



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 195**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01930916 .0**

86 Fecha de presentación : **25.04.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1297151**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54

Título: **Nuevas moléculas de proteína quinasa 14911 y usos de las mismas.**

30

Prioridad: **25.04.2000 US 199391 P**
15.06.2000 US 593927

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73

Titular/es: **Bayer HealthCare AG.**
51368 Leverkusen, DE

72

Inventor/es: **Meyers, Rachel y**
Hunter, John, Joseph

74

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 266 195 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

Nuevas moléculas de proteína quinasa 14911 y usos de las mismas.

5 Antecedentes de la invención

El fosfato asociado fuertemente con proteínas se conoce desde finales del siglo diecinueve. Desde entonces, se han descubierto diversos enlaces covalentes de fosfato a proteínas. El más común implica la esterificación del fosfato a serina, treonina y tirosina, con pequeñas cantidades unidas a lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, y cisteína. La producción de proteínas fosforiladas implica la existencia de una o más proteína quinasas capaces de fosforilar restos de aminoácidos en proteínas, y también de proteína fosfatasas capaces de hidrolizar restos de aminoácidos fosforilados en proteínas.

Las quinasas juegan un papel crítico en el mecanismo de transducción de señales intracelulares. Actúan sobre los hidroxiaminoácidos de proteínas diana para catalizar la transferencia de un grupo fosfato de alta energía de adenosín trifosfato (ATP). Este procedimiento se conoce como la fosforilación de proteínas. Junto con las fosfatasas, que retiran los fosfatos de las proteínas fosforiladas, las quinasas participan en la fosforilación reversible de proteínas. La fosforilación reversible actúa como la estrategia principal para regular la actividad de proteínas en las células eucariotas.

Las proteínas quinasas juegan papeles críticos en la regulación de los cambios bioquímicos y morfológicos asociados con la proliferación, diferenciación, crecimiento y división celular (D'Urso, G. y col. (1990) *Science* 250: 786-791; Birchmeier, C. y col. (1993) *Bioessays* 15: 185-189). Sirven como receptores del factor de crecimiento y transductores de señales y se han visto implicadas en la transformación celular y la formación de tumores (Hunter, T. y col. (1992) *Cell* 70: 375-387; Posada, J. y col. (1992) *Mol. Biol. Cell* 3: 583-592; Hunter, T. y col. (1994) *Cell* 79: 573-582). Por ejemplo, las proteína quinasas han demostrado participar en la transmisión de señales de los receptores del factor de crecimiento (Sturgill, T. W. y col. (1988) *Nature* 344: 715-718; Gomez, N. y col. (1991) *Nature* 353: 170-173), control de la entrada de las células en mitosis (Nurse, P. (1990) *Nature* 344: 503-508; Maller, J. L. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 269-275) y la regulación de la formación de haces de actina (Husain-Chishti, A. y col. (1988) *Nature* 334: 718-721).

Las quinasas varían ampliamente en su selectividad y especificidad para proteínas diana. Aun pueden, sin embargo, comprender la mayor superfamilia de enzimas conocida. Las proteínas quinasas pueden dividirse en dos grupos principales basados en la similitud de la secuencia de aminoácidos o en la especificidad para restos de serina/treonina o tirosina. Las quinasas específicas para serina/treonina se denominan a menudo STK mientras que las quinasas específicas para tirosina se denominan PTK. Una pequeña cantidad de quinasas de especificidad doble son estructuralmente similares al grupo específico de serina/treonina. Dentro de la amplia clasificación, las quinasas pueden sub-dividirse adicionalmente en familias cuyos miembros comparten un mayor grado de identidad de secuencia de aminoácidos del dominio catalítico y también tienen propiedades bioquímicas similares. La mayoría de los miembros de la familia de las proteína quinasas comparten también características estructurales fuera del dominio quinasa que reflejan sus papeles celulares particulares. Esto incluye dominios reguladores que controlan la actividad o interacción de la quinasa con otras proteínas (Hanks, S. K. y col. (1988) *Science* 241: 42-52).

Casi todas las quinasas contienen un dominio catalítico constituido por 250-300 aminoácidos conservados. Este dominio catalítico puede verse como constituido de 11 subdominios. Algunos de estos subdominios contienen aparentemente distintos motivos de aminoácidos que confieren especificidad como STK o PTK o ambas. Las quinasas pueden contener también secuencias de aminoácidos adicionales, normalmente entre 5 y 100 restos, flanqueando o dentro del dominio catalítico. Estos residuos actúan aparentemente para regular la actividad quinasa y para determinar la especificidad por un sustrato. (Revisado en Hardie, G. y Hanks, S. (1995) *The Protein Kinase Facts Book*, Vol I: 7-20 Academic Press, San Diego, Calif.).

Aproximadamente un tercio de los oncogenes conocidos codifican PTK. Las PTK pueden producirse como proteínas transmembrana o solubles. Las PTK transmembrana actúan como receptores para muchos factores de crecimiento. La interacción de un factor de crecimiento con su receptor cognado inicia la fosforilación de restos específicos de tirosina en el propio receptor así como en ciertas proteínas mensajeras secundarias. Los factores de crecimiento que se ha descubierto se asocian con dichos receptores PTK incluyen factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento obtenido de las plaquetas, factor de crecimiento de los fibroblastos, factor de crecimiento de los hepatocitos, insulina y factores de crecimiento similares a insulina, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento vascular endotelial, y factor estimulante de la colonia de macrófagos.

Las PTK solubles interaccionan a menudo con el dominio citosólico de los receptores de la membrana plasmática. Los receptores que transmiten su señal a través de dichas PTK incluyen receptores de citoquina, de hormonas, y de linfocitos específicos para antígenos. Muchas PTK se identificaron como productos de oncogenes mediante la observación de que la activación de ya PTK no se sometía a controles celulares normales.

También, se observa a menudo actividad de fosforilación de tirosina aumentada en la transformación celular, o en la oncogénesis (Carbonneau, H. y Tonks, N.K. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:463-93). La regulación de PTK puede ser por lo tanto una estrategia importante en el control de algunos tipos de cáncer.

Una quinasa serina/treonina humana, AJ250840 y una quinasa serina/treonina de un ratón común, AJ250839 se describen en Ruiz-Perez, V.L., y *col.* (2000) *Nature Genetics* 24, 283-286. La secuencia completa del clon CTC-255N20 del cromosoma 5 de *Homo sapiens*, se describe en la base de datos EMBL número de acceso AC011338. El documento WO01/55356 describe polipéptidos de quinasa, secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de quinasa, así como productos y procedimientos útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y afecciones relacionadas con quinasa.

La proliferación celular adicional sin regular es el sello del cáncer. Las quinastas juegan un papel en la transducción de señales para la proliferación, la diferenciación, y la apoptosis celular. Las alteraciones en dichos genes y en sus productos son comunes en cáncer humano, y varios proto-oncogenes clásicos son miembros de la familia de las quinastas.

Sumario de la invención

La presente invención, se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevas moléculas de ácido nucleico y proteínas codificadas por dichas moléculas de ácido nucleico, denominadas en este documento “quinastas” o por los nombres de clones individuales “14911”. La presente invención proporciona procedimientos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, incluyendo aunque sin limitación, cáncer de pulmón, de mama, de colon y de cerebro. Las moléculas de ácido nucleico y proteínas 14911 de la presente invención son útiles como agentes moduladores en la regulación de una diversidad de procesos celulares, por ejemplo, incluyendo la proliferación, la diferenciación, el crecimiento y la división celular. En particular; la quinasa y sus ácidos nucleicos relacionados serán ventajosos en la regulación de cualquier función, proliferación y diferenciación celular incontrolada, como en casos de cáncer. Por consiguiente, en un aspecto, esta invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican proteínas 14911 o partes biológicamente activas de las mismas, así como fragmentos de ácido nucleico adecuados como cebadores o sondas de hibridación para la detección de ácidos nucleicos que codifican 14911.

En otra realización preferida, una molécula aislada de ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de una 14911 humana. En otra realización preferida más, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. En otra realización preferida más, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

Otra realización de la invención presenta moléculas de ácido nucleico, preferiblemente moléculas de ácido nucleico 14911, que detectan específicamente moléculas de ácido nucleico 14911 en relación con moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas no de 14911. Por ejemplo, en una realización, dicha molécula de ácido nucleico es de al menos 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, u 800 nucleótidos de longitud e hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma.

En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico codifica una variante alélica de producción natural de un polipéptido que incluye la secuencia de la SEC ID N°: 2, donde la molécula de ácido nucleico hibrida con una molécula de ácido nucleico que incluye la SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 3, en condiciones rigurosas.

Otra realización de la invención, proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que es antisentido a la molécula de ácido nucleico 14911, por ejemplo, la cadena codificante de una molécula de ácido nucleico 14911.

Otro aspecto de la invención proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico 14911. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de expresión recombinante. En otra realización, la invención proporciona una célula huésped que contiene un vector de la invención. La invención también proporciona un procedimiento para producir una proteína, preferiblemente una proteína 14911, cultivando en un medio adecuado, una célula huésped, por ejemplo una célula huésped de mamífero tal como una célula huésped de mamífero no humano, de la invención que contiene un vector de expresión recombinante, de modo que se produzca la proteína.

Otro aspecto de esta invención presenta proteínas aisladas o recombinantes y polipéptidos 14911.

Las proteínas de la presente invención o partes biológicamente activas de las mismas, pueden unirse de forma operativa a un polipéptido no 14911 (por ejemplo secuencias de aminoácidos heterólogas) para formar proteínas de fusión. La invención presenta además anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales, que se unen específicamente a proteínas de la invención, preferiblemente proteínas 14911. Además, las proteínas 14911 o partes biológicamente activas de las mismas pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas, que incluyan opcionalmente vehículos farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico, proteína o polipéptido 14911 de una muestra biológica poniendo en contacto la muestra biológica con un agente capaz de detectar una molécula de ácido nucleico, proteína o polipéptido 14911, de modo que la presencia de una molécula de ácido nucleico, proteína o polipéptido 14911 se detecta en la muestra biológica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de actividad de 14911 en una muestra biológica poniendo en contacto la muestra biológica con un agente capaz de detectar un indicador de actividad de 14911, de modo que la presencia de actividad de 14911 se detecte en la muestra biológica.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para modular la actividad de 14911 que comprende el poner en contacto una célula capaz de expresar 14911 con un agente que modula la actividad de 14911 de modo que se modula la actividad de 14911 en las células. En una realización, el agente inhibe la actividad de 14911. En otra realización, el agente estimula la actividad de 14911. En una realización, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína 14911. En otra realización, el agente modula la expresión de 14911 modulando la transcripción de un gen 14911 o la traducción de un ARNm de 14911. En otra realización más, el agente es una molécula de ácido nucleico, que tiene una secuencia de nucleótidos que es antisentido a la cadena codificante de un ARNm de 14911 o un gen 14911.

