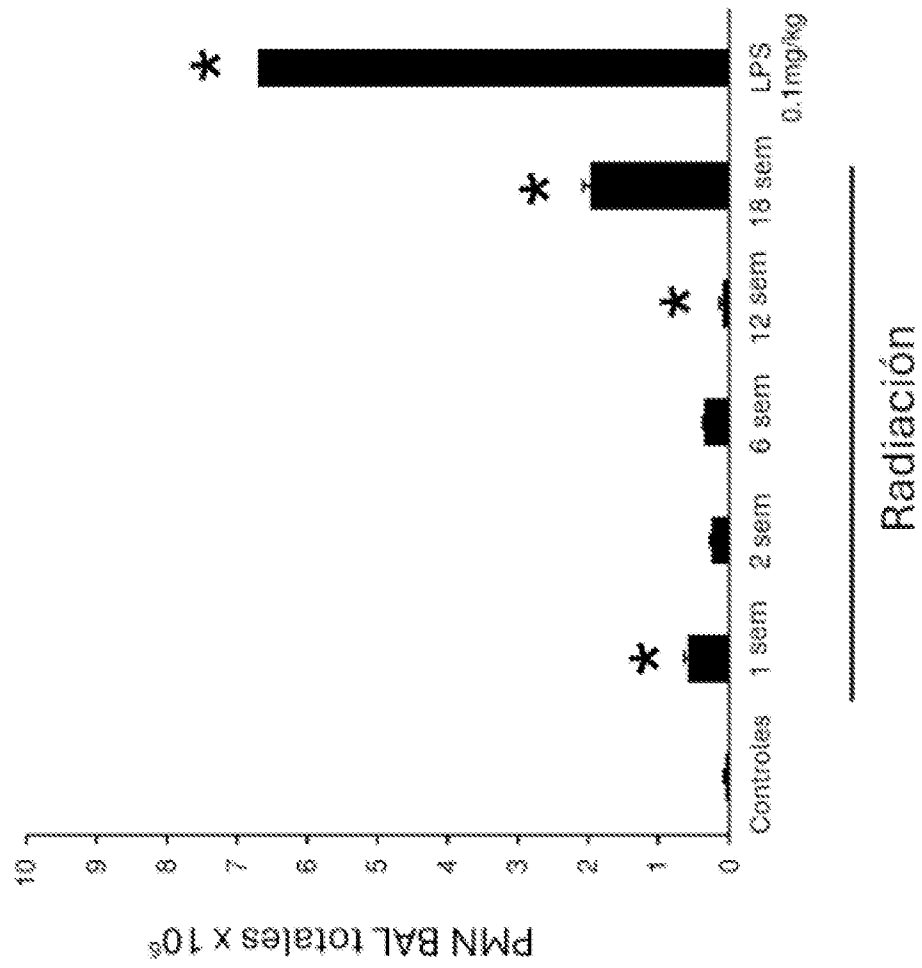
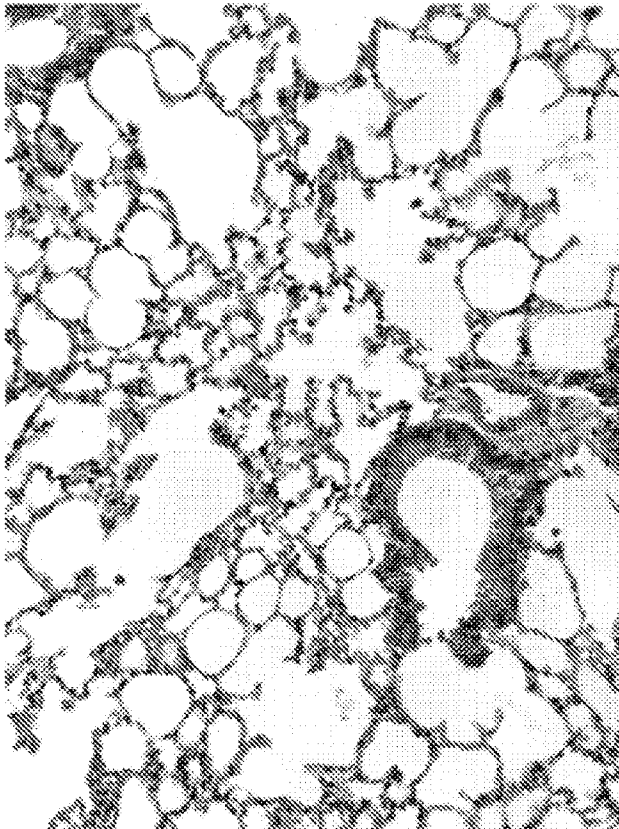


FIG. 3B

Tinción H&E: tejido pulmonar de
ratones no irradiados



Tinción H&E: tejido pulmonar de
ratón 1 semana después de la irradiación

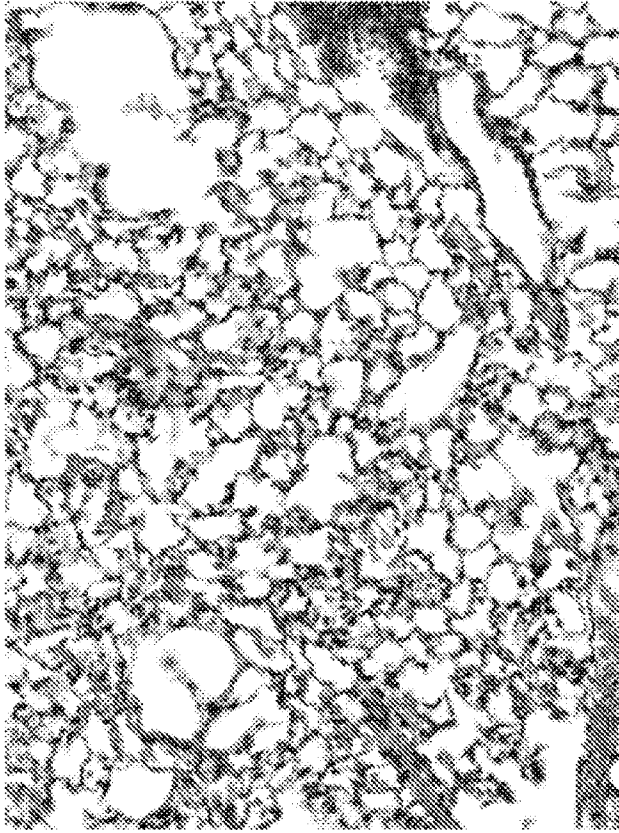
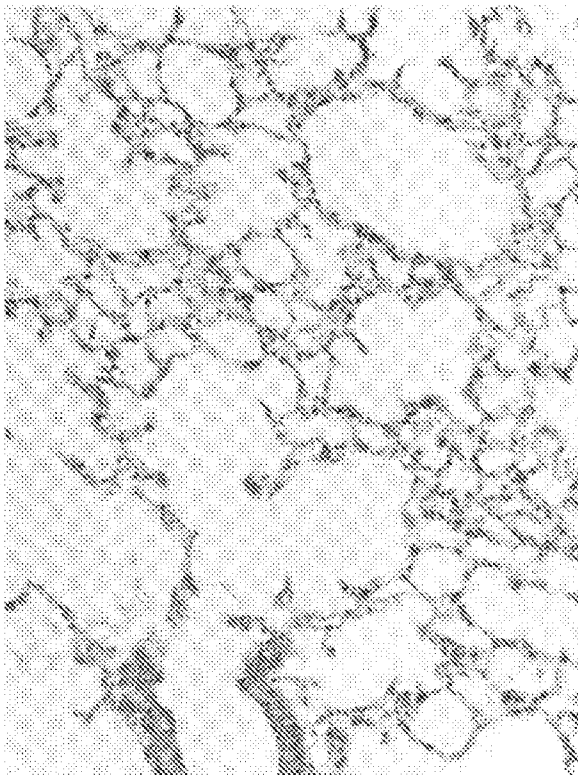