15 En una realización, los procedimientos de la presente invención se usan para tratar a un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por la expresión o la actividad aberrante de una proteína o un ácido nucleico 14911 administrando al sujeto un agente que es un modulador de 14911. En una realización, el modulador de 14911 es una proteína 14911. En otra realización, el modulador de 14911 es una molécula de ácido nucleico 14911. En otra realización más, el modulador de 14911 es un péptido, péptidomimético u otra pequeña molécula. En una realización preferida, el trastorno caracterizado por la expresión aberrante de la proteína o del ácido nucleico 14911 es un trastorno relacionado con el crecimiento celular.

25 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para modular la expresión o la actividad de polipéptidos o de ácido nucleicos 14911, usando los compuestos seleccionados descritos en este documento. Compuestos que modulan la expresión y/o actividad de los receptores se usan para el tratamiento y diagnóstico de trastornos relacionados con quinasas. Estos compuestos son útiles para el tratamiento de tumores tales como tumores de colon, de pulmón, de mama y de cerebro.

30 Los trastornos asociados con las siguientes células o tejidos, en los que se ha expresado 14911 como se muestra en la Figura 14 también se abarcan: médula espinal, corteza cerebral normal, hipotálamo cerebral, células gliales, glioblastoma cerebral, riñón, pulmón, células epiteliales y piel, entre otras. Otros trastornos son los caracterizados por la actividad o expresión aberrante de los polipéptidos o ácido nucleicos 14911, así como movilización aberrante o deficiente de una molécula intracelular que participa en la fosforilación; y/o modulación aberrante o deficiente de la función, supervivencia, morfología, proliferación y/o diferenciación de células o tejidos en los que se expresan las moléculas 14911.

35 La presente invención proporciona también un ensayo de diagnóstico para identificar la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por al menos una de (i) modificación o mutación aberrante de un gen que codifica una proteína 14911; (ii) regulación incorrecta del gen; y (iii) modificación post-traducciona aberrante de una proteína 14911, donde una forma de tipo silvestre del gen codifica una proteína con una actividad de 14911.

40 En otro aspecto la invención proporciona un procedimiento para identificar un compuesto que se une o modula la actividad de una proteína 14911, proporcionando una composición indicadora que comprende una proteína 14911 que tiene actividad 14911, poniendo en contacto la composición indicadora con un compuesto de ensayo, y determinando el efecto del compuesto de ensayo en la actividad 14911 en la composición indicadora para identificar un compuesto que modula la actividad de una proteína 14911.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

50 Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1a-b representan una secuencia de ADNc (SEC ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 2) de 14911 humana. La situación del marco de lectura abierto iniciado con metionina de 14911 (sin las regiones sin traducir 5' y 3') también se indica en la Figura (SEC ID N°: 3).

55 La Figura 2 representa un esquema de hidropatía de 14911 humana. Los restos relativamente hidrófobos se muestran por encima de la línea intermitente horizontal, y los restos relativamente hidrófilos están por debajo de la línea intermitente horizontal. Los restos de cisteína (cys) y los sitios de N-glucosilación (Ngly) se indican mediante líneas verticales cortas justo debajo del trazo de hidropatía. Se indican las cifras correspondientes a la secuencia de aminoácidos de 14911 humana. Los polipéptidos de la invención incluyen fragmentos que incluyen: todo o parte de una secuencia hidrófoba, por ejemplo una secuencia por encima de la línea intermitente, por ejemplo la secuencia de aproximadamente los aminoácidos 99 a 105, de aproximadamente 125 a 140 y de aproximadamente 200 a 215 de la SEC ID N°: 2; todo o parte de una secuencia hidrófila, por ejemplo una secuencia por debajo de la línea intermitente, por ejemplo, la secuencia de aproximadamente los aminoácidos 106 a 120, de aproximadamente 215 a 230 y de aproximadamente 320 a 340 de la SEC ID N°: 2; una secuencia que incluye un Cys, o un sitio de glucosilación.

La Figura 3 representa una alineación del dominio de la familia de la proteína quinasa eucariota de 14911 humana con una secuencia de aminoácidos de consenso obtenida de un modelo escondido de Markov (HMM) de PFAM.

La secuencia superior es la secuencia de aminoácidos de consenso (SEC ID N°: 6) mientras que la secuencia de aminoácidos inferior corresponde a los aminoácidos 23 a 281 de la SEC ID N°: 2.

La Figura 4 representa una alineación del dominio C terminal de la proteína quinasa de 14911 humana con una secuencia de aminoácidos de consenso obtenida de un modelo escondido de Markov (HMM) de PFAM. La secuencia superior es la secuencia de aminoácidos de consenso (SEC ID N°: 7), mientras que la secuencia de aminoácidos inferior corresponde a los aminoácidos 282 a 301 de la SEC ID N°: 2.

Las Figuras 5a-d representan una alineación BLAST de 14911 humana con una secuencia de aminoácidos de consenso obtenida de un Predominio ("Proteína quinasa transferasa de ATP-de unión a seria/treonina-tirosina receptora de la fosforilación de proteínas-proteína precursora transmembrana" (Publicado 1999.2; véase también ProDomain publicado 2000.1; <http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>). La secuencia de aminoácidos inferior son los restos de aminoácidos 34 a 410 de la secuencia de aminoácidos de consenso (SEC ID N°: 8-11), mientras que la secuencia de aminoácidos superior corresponde al dominio "Proteína quinasa transferasa de ATP-de unión a seria/treonina-tirosina receptora de la fosforilación de proteínas-proteína precursora transmembrana" de 14911 humana, restos de aminoácidos 23 a 312 de la SEC ID N°: 2. El algoritmo BLAST identifica múltiples alineaciones locales entre la secuencia de aminoácidos de consenso y la 14911 humana. La Figura 5A representa una primera alineación local, la Figura 5B la segunda, la Figura 5C la tercera, y la Figura 5D la cuarta.

La Figura 6 es un panel de diagrama de barras del xenoinjerto pulmonar que representa la expresión del ARN de 14911 en relación con una plantilla de control, que muestra una expresión aumentada en 2/5 de las líneas celulares tumorales del pulmón en comparación con un epitelio normal de los bronquios humanos (NHBE) de control, cuya expresión se detectó usando un análisis Taq Man.

La Figura 7 es un panel de diagrama de barras de oncología que representa la expresión del ARN de 14911 en relación con ninguna plantilla de control, que muestra una expresión aumentada en 5/8 muestras de tumores pulmonares en comparación con tejido pulmonar normal, cuya expresión se detectó usando un análisis Taq Man.

La Figura 8 es un panel de diagrama de barras de oncología que representa la expresión de ARN de 14911 en relación con ninguna plantilla de control, que muestra una expresión aumentada en 2/5 de las muestras tumorales clínicas pulmonares, en comparación con un epitelio normal de los bronquios humanos (NHBE) de control, cuya expresión se detectó usando un análisis Taq Man.

La Figura 9 es un panel de diagrama de barras de oncología que representa la expresión de un ARN de 14911 en relación con ninguna plantilla de control, que muestra una expresión aumentada en diversas líneas celulares y tumorales pulmonares en comparación con un epitelio normal de los bronquios humanos (NHBE) de control, cuya expresión se detectó usando un análisis Taq Man.

La Figura 10 es un panel de diagrama de barras de oncología que representa la expresión de un ARN de 14911 en relación con ninguna plantilla de control, que muestra una expresión aumentada en 3/3 de las muestras de tumores de glioma en comparación con tejido cerebral normal, cuya expresión se detectó usando un análisis Taq Man.

La Figura 11 es un panel de diagrama de barras de oncología que representa la expresión de un ARN de 14911 en relación con ninguna plantilla de control, que muestra una expresión disminuida en 7/8 de muestras de tumores de mama en comparación con tejido de mama normal, cuya expresión se detectó usando un análisis Taq Man.

La Figura 12 es un panel de diagrama de barras de oncología que representa la expresión de un ARN de 14911 en relación con ninguna plantilla de control, que muestra una expresión aumentada en 3/6 muestras de tumor cerebral en comparación con tejido cerebral normal, y baja expresión en tumores de mama y en tejido de hígado fetal, cuya expresión se detectó usando un análisis Taq Man.

La Figura 13 es un panel de diagrama de barras de oncología que representa la expresión de un ARN de 14911 en relación con ninguna plantilla de control, que muestra una expresión aumentada en 2/3 de las muestras clínicas de metástasis de colon en comparación con tejido de colon normal, y alguna expresión en muestras de tumores clínicos de colon, cuya expresión se detectó usando un análisis Taq Man.

La Figura 14 es un panel de diagrama de barras de la Fase 1 que representa la expresión relativa de ARN de 14911 en relación con ninguna plantilla de control en un panel de tejidos o células humanas incluyendo, aunque sin limitación, corazón, cerebro, mama, ovario, páncreas, próstata, colon, riñón, hígado, hígado fetal, pulmón, bazo, nódulos linfáticos, epitelio, endotelio, fibroblastos, piel, tejido adiposo y células óseas (por ejemplo osteoclastos y osteoblastos), entre otros, detectados usando análisis Taq Man de RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevas moléculas, denominadas en este documento moléculas de ácido nucleico y polipéptidos "14911", que juegan un papel en o funcionan en la transducción de señales para la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. En una realización, las moléculas 14911 modulan la actividad de una o más proteínas implicadas en el crecimiento o diferenciación celular, por ejemplo, crecimiento o

diferenciación de células. En otra realización, las moléculas 14911 de la presente invención, son capaces de modular el estado de fosforilación de una molécula 14911 o una o más proteínas implicadas en el crecimiento o diferenciación celular.