FIG. 4

Tinción NAMPT: tejido pulmonar de
ratones no irradiados



Tinción NAMPT: tejido pulmonar de
ratón 1 semana después de la irradiación

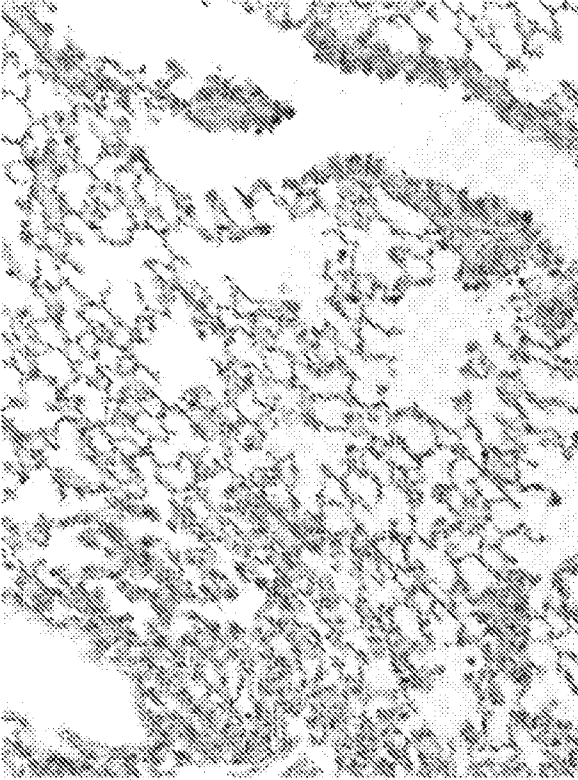


FIG. 5A

Tinción NAMPT: tejido pulmonar de
ratón 1 semana después de la irradiación

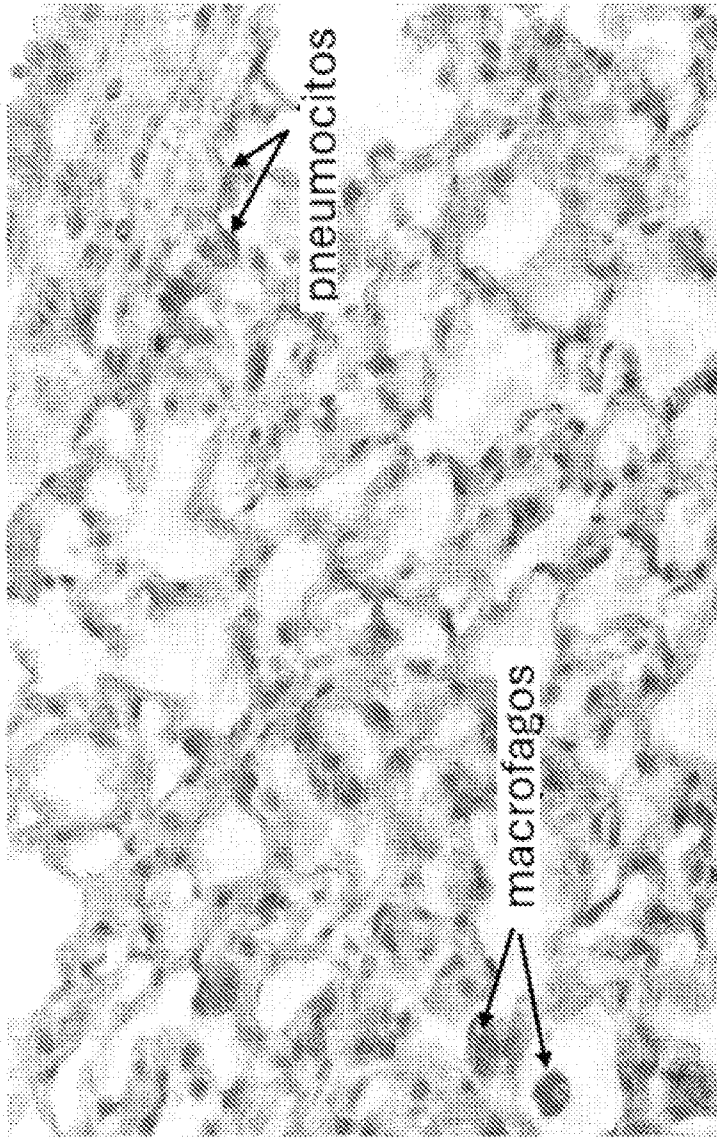


FIG. 5B

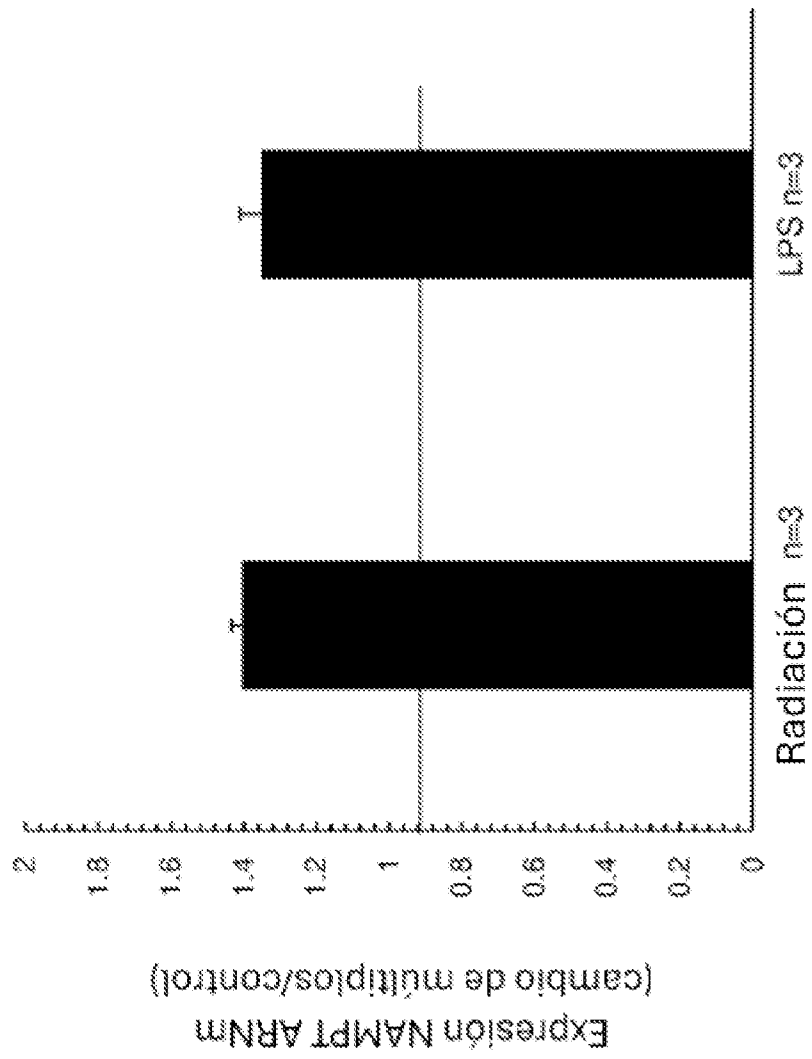


FIG. 6

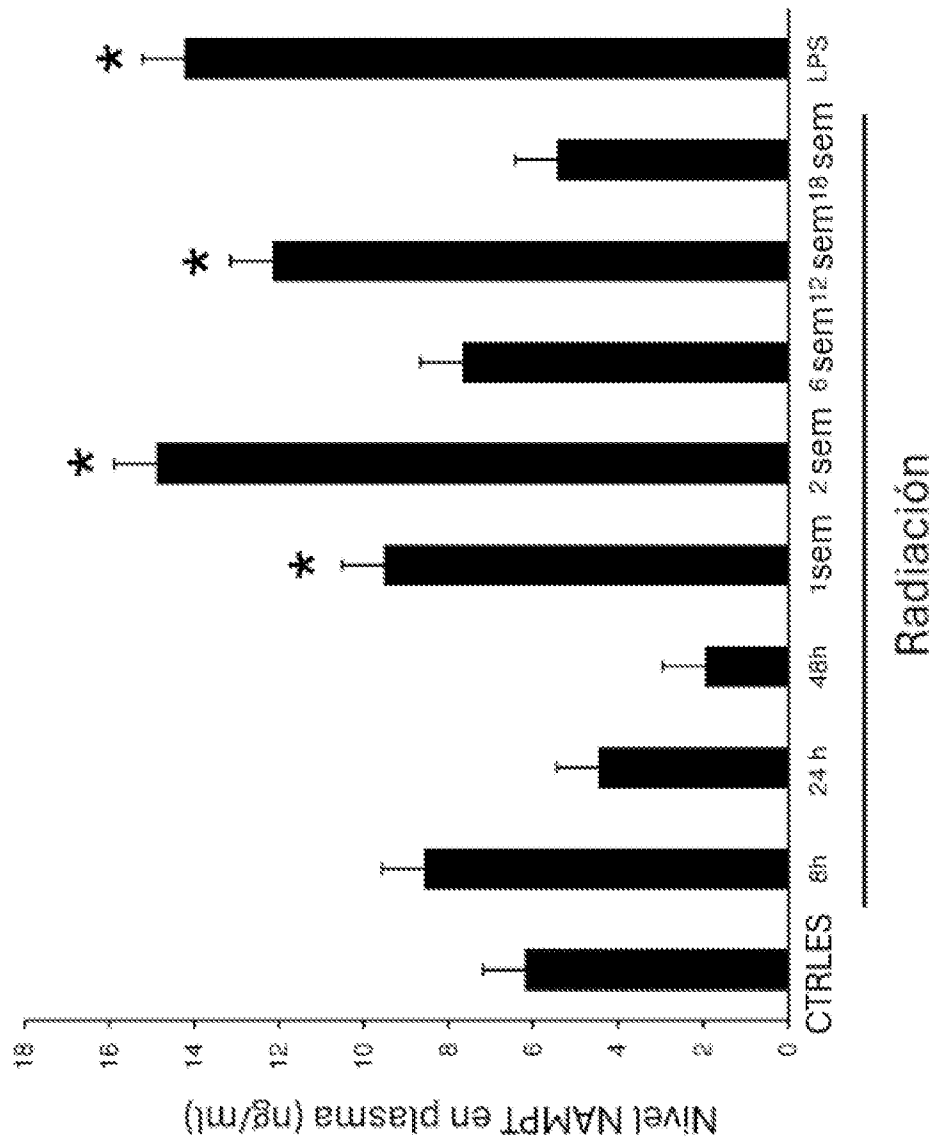


FIG. 7

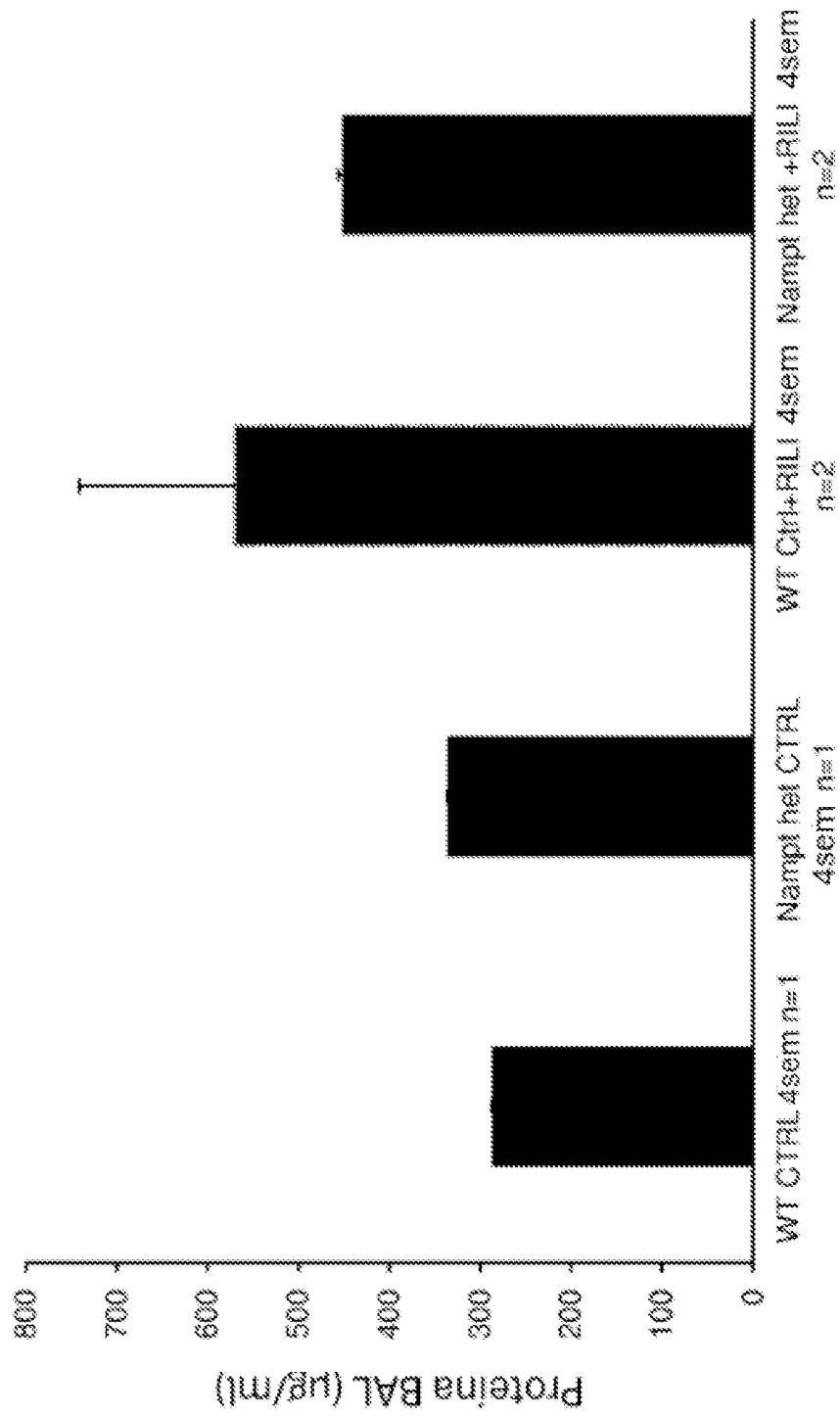


FIG. 8