5 Como se usa en este documento, la expresión “proteína quinasa” incluye una proteína o polipéptido que es capaz de modular su propio estado de fosforilación o el estado de fosforilación de otra proteína o polipéptido. Las proteínas quinasas pueden tener especificidad para (es decir, una especificidad para fosforilar) restos serina/treonina, restos tirosina, o tanto restos serina/treonina como restos tirosina, por ejemplo, las quinasas de especificidad doble. Como se denomina en este documento, las proteínas quinasa incluyen preferiblemente un dominio catalítico de aproximadamente 200-400 restos de aminoácidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 200-300 restos de aminoácidos de longitud, o más preferiblemente de aproximadamente 250-300 restos de aminoácidos de longitud, lo que incluye preferiblemente 5-20, más preferiblemente 5-15, o preferiblemente 11 motivos o subdominios altamente conservados, separados por secuencias de aminoácidos con conservación reducida o mínima. La especificidad de una proteína quinasa para la fosforilación de la tirosina o de la serina/treonina puede predecirse mediante la secuencia de 10 dos de sus subdominios (VIb y VIII), en los que se han conservado diferentes restos en cada clase (como se describe en, por ejemplo, Hanks y col. (1988) *Science* 241:42-52) cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia). Estos subdominios se describen también con más detalle en este documento.

Las proteínas quinasas juegan un papel en las vías de señalización asociadas con el crecimiento celular. Por ejemplo, las proteínas quinasas están implicadas en la regulación de transmisión de señales de receptores celulares, por ejemplo, receptores de factores de crecimiento. La entrada de las células en la mitosis; y la regulación del funcionamiento del citoesqueleto, por ejemplo, la formación de haces de actina. Por tanto, las moléculas 14911 de la presente invención pueden estar implicadas en: 1) la regulación de la transmisión de señales de receptores celulares, por ejemplo, receptores del factor de crecimiento; 2) la modulación de la entrada de las células en la mitosis; 3) la modulación de la diferenciación celular; 4) la modulación de la muerte celular; y 5) la modulación del funcionamiento del citoesqueleto. 25

Adicionalmente, y sin estar limitado por la teoría, se ha descubierto que las moléculas 14911 se sobre-expresan en las células tumorales, donde las moléculas pueden estar propagando de forma inapropiada sus señales de proliferación celular o supervivencia celular. De este modo, las moléculas 14911 pueden servir como identificadores específicos y nuevos de dichas células tumorales. Además, los inhibidores de las moléculas 14911 son también útiles para el tratamiento del cáncer, preferiblemente cáncer de pulmón, y útiles como diagnóstico. 30

La inhibición o la sobre-estimulación de la actividad de las proteínas quinasas implicadas en las vías de señalización asociadas con el crecimiento celular, puede conducir a un crecimiento celular perturbado, que puede a su vez conducir a trastornos relacionados con el crecimiento celular. Como se usa en este documento, un “trastorno relacionado con el crecimiento celular” incluye un trastorno, enfermedad, o afección, caracterizada por una desregulación, es decir, una regulación al alza, o una regulación a la baja, del crecimiento celular. La desregulación del crecimiento celular puede deberse a la desregulación de la proliferación celular, progresión del ciclo celular, diferenciación celular, y/o hipertrofia celular. 35 40

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevas moléculas denominadas en este documento proteínas y moléculas de ácido nucleico 14911, que comprenden una familia de moléculas que tienen ciertas características estructurales y funcionales conservadas. El término “familia”, cuando se refiere a las proteínas y moléculas de ácido nucleico de la invención, pretende significar dos o más proteínas o moléculas de ácido nucleico que tienen un dominio o motivo estructural común y que tienen una homología de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos suficiente como se define en este documento. Dichos miembros de la familia pueden producirse de forma natural o no natural, y pueden ser de la misma o de diferentes especies. Por ejemplo, una familia puede contener una primera proteína de origen humano, así como otras proteínas diferentes de origen humano o, como alternativa, 45 50 puede contener homólogos de origen no humano. Los miembros de una familia pueden tener también características funcionales comunes.

Una realización de la invención presenta moléculas de ácido nucleico 14911, preferiblemente moléculas 14911 humanas, por ejemplo, 14911. Las moléculas de ácido nucleico y proteína 14911 de la invención se describen con más detalle en las siguientes subsecciones. 55

Las moléculas de ácido nucleico y proteína 14911

La secuencia 14911 humana (Figura 1; SEC ID N°: 1), que es aproximadamente de 1281 nucleótidos de largo, incluyendo las regiones sin traducir, contiene una secuencia codificante predicha iniciada con metionina de aproximadamente 1191 nucleótidos, incluyendo el codón de terminación (nucleótidos indicados como la región codificante de la SEC ID N°: 1 en la Fig. 1; SEC ID N°: 3). La secuencia codificante codifica una proteína de 396 aminoácidos (SEC ID N°: 2). 60

La 14911 humana, contiene las siguientes regiones u otras características estructurales (para información acerca de los identificadores de PFAM, prefijo PS y prefijo del dominio PF, y números de identificación, dirigirse a Sonnhammer y col. (1997) Protein 28:405-420 y <http://www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html>): 65

ES 2 266 195 T3

un dominio de proteína quinasa eucariota (Número de acceso de PFAM PF00069) situado en aproximadamente los restos de aminoácido 23 a 281 de la SEC ID N°: 2;

5 un dominio C-terminal de proteína quinasa (Número de acceso de PFAM PF00433) situado en aproximadamente los restos de aminoácido 282 a 301 de la SEC ID N°: 2;

dos sitios de N-glucosilación (Prositate PS00001) de aproximadamente los aminoácidos 2 a 7 y 43 a 46 de la SEC ID N°: 2;

10 cinco sitios de de C fosforilación de proteína quinasa (Prositate PS00005) en aproximadamente los aminoácidos 5 a 7, 45 a 47, 122 a 124, 193 a 195, y 230 a 232 de la SEC ID N°: 2;

tres sitios de fosforilación de caseína quinasa II (Prositate PS00006) situados en aproximadamente los aminoácidos 89 a 92, 212 a 215 y 230 a 230 de la SEC ID N°: 2;

15 tres sitios de N-miristoilación (Prositate PS00008) de aproximadamente los aminoácidos 2 a 7, 197 a 202, y 391 a 396 de la SEC ID N°: 2;

20 un sitio de amidación (Prositate PS00009) de aproximadamente los aminoácidos 218 a 221 de la SEC ID N°: 2;

Una señal de la región de unión a ATP de la proteína quinasa (Prositate PS00107) de aproximadamente los aminoácidos 29 a 37 de la SEC ID N°: 2; y

25 un sitio señal de sitio activo de proteína quinasa de serina/treonina (Prositate PS00108) de aproximadamente los aminoácidos 142 a 154 de la SEC ID N°: 2.

Como se usa en este documento, la expresión “dominio quinasa” incluye una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 100 a 275 restos de aminoácidos de longitud y que tiene un valor de bit para la alineación de la secuencia al dominio quinasa (HMM) de al menos 100. Preferiblemente, un dominio quinasa media la transducción de señales intracelulares. Preferiblemente, un dominio quinasa incluye al menos aproximadamente 100 a 275 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 150 a 275 restos de aminoácidos, o aproximadamente 200 a 275 aminoácidos y tiene un valor de bit para la alineación de la secuencia al dominio quinasa (HMM) de al menos 100, 150, 200, o mayor. Una alineación del dominio quinasa (aminoácidos 23 a 281 de la SEC ID N°: 2) de 14911 humana con una secuencia de aminoácidos de consenso (SEC ID N°: 2) obtenida de un modelo escondido de Markov se representa en la Figura 3. Al dominio “proteína quinasa” (HMM) se le ha asignado el Número de Acceso de PFAM PF00069 (<http://genome.wustl.edu/Pfam/.html>) y corresponde a aproximadamente los aminoácidos 23 a 281 de la SEC ID N°: 2.

40 En una realización preferida, un polipéptido o una proteína 14911 tiene un “dominio quinasa” o una región que incluye al menos aproximadamente 100 a 215, más preferiblemente aproximadamente 150 a 275 o 200 a 275 restos de aminoácidos y tiene al menos aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o 100% de homología con un “dominio quinasa”, por ejemplo el dominio quinasa de la 14911 humana (por ejemplo restos 23 a 281 de la SEC ID N°: 2).

45 Como se usa en este documento, la expresión “dominio quinasa C” incluye una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 5 a 20 restos de aminoácidos de longitud y que tiene un valor de bit para la alineación de la secuencia al dominio quinasa (HMM) de al menos 4. Preferiblemente, un dominio quinasa C media la transducción de señales intracelulares. Preferiblemente un dominio quinasa C incluye al menos aproximadamente 5 a 20 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 10 a 20 restos de aminoácidos o de aproximadamente 15 a 20 aminoácidos y tiene un valor de bit para la alineación de las secuencias al dominio quinasa (HMM) de al menos 4, 6, 8 o mayor. Una alineación del dominio quinasa C (aminoácidos 282 a 301 de la SEC ID N°: 2) de 14911 humana, con una secuencia de aminoácidos de consenso (SEC ID N°: 2) obtenida de un modelo escondido de Markov se representa en la Figura 4. Al dominio “proteína quinasa C” (HMM) se le ha asignado el número de acceso de PFAM PF00443 (<http://genome.wustl.edu/Pfam/.html>) y se corresponde con aproximadamente los aminoácidos 281 a 301 de la SEC ID N°: 2.

50 En una realización preferida, un polipéptido o proteína 14911, tiene un “dominio quinasa C” o una región que incluya al menos 5 a 20, más preferiblemente aproximadamente 10 a 20 o 15 a 20 restos de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o 100% de homología con un “dominio quinasa C”, por ejemplo el dominio quinasa de la 14911 humana (por ejemplo restos 282 a 301 de la SEC ID N°: 2).

65 Para identificar la presencia de un dominio “quinasa” o “quinasa C” en una secuencia de proteínas 14911, y determinar que un polipéptido o proteína de interés tiene un perfil particular, se puede explorar la secuencia de aminoácidos de la proteína en la base de datos Pfam de los HMM (por ejemplo la base de datos Pfam, publicación 2.1) usando los parámetros por defecto (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/HMM_search). Por ejemplo, el programa hmmsf, que se encuentra disponible como parte del paquete HMMER de programas de búsqueda, es un programa específico para familia por defecto por MILPAT0063 y un valor de 15 es el valor umbral por defecto para determinar un acierto. Como alternativa, el valor umbral por defecto para determinar un acierto, puede reducirse (por ejemplo a 8 bits). Una

descripción de la base de datos Pfam puede encontrarse en Sonhammer y col. (1997) *Proteins* 28:405-420 y una descripción detallada de HMM puede encontrarse, por ejemplo en Gribskov y col (1990) *Meth. Enzymol.* 183:146-159; Gribskov y col. (1987) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84:4355-4358; Krogh y col. (1994) *J. Mol. Biol.* 235:1501-1531; y Stultz y col. (1993) *Protein Sci.* 2:305-314, cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia. Se realizó una búsqueda en la base de datos HMM dando como resultado la identificación de un “dominio quinasa” y un “dominio quinasa C” en la secuencia de aminoácidos de 14911 humana en aproximadamente los restos 23 a 281 de la SEC ID N°: 2 (véase la Figura 1) y un “dominio quinasa C” en aproximadamente los restos 282 a 301 de la SEC ID N°: 2.