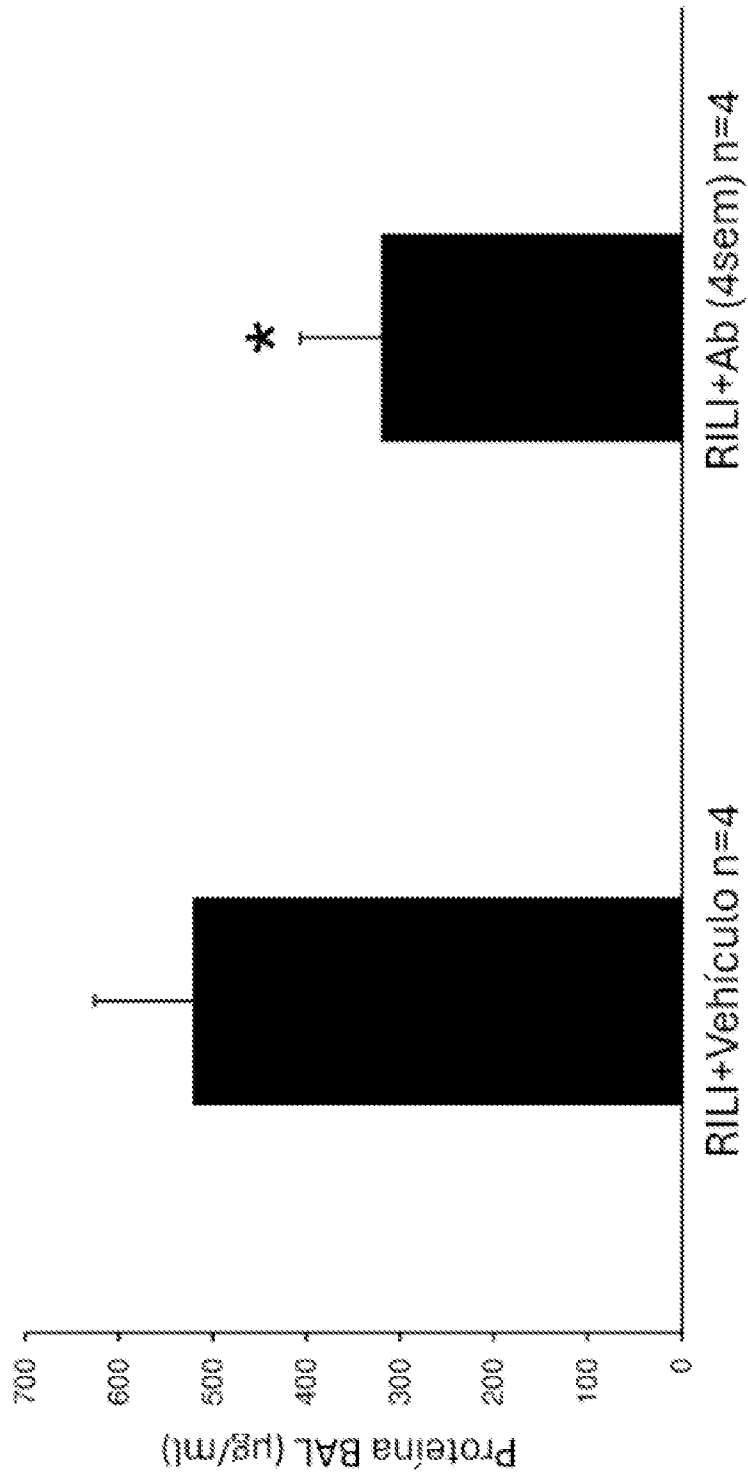


FIG. 9

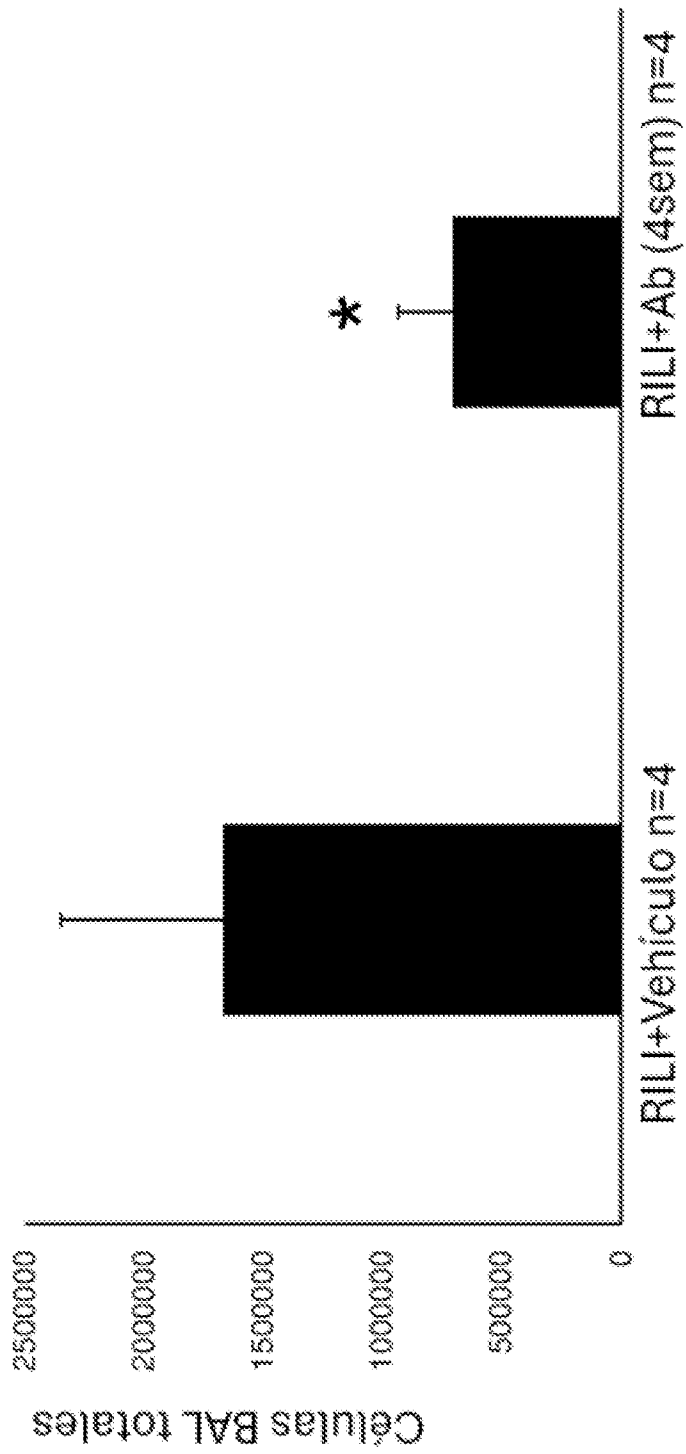


FIG. 10

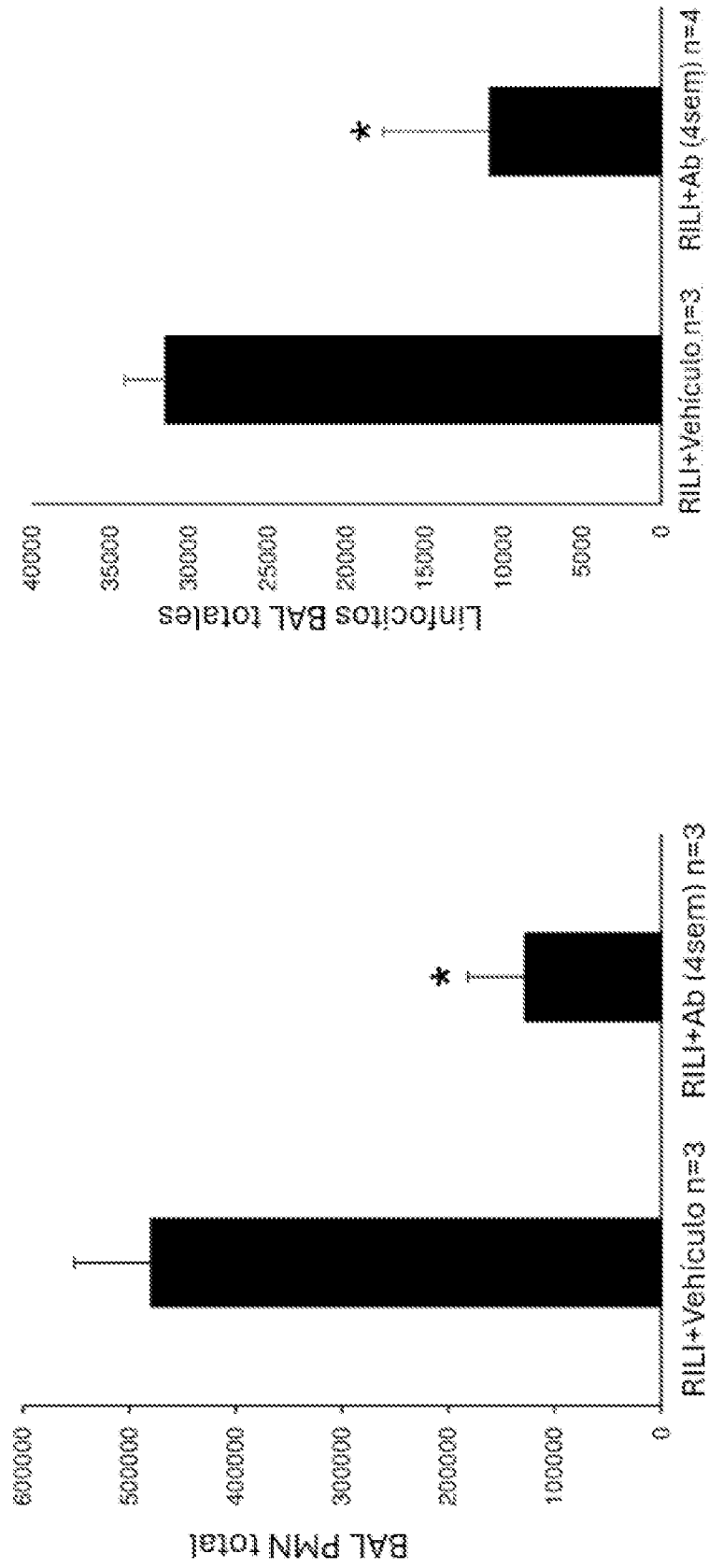


FIG. 11

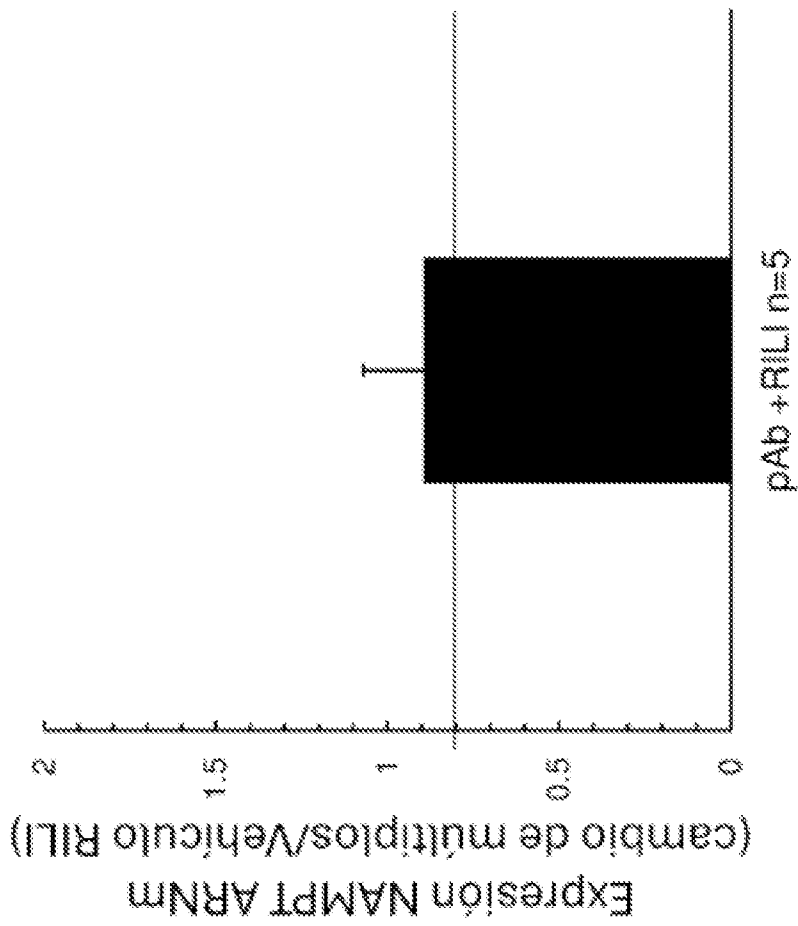


FIG. 12

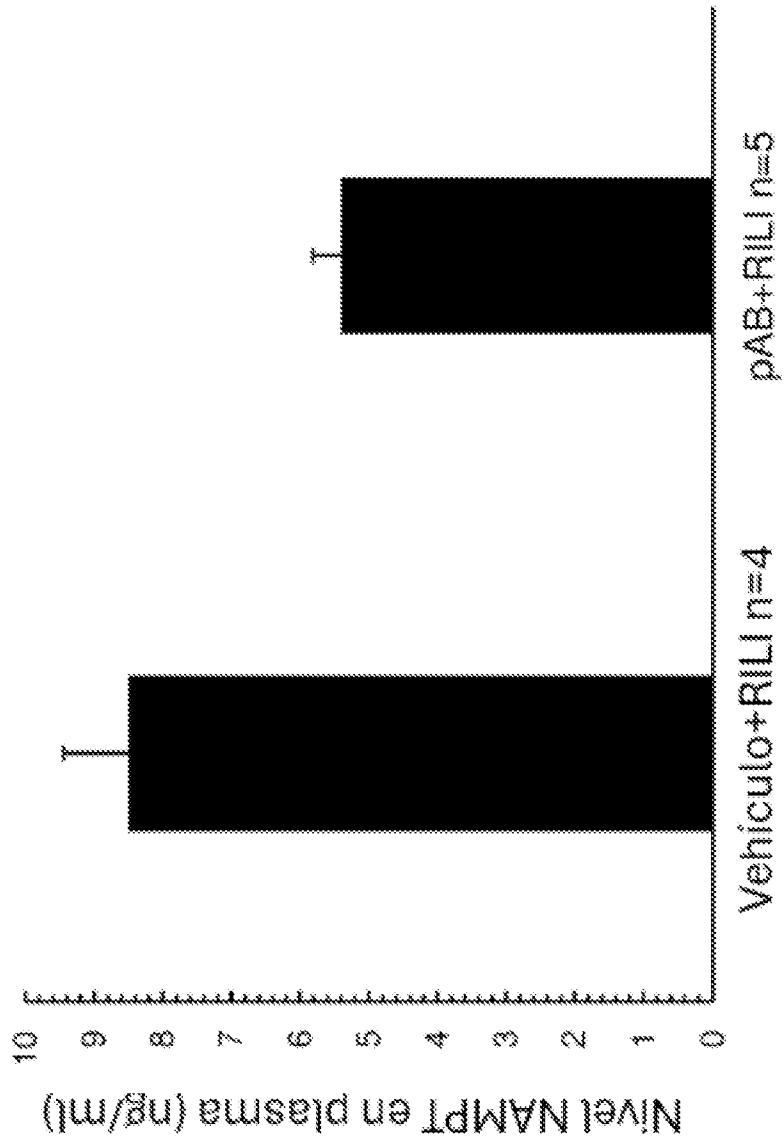


FIG. 13

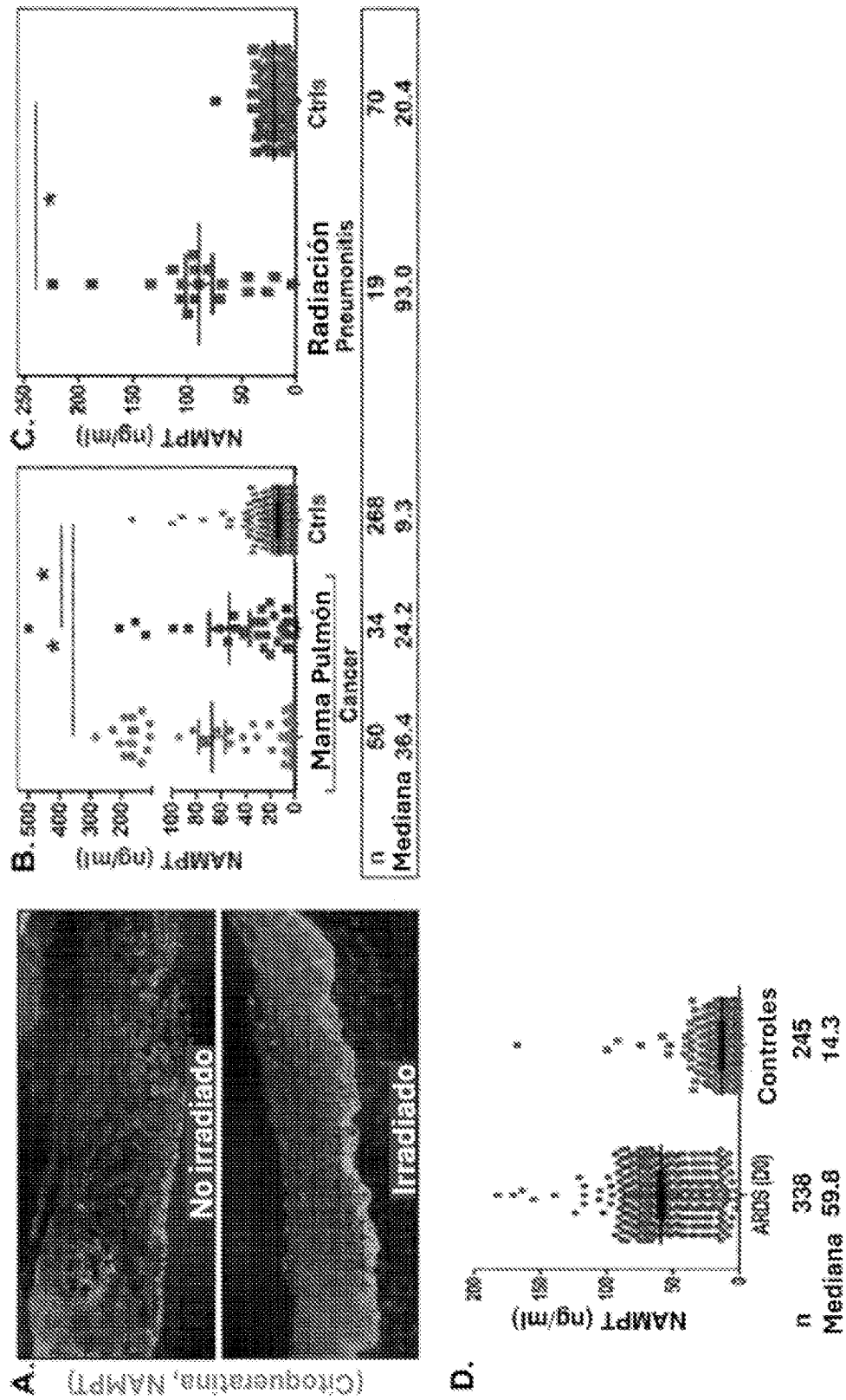


FIG. 14

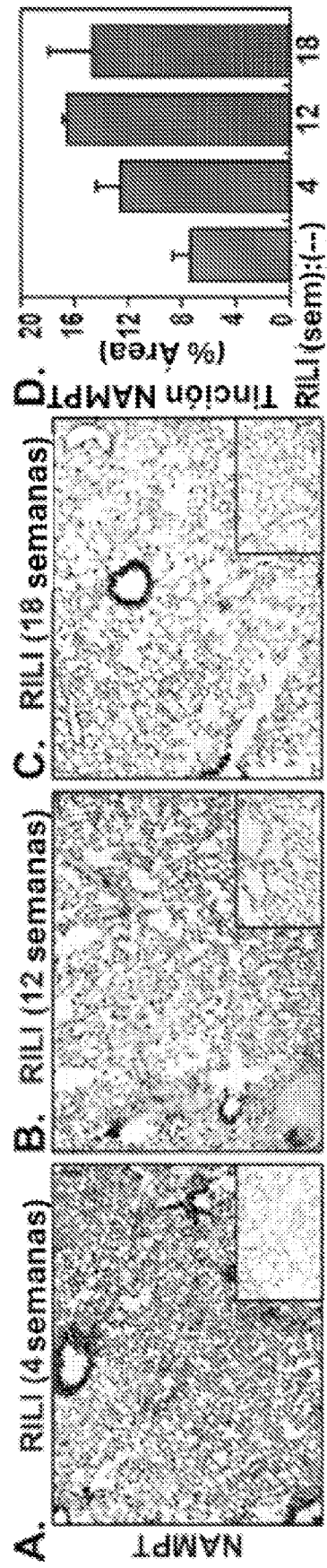