Para identificar la presencia de un dominio “quinasa” en una secuencia de proteínas 14911, y determinar que un polipéptido o proteína de interés tiene un perfil particular, puede explorarse la secuencia de aminoácidos de la proteína en una base de datos de dominios, por ejemplo, la base de datos ProDom (Corper y col. (1999), *Nucl. Acids Res.* 27:263-267). La base de datos de dominios de proteínas ProDom está constituida de una recopilación automática de dominios homólogos. Las versiones actuales de ProDom se construye usando búsquedas recursivas de PSI-BLAST (Altschul SF y col. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Gouzy y col (1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340) de las bases de datos de proteínas SWISS-PROT 38 Y TREMBL. La base de datos genera automáticamente una secuencia de consenso para cada dominio. Se realizó una búsqueda BLAST en la base de datos HMM dando como resultado la identificación de un dominio “quinasa” en la secuencia de aminoácidos de 14911 humana en aproximadamente los restos 172 a 312, 126 a 159, 23 a 71 y 250 a 180 de la SEC ID N°: 2 (véase la Figura 1).

El dominio quinasa es homólogo a la familia de ProDom “Proteína quinasa transferasa de ATP-de unión a serina/treonina-tirosina receptora de la fosforilación de proteínas-proteína precursora transmembrana” SEC ID N°: 8 y 11 (ProDomain publicación 1999.2, <http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>). La secuencia consenso para la SEC ID N°: 8 es idéntica en un 29% en los aminoácidos 172 a 312 de la SEC ID N°: 2, como se muestra en la Figura 5a, y la secuencia de consenso para la SEC ID N°: 9 es idéntica en el 44% en los aminoácidos 126 a 159 de la SEC ID N°: 2, como se muestra en la Figura 5b. La secuencia de consenso para SEC ID N°: 10 es idéntica en un 33% en los aminoácidos 23 a 71 de la SEC ID N°: 2, como se muestra en la Figura 5c, y la secuencia de consenso para la SEC ID N°: 11 es idéntica en un 35% en los aminoácidos 250 a 280 de la SEC ID N°: 2, como se muestra en la Figura 5d.

En otra realización, las proteínas aisladas de la presente invención, preferiblemente proteínas 14911, se identifican en base a la presencia de al menos un sitio de quinasa Ser/Thr y al menos una región de unión ATP.

Como se usa en este documento, la expresión “sitio quinasa Ser/Thr” incluye una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 200-400 restos de aminoácidos de longitud, preferiblemente 200-300 restos de aminoácidos de longitud, y más preferiblemente 250-300 restos de aminoácidos de longitud, que se conserva en quinasas con restos de serina y treonina fosforilados y se encuentra en el dominio catalítico de las quinasas Ser/Thr. Preferiblemente, el sitio quinasa Ser/Thr incluye la siguiente secuencia de aminoácidos de consenso X₉-g-X-G-X₄-V-X₁₂-K-X₍₁₀₋₁₉₎-E-X₆₆-h-X₈-h-r-D-X-K-X₂-N-X₁₇-K-X₂-D-f-g-X₂₁-p-X₁₃-w-X₃-g-X₅₅-R-X₁₄-h-X₃ (SEC ID N°: 4) (donde los residuos invariables se indican mediante letras mayúsculas y los residuos casi invariables se indican mediante letras minúsculas). Los restos casi invariables se encuentran normalmente en la mayoría de los sitios quinasa Ser/Thr, pero puede sustituirse por otros aminoácidos que, preferiblemente, tengan características similares. Por ejemplo, un aminoácido hidrófobo casi invariable en la secuencia de aminoácidos de consenso anterior, podría sustituirse más probablemente por otro aminoácido hidrófobo. Los dominios de quinasa Ser/Thr se describen en, por ejemplo, Levin D.E. y col. (1990) *Proc. Nad. Acad. Sci. USA* 87:8272-76, cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia.

Como se usa en este documento, la expresión “región de unión a ATP” incluye una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 20-40, preferiblemente 20-30, y más preferiblemente 25-30 restos de aminoácidos de longitud, presente en enzimas que activan sus sustratos mediante fosforilación, e implicada en la unión de adenosín trifosfato (ATP). Las regiones de unión a ATP, preferiblemente incluyen la siguiente secuencia de aminoácidos de consenso, G-X-G-X-X-G-X(15-23)-K (SEC ID N°: 5). Las regiones-ATP se describen en, por ejemplo, Samuel K.P. y col. (1987) *FEBS Let.* 218(1): 81-86, cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia. Los restos de aminoácidos 31 a 39 comprenden una región de unión a ATP. Los restos de aminoácidos 144-156 de la proteína 14911 comprenden un dominio de quinasa Ser/Thr.

El ácido nucleico codifica un polipéptido con similitudes a quinasas Ser/Thr conocidas. Por tanto, el polipéptido codificado por 14911 se espera que sea una quinasa y funcione en la fosforilación de sustratos de proteína. Además, los ácido nucleicos de 14911 pueden usarse en exploraciones y ensayos conocidos o nuevos para ácido nucleicos que codifican quinasa para diferenciarlos de otros ácido nucleico diferentes. Como alternativa, las secuencias de ácido nucleico pueden usarse en la preparación de árboles filogenéticos y en relaciones entre organismos.

Como se usa de forma intercambiable en este documento, una “actividad de 14911” “actividad biológica de 14911” o “actividad funcional de 14911” se refiere a una actividad ejercida por una proteína, un polipéptido o un ácido nucleico 14911 o una célula sensible a 14911, o una proteína sustrato de 14911, como se determina *in vivo* o *in vitro*, de acuerdo con las técnicas convencionales. La actividad biológica de 14911 se describe en este documento.

Por consiguiente, otra realización de la invención presenta proteínas 14911 aisladas y polipéptidos que tienen una actividad de 14911. Las proteínas preferidas son proteínas 14911 que tienen al menos una quinasa Ser/Thr y al menos

una región de unión a ATP. Proteínas preferidas adicionales tienen al menos un sitio quinasa Ser/Thr, al menos una región de unión a ATP, y preferiblemente una actividad de 14911. Proteínas preferidas adicionales, tienen al menos un sitio quinasa Ser/Thr, al menos una región de unión a ATP, y son, preferiblemente, codificadas por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 o de la SEC ID N°: 3.

Por tanto, las moléculas 14911 pueden actuar como nuevas dianas de diagnóstico y agentes terapéuticos para controlar uno o más trastornos. Ejemplos de dichos trastornos, por ejemplo trastornos asociados con quinasa u otros asociados con 14911, incluyen, aunque sin limitación, trastornos de proliferación y/o diferenciación celular, trastornos asociados con el metabolismo óseo, trastornos inmunes, por ejemplo inflamatorios, trastornos cardiovasculares, incluyendo trastornos de las células endoteliales, trastornos del hígado, enfermedades víricas, trastornos del dolor o metabólicos.

Ejemplos de trastornos de la proliferación y/o diferenciación celular incluyen cáncer, por ejemplo carcinoma, sarcoma, trastornos metastásicos o trastornos hematopoyéticos neoplásicos, por ejemplo leucemias. Un tumor metastásico puede surgir de una multitud de tipos de tumores primarios, incluyendo aunque sin limitación los de origen de ovario, próstata, colon, pulmón, mama, e hígado.

Como se usa en este documento, el término “cáncer” (también se usa de forma intercambiable con los términos “hiperproliferativo” y “neoplásico”) se refiere a células que tienen la capacidad para crecer de forma autónoma, es decir, un estado o afección anormal caracterizado por la proliferación rápida del crecimiento celular. Los estados de enfermedad cancerosos pueden clasificarse como patológicos, es decir, que caracterizan o constituyen un estado de enfermedad, por ejemplo, crecimiento de un tumor maligno, o pueden clasificarse como no patológicos, es decir, una desviación de lo normal pero que no está asociada con un estado de enfermedad, por ejemplo, proliferación celular asociada con reparación de heridas. El término pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados de forma maligna, sin tener en cuenta, el tipo de histopatología o la etapa de invasividad. El término “cáncer” incluye tumores malignos de los diversos sistemas del organismo, tales como los que afectan al pulmón, mama, tiroides, linfoides, gastrointestinales, y del tracto genitourinario, así como adenocarcinomas, lo que incluye tumores malignos tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de las células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma macrocítico del pulmón, cáncer del intestino delgado y cáncer de esófago. El término “carcinoma” se reconoce en la técnica y se refiere a tumores malignos de tejidos epiteliales o endocrinos que incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas del sistema endocrino, y melanomas. Carcinomas ejemplares incluyen los que se forman de tejido de la corteza cerebral, del pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon y ovario. El término “carcinomas” también incluye carcinosarcomas, por ejemplo, que incluyen tumores malignos constituidos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Un “adenocarcinoma” se requiere a un carcinoma obtenido de tejido glandular o en el que las células del tumor forman estructuras glandulares reconocibles. El término “sarcoma” se reconoce en la técnica y se refiere a tumores malignos que se derivan del mesénquima.

Las moléculas 14911 de la invención pueden usarse para controlar, tratar y/o diagnosticar diversos trastornos proliferativos. Dichos trastornos incluyen trastornos hematopoyéticos neoplásicos, como se usa en este documento, la expresión “trastornos hematopoyéticos neoplásicos” incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, es decir, que surgen de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de las mismas. Preferiblemente, la enfermedad surge a partir de leucemias agudas poco diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Trastornos mieloides ejemplares adicionales incluyen, aunque sin limitación, leucemia promieloide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML) (revisado en Vaickus, L.(1991) Crit Rev. in Oncol./Hematol. 11:267-97); los tumores malignos linfoides, incluyen, aunque sin limitación, leucemia linfoblástica aguda (ALL) que incluye ALL de linaje B y ALL de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de las células capilares (HLL), y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Formas adicionales de linfomas malignos incluyen, aunque sin limitación, linfoma no Hodgkin y variantes del mismo, linfomas de las células T periféricas, leucemia/linfoma de las células T de adultos (ATL), linfoma de células T cutáneas (CTCL), leucemia linfocítica grande granular (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

La secuencia de nucleótidos del ADNc 14911 humano aislado y la secuencia de aminoácidos predicha del polipéptido 14911 humano se muestran en la Figura 1, y en la SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente. Un plásmido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica 14911 humana se depositó con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, el 7 de junio de 2001, y se le asignó el Número de Acceso PTA-3435. Este depósito se mantendrá en las condiciones del tratado de Budapest en el International Recognition of the Deposit of Microorganisms para los Fines del Procedimiento de Patentes. Este depósito se fabricó únicamente como una conveniencia para los especialistas en la técnica y no como una admisión de que se requiera un depósito en 35 U.S.C. § 112.