FIG. 15

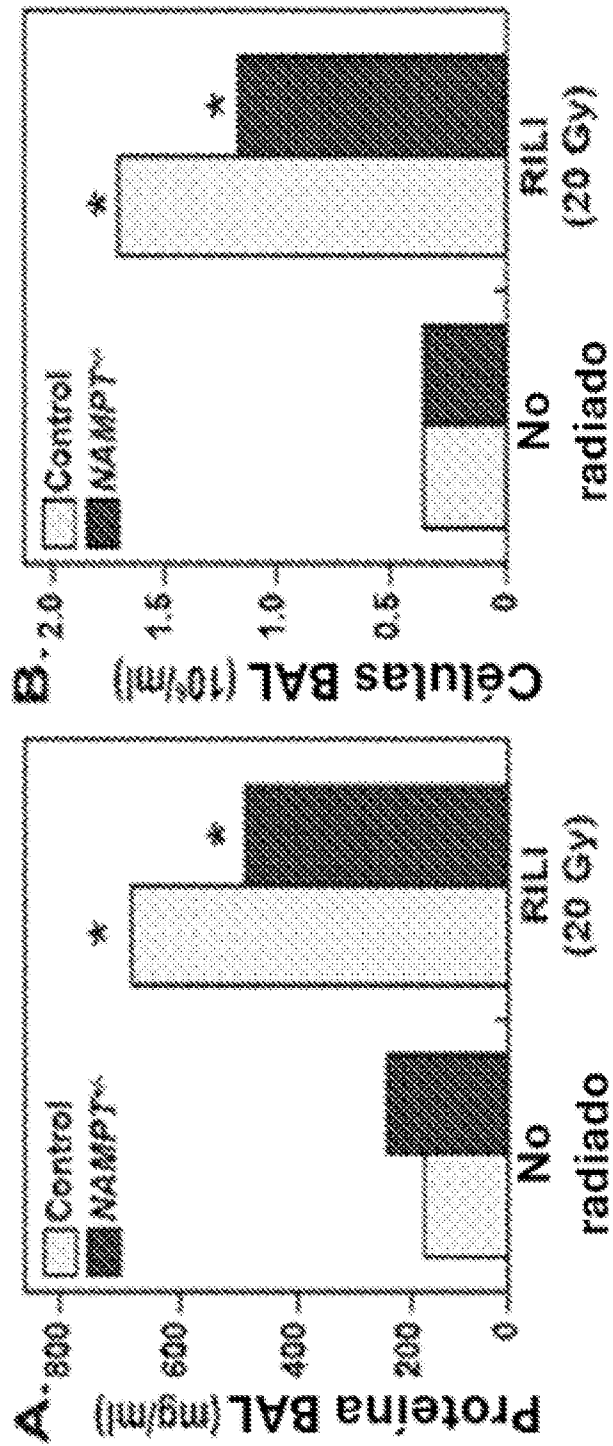


FIG. 16

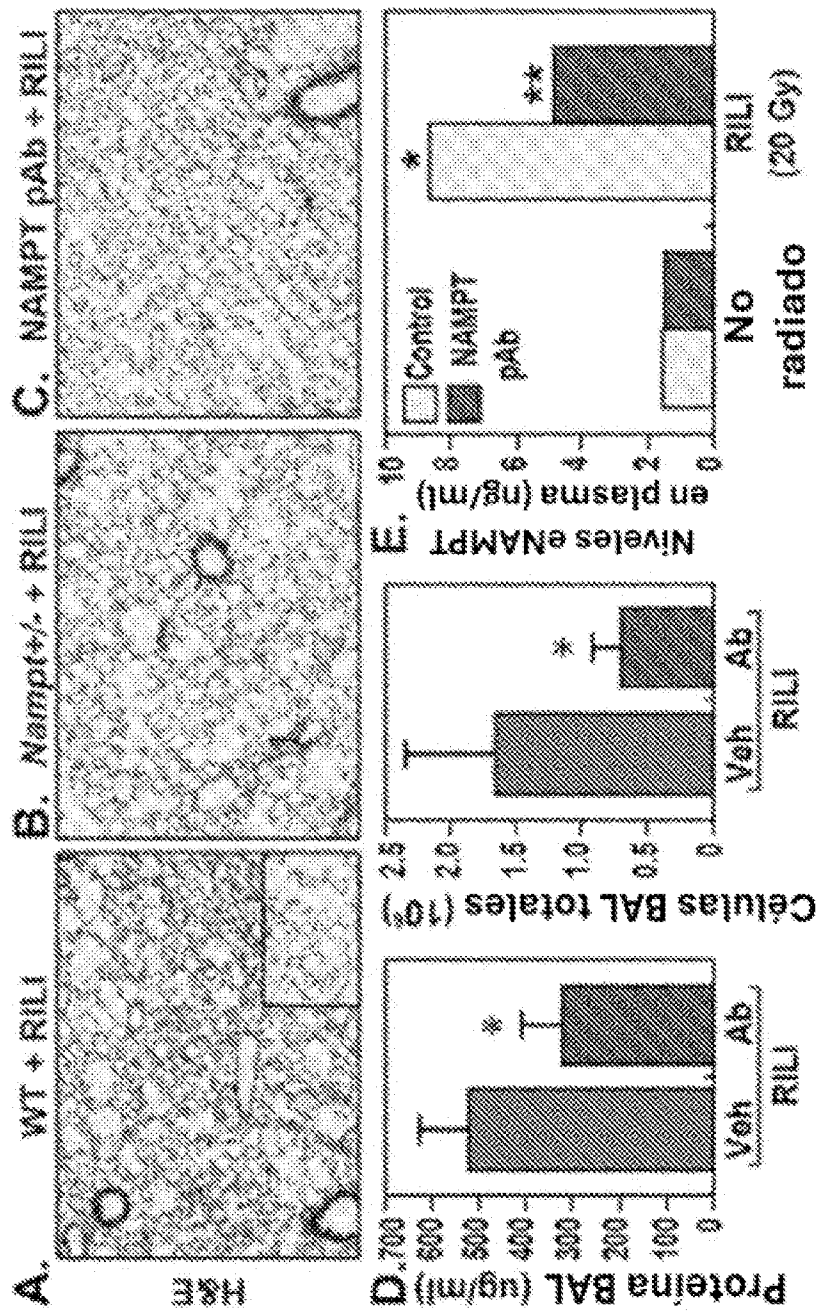


FIG. 17

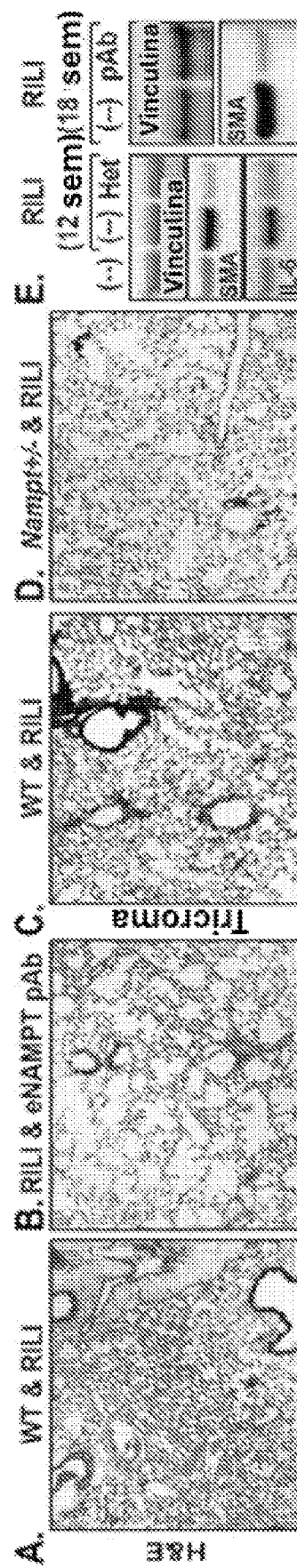