El gen 14911, que tiene aproximadamente 1281 nucleótidos de longitud, codifica una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 43,7 kD y que es aproximadamente de 396 restos de aminoácidos de longitud.

Diversos aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes subsecciones:

I. Moléculas aisladas de Ácido Nucleico

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican proteínas 14911 o partes biológicamente activas de las mismas, así como fragmentos de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar ácidos nucleicos que codifican 14911 (por ejemplo ARNm de 14911) y fragmentos para su uso como cebadores de PCR para la amplificación o mutación de moléculas de ácido nucleico 14911. Como se usa en este documento, la expresión “molécula de ácido nucleico” pretende incluir moléculas de ADN (ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo ARNm) y análogos de los ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una que se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Por ejemplo, en relación con el ADN genómico, el término “aislado” incluye moléculas de ácido nucleico que se separan del cromosoma en el que el ADN genómico se asocia de forma natural. Preferiblemente, un ácido nucleico “aislado” está libre de secuencias que flanquean de forma natural al ácido nucleico (es decir, secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico de los organismos de los que se obtiene el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula aislada del ácido nucleico 14911 puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se obtiene el ácido nucleico. Es más, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de ADNc, puede estar básicamente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de recombinación o, básicamente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, o una parte de las mismas, puede aislarse usando técnicas de biología molecular convencionales y la información de secuencia proporcionada en este documento. Por ejemplo, usando toda o parte de la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 1, o la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 3, como sonda de hibridación, pueden aislarse moléculas de ácido nucleico usando técnicas de hibridación y clonación convencionales (por ejemplo como se describe en Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Es más, una molécula de ácido nucleico que abarca toda o parte de la SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 3, puede aislarse por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores de oligonucleótidos sintéticos diseñados en base a la secuencia de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, respectivamente.

Un ácido nucleico de la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o, como alternativa, ADN genómico como plantilla, y cebadores de oligonucleótidos apropiados de acuerdo con las técnicas de amplificación por PCR convencionales. El ácido nucleico amplificado de este modo puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse mediante el análisis de la secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de nucleótidos de 14911 pueden prepararse mediante técnicas sintéticas convencionales, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automático.

En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1, la secuencia de la SEC ID N°: 1 corresponde al ADNc 14911 humano parcial. Este ADNc comprende secuencias que codifican la proteína parcial humana 14911 (es decir, “la región codificante”), como se muestra en la SEC ID N°: 2), así como secuencias 5' sin traducir (48 nucleótidos antes de la región codificante) y secuencias 3' sin traducir (42 nucleótidos después de la región codificante). Como alternativa, la molécula de ácido nucleico puede comprender solamente la región codificante de la SEC ID N°: 1 (por ejemplo que corresponde a la SEC ID N°: 3).

En otra realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, o una parte de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, respectivamente, de modo que pueda hibridar con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, respectivamente, formando de este modo un dúplex estable.

Es más, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender solamente una parte de la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, por ejemplo un fragmento que puede usarse como sonda o cebador o un fragmento que codifica una parte biológicamente activa de una proteína 14911. La secuencia de nucleótidos determinada por la clonación del gen 14911 permite la generación de sondas y cebadores diseñados para su uso en la identificación y/o clonación otros miembros de la familia 14911, así como homólogos de 14911 de otras especies.

La sonda/cebador comprende teóricamente oligonucleótidos básicamente purificados. El oligonucleótido comprende típicamente una región de secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con al menos 12 ó 15, preferiblemente aproximadamente 20 ó 25, más preferiblemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, ó 75 nucleótidos consecutivos de una secuencia sentido de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, o una secuencia antisentido de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, o una variante alélica o mutante que se produce de forma natural de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3. En una realización ejemplar, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que es de al menos 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, u 800 nucleótidos de longitud, e hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una molécula de ácido nucleico de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

Las sondas basadas en las secuencias de nucleótidos de 14911 pueden usarse para detectar transcripciones o secuencias genómicas que codifican la misma proteína o proteínas homólogas, en realizaciones preferidas, la sonda comprende además un grupo marca unido a la misma, por ejemplo el grupo marca puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor de una enzima. Dichas sondas pueden usarse como parte de un kit de ensayo de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan de forma errónea la proteína 14911, tales como midiendo un nivel de ácido nucleico que codifica 14911 en una muestra de células de un sujeto, por ejemplo detectando los niveles de ARNm de 14911 o determinando si un gen 14911 genómico se ha mutado o delecionado.

Un fragmento de ácido nucleico que codifica una “parte biológicamente activa de una proteína 14911” puede prepararse aislando una parte de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica de 14911 (las actividades biológicas de las proteínas 14911 se describen en este documento), que expresa la parte codificada de la proteína 14911 (por ejemplo, mediante expresión recombinante *in vitro*) y que evalúa la actividad de la parte codificada de la proteína 14911.

La invención abarca además, moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, debido a la degeneración del código genético y, por tanto, codifican las mismas proteínas 14911 que las codificadas por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3. En otra realización, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2.

Además de las secuencias de nucleótidos 14911 mostradas en la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, se entenderá, por los especialistas en la técnica, que los polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína 14911 pueden existir dentro de una población (por ejemplo, la población humana). Dichos polimorfismos genéticos en los genes 14911 pueden existir entre individuos dentro de una población debido a variación alélica natural. Como se usa en este documento, las expresiones “gen” y “gen recombinante” se refieren a moléculas de ácido nucleico que incluyen un marco de lectura abierto, que codifican una proteína 14911, preferiblemente una proteína 14911 de mamífero, y que pueden incluir además secuencias reguladoras no codificantes, e intrones. Dichas variaciones alélicas naturales, incluyen proteínas 14911 tanto funcionales como no funcionales, y pueden dar como resultado típicamente una variación del 1-5% en la secuencia de nucleótidos de un gen 14911. Todas y cada una de dichas variaciones de nucleótidos y los polimorfismo de aminoácidos resultantes en los genes 14911 que son el resultado de la variación alélica natural, y que no alteran la actividad funcional de una proteína 14911 se pretende que estén dentro del alcance de la invención.

Es más, las moléculas de ácido nucleico que codifican otros miembros de la familia 14911 y, por tanto, que tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias 14911 de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3, se pretende que estén dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, otro ADNc de 14911 puede identificarse en base a la secuencia de nucleótidos de la 14911 humana. Es más, las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas 14911 de diferentes especies y, por tanto, que tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia 14911 de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 se pretende que estén dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, un ADNc 14911 de ratón, puede identificarse en base a la secuencia de nucleótidos de una 14911 humana.

Las moléculas de ácido nucleico que corresponden a las variantes alélicas naturales y homólogas de los ADNc de 14911 de la invención pueden aislarse en base a su homología con los ácidos nucleicos 14911 descritos en este documento usando los ADNc descritos en este documento, o una parte de los mismos, como sondas de hibridación de acuerdo con las técnicas de hibridación convencionales en condiciones de hibridación rigurosas.

Por consiguiente, en otra realización, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención es de al menos de 15, 20, 25, 30 o más nucleótidos de longitud, e hibrida en condiciones rigurosas con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 3. En otra realización, el ácido nucleico es al menos de 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 nucleótidos de longitud. Como se usa en este documento, la expresión “que hibrida en condiciones rigurosas” pretende describir condiciones para hibridación y lavado en las que las secuencias de nucleótidos al menos el 30%, 50%, o 60% homólogas entre sí, permanecen típicamente hibridadas entre sí. Preferiblemente, las condiciones son tales que las secuencias al menos aproximadamente el 70%, más preferiblemente el menos el 80%, incluso más preferiblemente al menos el 85 o 90% homólogas entre si permanecen típicamente hibridadas entre si. Dichas condiciones rigurosas se conocen por los especialistas en la técnica, y pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley e hijos, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido no limitante de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en cloruro sódico/citrato sódico (SSC) X6 a aproximadamente 45°C, seguida de uno o más lavados en SSC X 0,2, SDS al

0,1% a 50-65°C. Preferiblemente, una molécula aislada de ácido nucleico de la invención, que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 corresponde a una molécula de ácido nucleico de producción natural. Como se usa en este documento, una molécula de ácido nucleico “de producción natural” se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se produce en la naturaleza (por ejemplo codifica una proteína natural).

Además de las variantes alélicas de producción natural, de las secuencias 14911 que pueden existir en la población, el especialista en la técnica, entenderá, que los cambios pueden introducirse mediante mutación en las secuencias de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, conduciendo de este modo a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas 14911 codificadas, sin alterar la capacidad funcional de las proteínas 14911. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos que conducen a las sustituciones de aminoácidos en restos de aminoácidos “no esenciales” pueden realizarse en la secuencia de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3. Un resto de aminoácido “no esencial” es un resto que puede alterarse de la secuencia de tipo silvestre de 14911 (por ejemplo la secuencia de la SEC ID N°: 2) sin alterar la actividad biológica, mientras que un resto de aminoácido “esencial” se requiere para la actividad biológica. Por ejemplo, los restos de aminoácidos que se conservan entre las proteínas 14911 de la presente invención, se prevé que no estén particularmente dispuestos a alteración. Además, los restos de aminoácidos adicionales que se conservan entre las proteínas 14911 de la presente invención y otros miembros de la familia 14911 es probable que no estén dispuestos a la alteración.

Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica una proteína 14911 homóloga a la proteína de la SEC ID N°: 2 puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, respectivamente, de modo que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos se introducen en la proteína codificada, las mutaciones pueden introducirse en la SEC ID N°: 1 mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis sitio-dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos conservativas se realizan en uno o más restos de aminoácidos predichos como no esenciales. Una “sustitución de aminoácidos conservativa” es una en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un resto de aminoácido predicho como no esencial en una proteína 14911 se sustituye preferiblemente por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Como alternativa, en otra realización, las mutaciones pueden introducirse al azar a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante de 14911, tales como por mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden seleccionarse para actividad biológica de 14911 para identificar mutantes que mantienen la actividad. Después de la mutagénesis de la SEC ID N°: 1, la proteína codificada puede expresarse de forma recombinante y la actividad de la proteína puede determinarse.

En una realización preferida, una proteína 14911 mutante pueden ensayarse para la capacidad de: 1) regular la transmisión de señales de receptores celulares, por ejemplo, receptores del factor de crecimiento celular; 2) controlar la entrada de las células en mitosis; 3) modular la diferenciación celular; 4) modular la muerte celular; o 5) regular la función del citoesqueleto.

Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas 14911 descritas anteriormente, otro aspecto de la invención se refiere a moléculas aisladas de ácido nucleico que son antisentido a las mismas. Un ácido nucleico “antisentido” comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico “sentido” que codifica una proteína, por ejemplo complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADNc de doble cadena o complementaria a una secuencia de ARNm. Por consiguiente, un ácido nucleico antisentido puede unirse por puentes de hidrógeno a un ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena codificante de 14911 completa, o solamente a una parte de la misma. En una realización, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido a una “región codificante” de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica 14911. La expresión “región codificante” se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en restos de aminoácidos (por ejemplo, la región codificante de la 14911 humana corresponde a la SEC ID N°: 3). En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido para una “región no codificante” de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica 14911. La expresión “región no codificante” se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que no se traducen en aminoácidos (es decir, también denominadas regiones sin traducir 5' y 3').

Dadas las secuencias de cadena codificante que codifican 14911 descritas en este documento (por ejemplo, SEC ID N°: 3), los ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden diseñarse de acuerdo con las reglas de Watson y Crick de emparejamiento de bases. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a la región codificante de ARNm 14911 completa, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido a solamente una parte de la región codificante o no codificante de ARNm de 14911. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región circundante al sitio de comienzo de la traducción del ARNm de 14911. Un oligonucleótido antisentido puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60 o 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico antisentido de la invención puede construirse usando reacciones de síntesis química y ligamiento enzimático usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico

antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos de producción natural, o nucleótidos modificados de diversas maneras, diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ejemplo, pueden usarse derivados de fosfotioato y nucleótidos sustituidos por acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar los ácidos nucleicos antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente usando un vector de expresión en el que se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, la transcripción de ARN del ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido a un ácido nucleico diana de interés, descrito adicionalmente en la siguiente subsección).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención se administran típicamente a un sujeto o se generan *in situ* de modo que hibriden con o se unan a ARNm celular y/o ADN genómico que codifican una proteína 14911 para inhibir de este modo la expresión de la proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser por complementariedad de nucleótidos convencional, para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a dúplex de ADN a través de interacciones específicas en el surco principal de la doble hélice. Un ejemplo de una vía de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención incluye la inyección directa en un sitio tisular. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico antisentido pueden modificarse para dirigirse a células seleccionadas y después administrarse sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido pueden modificarse de modo que se unan específicamente a receptores o a antígenos expresados en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, uniéndose las moléculas de ácido nucleico antisentido a péptidos o a anticuerpos que se unen a receptores de la superficie celular o a antígenos. Las moléculas de ácido nucleico antisentido también pueden suministrarse a células usando los vectores descritos en este documento. Para alcanzar concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren construcciones de vectores en las que la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor pol II o pol III fuerte.

En otra realización más, la molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una molécula de ácido nucleico α -anomérica. Una molécula de ácido nucleico α -anomérica forma híbridos específicos de doble cadena con ARN complementario en las que, contrariamente a las β -unidades normales, las cadenas corren paralelas entre sí (Gaultier y col. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede también comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue y col. (1987) *Nucleic Acids Res.* 35:6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue y col. (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

En otra realización más, un ácido nucleico antisentido de la invención es una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico de cadena sencilla, tal como un ARNm, para el que tienen una región complementaria. Por tanto, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) pueden usarse para escindir catalíticamente transcripciones de ARNm de 14911 para de este modo inhibir la traducción de ARNm 14911. Una ribozima que tiene especificidad para un ácido nucleico que codifica 14911 puede diseñarse en base a la secuencia de nucleótidos de un ADNc de 14911 descrito en este documento (es decir, SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3). Por ejemplo, puede construirse un derivado de un ARN de *Tetrahymena* L-19 IVS, en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo sea complementaria a la secuencia de nucleótidos a escindir en un ARNm que codifica 14911. Véase, por ejemplo, Cech y col. Patente de Estados Unidos N° 4.987.071; y Cech y col. Patente de Estados Unidos N° 5.116.742. Como alternativa, el ARNm de 14911 puede usarse para seleccionar un ARN catalítico que tiene una actividad ribonucleasa específica de una reserva de moléculas de ARN. Véase Bartel, D. y Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

Como alternativa, la expresión del gen 14911 puede inhibirse dirigiéndose a secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora de la 14911 (por ejemplo, el promotor y/o potenciadores de 14911) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción del gen 14911 en las células diana. Véase generalmente, Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene, C. y col. (1992) *Ann. NY Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher, L. J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-15.

En otra realización más, las moléculas de ácido nucleico 14911 de la presente invención pueden modificarse en los restos básicos, en los restos de azúcar o en la estructura de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación, o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la estructura de la desoxirribosa fosfato de las moléculas de ácido nucleico puede modificarse para generar ácidos nucleicos peptídicos (véase Hyrup B. y col. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4 (1): 5-23). Como se usa en este documento, las expresiones "ácidos nucleicos peptídicos" o "ANP" se refieren a ácidos nucleicos miméticos, por ejemplo, ADN miméticos, en los que la estructura de la desoxirribosa fosfato se sustituye por una estructura de pseudopéptido y sólo se mantienen las cuatro bases de nucleótidos naturales. La estructura neutral de ANP ha demostrado permitir la hibridación específica a ADN y ARN en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de ANP puede realizarse utilizando protocolos de síntesis peptídica de fase

sólida convencionales como se describe en Hyrup B. y col. (1996) *supra*; Perry-O'Keefe y col. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670-675.

Pueden usarse ANP de moléculas de ácido nucleico 14911 en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por ejemplo, pueden usarse ANP como agentes antisentido o antígenos para modulación específica de secuencia de la expresión génica induciendo, por ejemplo, la detección de la transcripción o la traducción o inhibiendo la replicación. Los ANP de moléculas de ácido nucleico 14911 pueden usarse también en el análisis de mutaciones de un único par de bases en un gen (por ejemplo, mediante fijación por PCR dirigida por ANP); como “enzimas de restricción artificiales” cuando se usan en combinación con otras enzimas (por ejemplo, S1 nucleasas (Hyrup B. (1996) *supra*)); o como sondas o cebadores para secuenciación o hibridación de ADN (Hyrup B. y col. (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *supra*).

En otra realización, los ANP de 14911 pueden modificarse (por ejemplo, para potenciar su estabilidad o captación celular) uniendo grupos lipófilos u otros grupos de ayuda a los ANP, mediante la formación de quimeras ANP-ADN, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de suministro de fármacos conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse quimeras ANP-ADN de moléculas de ácido nucleico 14911 que pueden combinar las propiedades ventajosas de ANP y ADN. Dichas quimeras permiten a las enzimas de reconocimiento de ADN (por ejemplo, ARNasa H y ADN polimerasas), interaccionar con la parte de ADN mientras que la parte de ANP podría proporcionar alta afinidad de unión y especificidad. Las quimeras ANP-ADN puede unirse usando enlazantes de longitudes apropiadas seleccionados en términos de apilamiento de bases, cantidad de enlaces entre las bases de nucleótidos y orientación (Hyrup B. (1996) *supra*). La síntesis de quimeras ANP-ADN puede realizarse como se describe en Hyrup B. (1996) *supra* y Finn P. J. y col. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(17): 3357-63. Por ejemplo, una cadena de ADN puede sintetizarse sobre un soporte sólido usando química de emparejamiento de fosforamidita convencional y análogos de nucleósidos modificados, por ejemplo, 5'-(4-memoxitritil)amino-5'-desoxi-timidina fosforamidita, puede usarse como un intermediario entre el ANP y el extremo 5' de ADN (Mag, M: y col. (1989) *Nucleic Acid Res.* 17: 5973-88). Los monómeros de ANP se acoplan después paso a paso para producir una molécula quimérica con un segmento 5' de ANP y un segmento 3' de ADN (Finn P.J. y col. (1996) *supra*). Como alternativa, las moléculas quiméricas pueden sintetizarse con un segmento 5' de ADN y un segmento 3' de ANP (Peterser, K.H. y col. (1975) *Bioorganic Med. Chan. Lett.* 5:1119-11124).

En otras realizaciones, el oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirse a receptores de células huésped en *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 86:6553-6556; Lemaitre y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; N° de Publicación de PCT W088/09810) o en la barrera sangre-cerebro (véase, por ejemplo, N° de Publicación de PCT W089/10134). Además, los oligonucleótidos pueden modificarse con agentes de escisión desencadenados por hibridación (véase, por ejemplo, Krol y col. (1988) *Bio-Techniques* 6:958-976) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon (1988) *Pharm. Res.* 5:539-549). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula (por ejemplo, un péptido, un agente reticulante desencadenado por hibridación, un agente de transporte, o un agente de escisión desencadenado por escisión).

40 II. Proteínas 14911 y anticuerpos anti-14911 aislados

Un aspecto de la invención se refiere a proteínas 14911 aisladas, y partes biológicamente activas de las mismas, así como a fragmentos de polipéptidos adecuados para uso como inmunógenos para inducir anticuerpos anti-14911. En una realización, las proteínas 14911 nativas pueden aislarse de fuentes celulares o tisulares mediante un programa de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. En otra realización, las proteínas 14911 se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Como alternativa a la expresión recombinante, una proteína 14911 o un polipéptido puede sintetizarse químicamente usando técnicas de síntesis peptídica convencionales.

Una proteína o parte biológicamente activa de la misma “aislada” o “purificada” está básicamente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido de la que la proteína 14911 se obtuvo, o básicamente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión “básicamente libre de material celular” incluye preparaciones de proteína 14911 en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. En una realización, la expresión “básicamente libre de material celular” incluye preparaciones de proteína 14911 que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de proteína no 14911 (también denominada en este documento “proteína contaminante”), más preferiblemente menos de aproximadamente el 20% de proteína no 14911, aún más preferiblemente menos de aproximadamente el 10% de proteína no 14911, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% de proteína no 14911. Cuando la proteína 14911 o parte biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, también está preferiblemente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, y lo más preferiblemente, menos de aproximadamente el 5% del volumen de la preparación de proteína.