FIG. 18

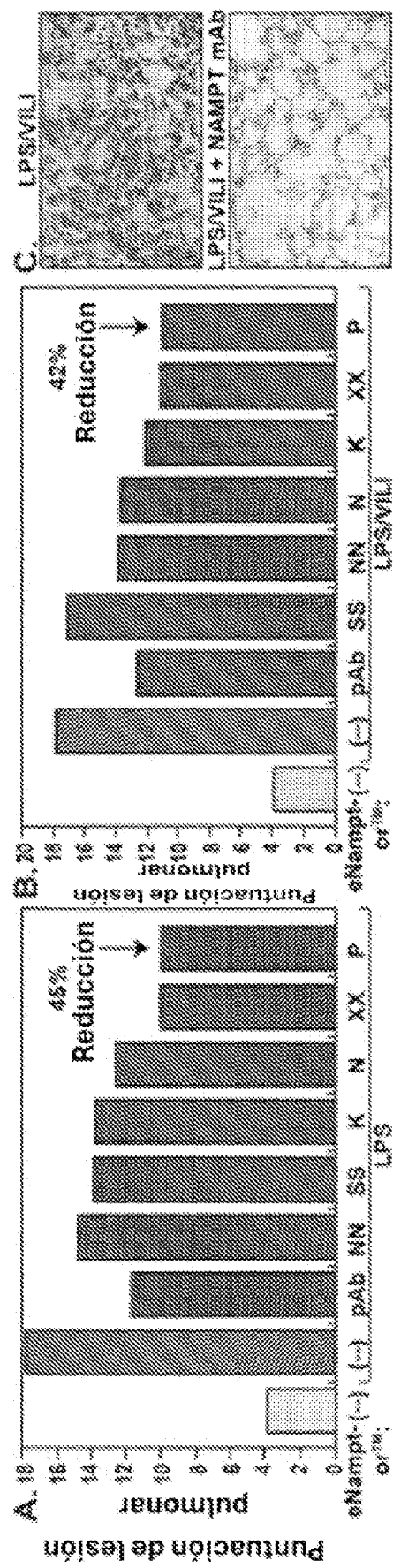


FIG. 19

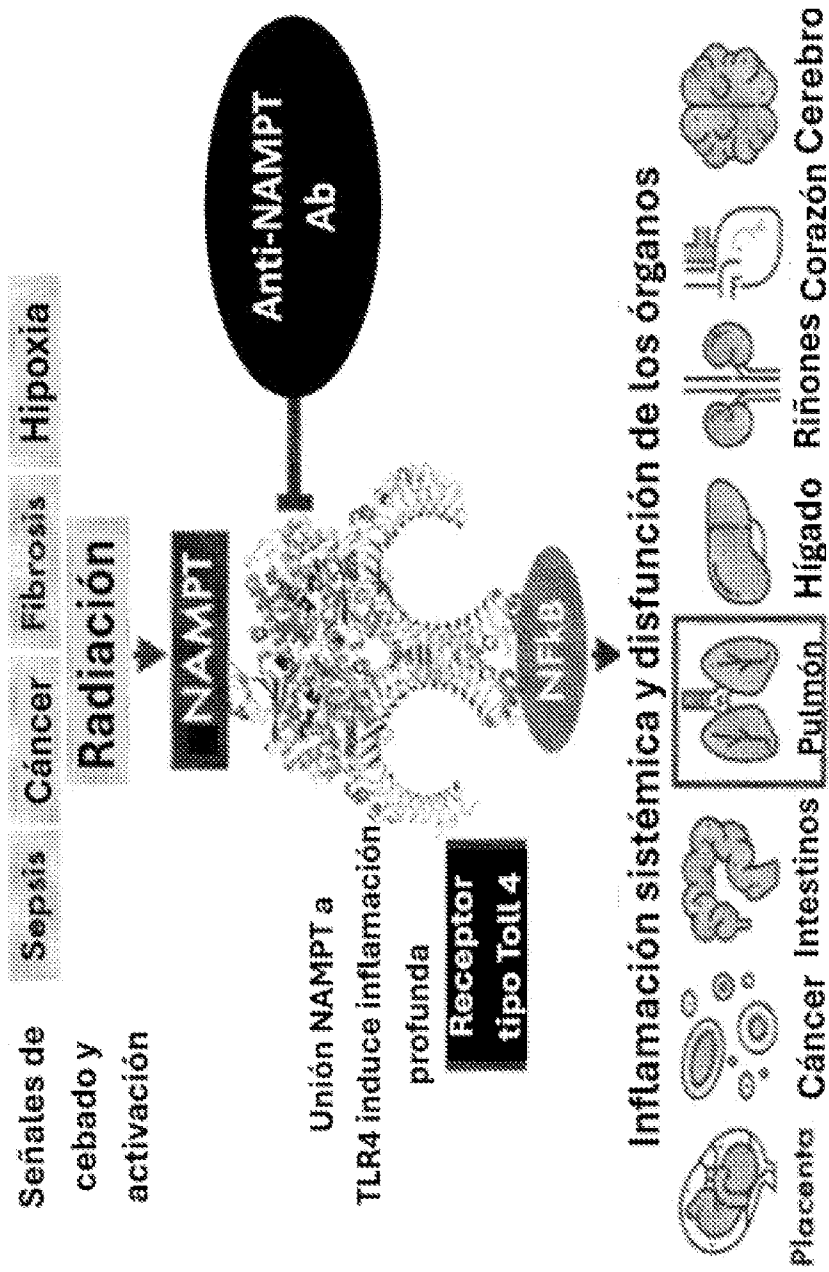


FIG. 20

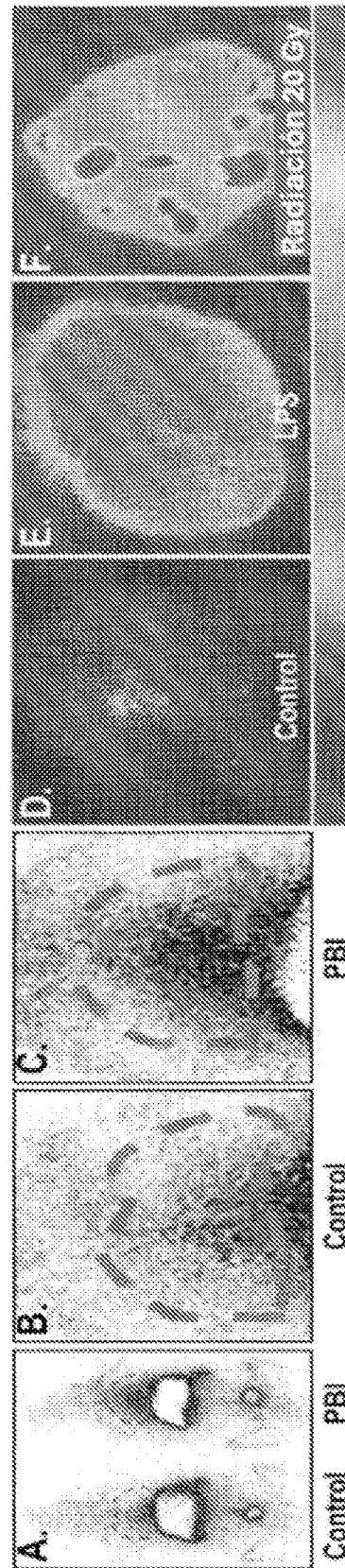


FIG. 21