La expresión “básicamente libre de precursores químicos u otros productos químicos” incluye preparaciones de proteína 14911 en las que la proteína se separa de precursores químicos u otros compuestos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En una realización, la expresión “básicamente libre de precursores químicos u otros productos químicos” incluye preparaciones de proteína 14911 que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de precursores químicos o productos químicos no 14911, más preferiblemente menos de aproximadamente el 20% de precursores químicos o productos químicos no 14911, aún más preferiblemente menos de aproximadamente

el 10% de precursores químicos o productos químicos no 14911, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% de precursores químicos o productos químicos no 14911.

Partes biológicamente activas de una proteína 14911 incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas a las obtenidas de la secuencia de aminoácidos de la proteína 14911, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, que incluye menos aminoácidos que las proteínas 14911 de longitud completa, y muestra al menos una actividad de una proteína 14911. Típicamente, las partes biológicamente activas comprenden un dominio u motivo con al menos una actividad de la proteína 14911. Una parte biológicamente activa de una proteína 14911 puede ser un polipéptido que es por ejemplo, de al menos 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud.

En una realización preferida, la proteína 14911 tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para fines de óptima comparación (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o en ambas de una primera y segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleicos para una alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden no tenerse en cuenta para fines de comparación). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines de comparación es al menos el 30%, preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, incluso más preferiblemente al menos el 60%, e incluso más preferiblemente al menos el 70%, 80 % ó 90% de la longitud de la secuencia de referencia (por ejemplo, cuando se alinea una segunda secuencia a la 14911, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 que tiene 396 restos de aminoácidos, al menos aproximadamente 119, preferiblemente al menos 158, más preferiblemente al menos 198, incluso más preferiblemente al menos 238, e incluso más preferiblemente al menos 277, 317, o 356 restos de aminoácidos se alinean). Los restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan entonces. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la porción correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esta posición (como se usa en este documento “identidad” de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a “homología” de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesita introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de huecos de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. En otra realización preferida más, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de huecos de 40, 50, 60, 70 u 80, y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6.

Las secuencias de ácido nucleico y proteína de la presente invención pueden usarse adicionalmente como una “secuencia interrogante” para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y *col.* (1990) *J. Mol Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos de BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, valor = 100, longitud de palabra = 12 para conseguir secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico 14911 de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, valor = 50, longitud de palabra = 3, para conseguir secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína 14911 de la invención. Para conseguir alineaciones huecas para fines de comparación, puede utilizarse el Gapped BLAST como se describe en Altschul y *col.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

La invención también proporciona proteínas quiméricas o de fusión 14911. Como se usa en este documento, una “proteína quimérica” o “proteína de fusión” 14911 comprende un polipéptido 14911 unido de forma operativa a un polipéptido no-14911. Un “polipéptido 14911” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a 14911, mientras que un “polipéptido no-14911” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína que no es básicamente homóloga a la proteína 14911, por ejemplo, una proteína que es diferente de la proteína 14911 y que se obtiene del mismo o de un organismo diferente. Dentro de una proteína de fusión 14911 el polipéptido 14911 puede corresponder a toda o a una parte de una proteína 14911. En una realización preferida, una proteína de fusión 14911 comprende al menos una parte biológicamente activa de una proteína 14911. En otra realización preferida, una proteína de fusión 14911 comprende al menos dos partes biológicamente activas de una proteína 14911. Dentro de la proteína de fusión, la expresión “unida de forma operativa” pretende indicar que el polipéptido 14911 y el polipéptido no-14911 se unen en marco entre sí. El polipéptido no-14911 puede unirse al extremo N o al extremo C del polipéptido 14911.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-14911, en la que las secuencias 14911 se fusionan al extremo C de las secuencias GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de un 14911 recombinante.

En otra realización, la proteína de fusión es una proteína 14911 que contiene una secuencia de señal heteróloga en su extremo N. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero) la expresión y/o la secreción de 14911 puede aumentar a través del uso de una secuencia de señal heteróloga.

5 Las proteínas de fusión 14911 de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas y administrarse a un sujeto *in vivo*. Las proteínas de fusión 14911 pueden usarse para afectar a la biodisponibilidad de un sustrato 14911. El uso de proteínas de fusión 14911 puede ser terapéuticamente útil para el tratamiento de trastornos relacionados con el crecimiento celular, por ejemplo, trastornos cardiovasculares. Además, las proteínas de fusión 14911 de la invención pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos anti-14911 en un sujeto, para purificar
10 ligandos de 14911 y en ensayos de exploración para identificar moléculas que inhiben la interacción de 14911 con un sustrato 14911.

Preferiblemente, una proteína quimérica o de fusión 14911 de la invención se produce mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan entre si en marco de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos
15 romos o escalonados para el ligamiento, la digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, rellenando los extremos cohesivos como fuera apropiado, el tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseables y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, se puede realizar amplificación por
20 PCR de fragmentos génicos usando cebadores ancla que dan origen a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden disponerse y reamplificarse posteriormente para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y col. John Wiley e hijos: 1992). Es más, están disponibles en el mercado muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica 14911 puede clonarse en dicho vector de expresión de modo que
25 el resto de fusión se una en marco a la proteína 14911.

La presente invención también se refiere a variantes de las proteínas 14911 con función como agonistas de 14911 (miméticos) o como antagonistas de 14911. Las variantes de las proteínas 14911 pueden generarse mediante mutagénesis, por ejemplo, mutación en un único punto, o truncamiento de una proteína 14911. Un agonista de las proteínas
30 14911 puede mantener básicamente la misma, o un subconjunto, de las actividades biológicas de la forma de la proteína 14911 obtenida de forma natural. Un antagonista de una proteína 14911 puede inhibir una o más de las actividades de la forma producida de forma natural de la proteína 14911 modulando, por ejemplo, de forma competitiva, una actividad del sistema cardiovascular de una proteína 14911. Por tanto, los efectos biológicos específicos pueden provocarse mediante un tratamiento con una variante de función limitada. En una realización, el tratamiento de un sujeto
35 con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma producida de forma natural de la proteína tiene menos efectos secundarios en un sujeto en relación al tratamiento con la forma de producción natural de la proteína 14911.

En una realización, las variantes de una proteína 14911 que funcionan como agonistas de 14911 (miméticos) o como antagonistas de 14911 respectivamente pueden identificarse explorando bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncamiento, de una proteína 14911 para actividad agonista o antagonista de proteína 14911. En una realización, una biblioteca variegada de variantes de 14911 se genera mediante mutagénesis combinatoria en el nivel de ácido nucleico, y se codifica mediante una biblioteca génica variegada. Una biblioteca variegada de
40 variantes de 14911 puede producirse ligando enzimáticamente por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de modo que un conjunto degenerado de secuencias 14911 potenciales es expresable como polipéptidos individuales o, como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (por ejemplo, para exposición en fagos) que contienen el conjunto de secuencias 14911 en su interior. Existen diversos procedimientos que pueden usarse para producir bibliotecas de variantes 14911 potenciales de una secuencia de nucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede realizarse en un sintetizador de ADN automático, y
45 el gen sintético se liga después en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias 14911 potenciales. Los procedimientos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura y col. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura y col. (1984) *Science* 198:1056; Ike y col. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477.
50
55

Además, las bibliotecas de fragmentos de una secuencia que codifica una proteína 14911 pueden usarse para generar una población variegada de fragmentos 14911 respectivamente para explorar y posteriormente seleccionar variantes de una proteína 14911. En una realización, una biblioteca de fragmentos de secuencia codificante puede generarse tratando un fragmento de PCR de doble cadena de una secuencia codificante de 14911 con una nucleasa
60 en condiciones donde el mellado se produce solamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de doble cadena, renaturalizando el ADN para formar ADN de doble cadena que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos mellados, retirando partes de cadena sencilla de dúplex reformados por tratamiento con nucleasa S1, y ligando la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este procedimiento, puede obtenerse una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales, C-terminales e internos de la proteína
65 14911 de diversos tamaños.

Se conocen varias técnicas en la técnica para explorar productos génicos de bibliotecas combinatorias fabricadas mediante mutaciones puntuales o truncamientos, y para explorar bibliotecas de ADNc para productos génicos que

tienen una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para exploración rápida de las bibliotecas génicas generadas mediante la mutagénesis combinatoria de proteínas 14911. Las técnicas más ampliamente usadas, que están disponibles para análisis de alta producción, para explorar grandes bibliotecas génicas, incluyen típicamente clonar la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores, y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gel cuyo producto se detectó. La mutagénesis de conjunto recursivo (REM), una nueva técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede usarse en combinación con los ensayos de exploración para identificar variantes de 14911 (Arkin y Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave y col. (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

En una realización, los ensayos basados en células pueden realizarse para analizar una biblioteca 14911 variegada. Por ejemplo, una biblioteca de vectores de expresión puede transfectarse en una línea celular que sintetice de forma ordinaria y secrete 14911. Las células transfectadas se cultivan después de modo que se secreten 14911 y un mutante particular de 14911 y el efecto de la expresión del mutante en la actividad 14911 en los sobrenadantes celulares pueda detectarse, por ejemplo, mediante cualquiera de varios ensayos enzimáticos. El ADN de los plásmidos puede recuperarse de las células que presentan un valor de inhibición, o como alternativa, actividad de potenciación de 14911, y los clones individuales caracterizarse adicionalmente.

Una proteína 14911 aislada, o una parte o fragmento de la misma puede usarse como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a 14911 usando técnicas convencionales para preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Puede usarse una proteína 14911 de longitud completa o, como alternativa, la invención proporciona fragmentos peptídicos antigénicos de 14911 para su uso como inmunógenos. El péptido antigénico de 14911 comprende al menos 8 restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2 y abarca un epítipo de 14911 de modo que un anticuerpo inducido contra el péptido forme un complejo inmune específico con 14911. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 restos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 15 restos de aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos 20 restos de aminoácidos, y lo más preferiblemente al menos 30 restos de aminoácidos.

Los epítopes preferidos abarcados por el péptido antigénico son regiones de 14911 que se sitúan en la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrófilas.

Un inmunógeno de 14911 se usa típicamente para preparar anticuerpos inmunizando un sujeto adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, proteína 14911 expresada de forma recombinante o un polipéptido de 14911 sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulante similar. La inmunización de un sujeto adecuado con una preparación inmunogénica de 14911 induce una respuesta de anticuerpo anti-14911 policlinal.

Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a anticuerpos anti-14911. El término “anticuerpo” como se usa en este documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno, tal como 14911. Ejemplos de partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina. La invención proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen a 14911. La expresión “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal”, como se usa en este documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solamente especies de un sitio de un antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular de 14911. Una composición de anticuerpo monoclonal, por tanto, muestra típicamente una única afinidad de unión para una proteína 14911 particular con la que inmunorreacciona.

Los anticuerpos anti-14911 policlonales pueden prepararse como se ha descrito anteriormente inmunizando a un sujeto adecuado con un inmunógeno 14911. El título de anticuerpos anti-14911 en el sujeto inmunizado puede controlarse en el tiempo mediante técnicas convencionales, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando 14911 inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra 14911 pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A para conseguir la fracción IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo anti-14911 son los más altos, las células que producen anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma, descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (véase también, Brown y col. (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown y col. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh y col. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; y Yeh y col. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la más reciente técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor y col (1983) *Immunol Today* 4:72), y la técnica de hibridoma EBV (Cole y col. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96) o técnicas de trimo. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales se conoce bien (véase, en general, R. H. Kenneth, en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Gelfer y col. (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). En resumen, una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) se fusiona a los linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno 14911 como se ha descrito anteriormente, y los sobrenadantes del

cultivo de las células de hibridoma resultantes se exploran para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a 14911.

Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas puede aplicarse para el fin de generar un anticuerpo anti-14911 monoclonal, (véase, por ejemplo, G. Galfre y col. (1977) *Nature* 266:55052; Gefter y col. *Somatic Cell Genet.*, cited *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, cited *supra*). Es más, el especialista en la técnica ordinario, entenderá que existen muchas variaciones de dichos procedimientos que también podrían ser útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) se obtiene de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, los hibridomas de ratón murino pueden fabricarse fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortales preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Cualquiera de varias líneas celulares de mieloma puede usarse como compañero de fusión de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles de ATCC. Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan a esplenocitos de ratón usando polietilenglicol ("PEG"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan usando medio HAT, que mata las células no fusionadas y fusionadas de forma no productiva (los esplenocitos sin fusionar mueren después de varios días porque no se transforman). Las células de hibridoma que producen anticuerpo monoclonal de la invención se detectan explorando los sobrenadantes del cultivo de hibridoma para anticuerpos que se unan a 14911, por ejemplo, usando un ensayo ELISA convencional.

Como alternativa a preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, un anticuerpo anti-14911 monoclonal puede identificarse y aislarse explorando una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo una biblioteca de exposición de fagos) con 14911 para de este modo aislar miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unan a 14911. Los kits para generar y explorar bibliotecas de fagos están disponibles en el mercado (por ejemplo, el the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, N° de Catálogo. 27-9400-01; y el Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, N° de Catálogo. 240612). Adicionalmente, ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente útiles para el uso en generar y explorar bibliotecas de exposición de anticuerpos pueden encontrarse en, por ejemplo, Ladner y col. Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Kang y col. Publicación internacional PCT N° WO 92/18619; Dower y col. Publicación Internacional PCT N° WO 91/17271; Winter y col. Publicación Internacional PCT N° WO 92/20791; Markland y col. Publicación Internacional PCT N° WO 92/15679; Breitling y col. Publicación Internacional PCT N° WO 93/01288; McCafferty y col. Publicación Internacional PCT N° WO 92/01047; Garrard y col. Publicación Internacional PCT N° WO 92/09690; Ladner y col. Publicación Internacional PCT N° WO 90/02809; Fuchs y col. (1991) *BioTechnology* 9:1370-1372; Hay y col. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse y col. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths y col. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins y col. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson y col. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard y col. (1991) *BioTechnology* 9:1373-1377; Hoogenboom y col. (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; y McCafferty y col. *Nature* (1990) 348:552-554.

Adicionalmente, anticuerpos anti-14911 recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto partes humanas como partes no humanas, que pueden fabricarse usando técnicas de ADN recombinante convencionales, están dentro del alcance de la invención. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo usando procedimientos descritos en Robinson y col. Solicitud Internacional N° PCT/US86/02269; Akira, y col. Solicitud de Patente Europea N° 184.187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171.496; Morrison y col. Solicitud de Patente Europea 173.494; Neuberger y col. Publicación Internacional PCT N° WO 86/01533; Cabilly y col. Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Cabilly y col. Solicitud de Patente Europea 125.023; Better y col. (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu y col. (1987) *Proc Natl Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu y col. (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura y col. (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood y col. (1985) *Nature* 314:446-449; y Shaw y col. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi y col. (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter Patente de Estados Unidos N° 5.225.539; Jones y col. (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan y col. (1988) *Science* 239:1534; y Beidler y col. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Un anticuerpo anti-14911 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) puede usarse para aislar 14911 mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-14911 puede facilitar la purificación de 14911 natural a partir de células y de 14911 producido de forma recombinante expresado en células huésped. Es más, un anticuerpo anti-14911 puede usarse para detectar la proteína 14911 (por ejemplo en un lisado celular o sobrenadante de células) para evaluar la abundancia y el patrón de expresión de la proteína 14911. Los anticuerpos anti-14911 pueden usarse a modo de diagnóstico para controlar los niveles de proteína en el tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse emparejando (es decir, uniéndolos físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina, galactosidasa, o acetil colinesterasa. Ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacilamin fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye lu-

minol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

III. Vectores de Expresión Recombinante y Células Huésped

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína 14911 (o una parte de la misma). Como se usa en este documento, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido” que se refiere a un ADN circular de doble cadena en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos adicionales de ADN pueden ligarse en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episomiales). Otros vectores (por ejemplo vectores de mamíferos no episomiales) se integran en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma del huésped. Es más, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan en este documento “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmido. En la presente invención “plásmido” y “vector” pueden usarse de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus asociados con adenovirus), que sirven para funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base a las células huésped a usar para expresión, que se une de forma operativa a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante “unido de forma operativa” pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped donde el vector se introduce en la célula huésped). La expresión “secuencia reguladora” pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula huésped, y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los especialistas en la técnica entenderán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión deseado de la proteína, y similares. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir de este modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas de fusión o péptidos fusión, codificadas por los ácidos nucleicos como se ha descrito en este documento (por ejemplo, proteínas 14911, formas mutantes de proteínas 14911, proteínas de fusión y similares).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la expresión de proteínas 14911 en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, las proteínas 14911 pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamíferos. Las células huésped adecuadas se describen adicionalmente en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Como alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariotas se realiza más a menudo en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles dirigiendo la expresión de las proteínas de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a una proteína codificada en su interior, normalmente al extremo amino de la proteína recombinante. Dichos vectores de fusión sirven típicamente para tres fines. 1) para aumentar la expresión de proteína recombinante; 2) para aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) para ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión, posteriormente a la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognadas incluyen el factor Xa, trombina y enteroquinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que se fusiona a la glutatión S-transferasa (GST), a la proteína de unión a maltosa E o a la proteína A, respectivamente para la proteína recombinante diana.

Las proteínas de fusión purificadas pueden utilizarse en ensayos de actividad de 14911, (por ejemplo, ensayos directos o ensayos competitivos descritos en detalle a continuación), o para generar anticuerpos específicos para proteínas 14911, por ejemplo. En una realización preferida, una proteína de fusión 14911 expresada en un vector de expresión retroviral de la presente invención puede utilizarse para infectar células de médula ósea que posteriormente se transplantan en receptores irradiados. La patología del sujeto receptor se examina después de que ha pasado suficiente tiempo (por ejemplo, seis (6) semanas).

Ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no de fusión adecuados incluyen pTrc (Amann y col. (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 11 d (Studier *et al.*, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). La expresión de los genes diana del vector pTrc depende de la transcripción de la ARN polimerasa del huésped de un promotor de fusión híbrido trp-lac. La expresión de los genes diana del vector pET 11d depende de la transcripción de un promotor de fusión T7 gn10-lac mediada por una ARN polimerasa viral coexpresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral se suministra por las cepas huésped BL21(DE3) o HMS174(DE3) de un profago residente que aloja un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

Una estrategia para maximizar la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad alterada para escindir de forma proteolítica la proteína recombinante (Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico a insertar en el vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido son los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada y col., (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Dicha alteración de secuencias de ácido nucleico de la invención puede realizarse mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

En otra realización, el vector de expresión de 14911 es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para expresión en levadura *S. cerevisiae* incluye pYepSec1 (Baldari, y col. (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz y col. (1987) *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA).

Como alternativa, las proteínas 14911 pueden expresarse en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf 9) incluyen la serie pAc (Smith y col. (1983) *Mol. Cell Biol* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

En otra realización más, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) y pMT2PC (Kaufman y col. (1987) *EMBO J.* 6:187-195). Cuando se usan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión se proporcionan a menudo mediante elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores comúnmente usados se obtienen de poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas véanse los capítulos 16y17 de Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

En otra realización, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo celular particular (por ejemplo los elementos reguladores específicos de tejido se usan para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido se conocen en la técnica. Ejemplo no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico para el hígado; Pinkert y col. (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), promotores específicos linfoides (Calame y Eaton (1988) *Adv. Immunol* 43:235-275), en promotores particulares de promotores de células T (Winoto y Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji y col. (1983) *Cell* 33:729-740; Queen y Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos; Byrne y Ruddie (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund y col. (1985) *Science* 230:912-916), y los promotores específicos de las glándulas mamarias (por ejemplo, el promotor del suero de la leche, Patente de Estados Unidos N° 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea N° 264.166). Los promotores regulados por el desarrollo también los abarca la invención, por ejemplo los promotores hox de ratón murino (Kessel y Gruss (1990) *Science* 249:374-379) y el promotor de la α -fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

La invención proporciona además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la invención clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Esto es, la molécula de ADN se une de forma operativa a una secuencia reguladora de manera que permita la expresión (mediante la transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido al ARNm 14911. Las secuencias reguladoras unidas de forma operativa a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido pueden elegirse para dirigir la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en diversos tipos celulares, por ejemplo, promotores y/o potenciadores virales, o secuencias reguladoras pueden elegirse para dirigir la expresión constitutiva directa, específica de tejido, o específica del tipo celular del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficacia, cuya actividad puede determinarse por el tipo celular en el que se introduce el vector. Para un análisis de la regulación de la expresión génica usando genes antisentido véase Weintraub, H. y col., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986.

Otro aspecto de la invención se refiere a células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Las expresiones “célula huésped” y “célula huésped recombinante” se usan de forma intercambiable en este documento. Se entiende que dichas expresiones se refieren no sólo a la célula sujeto en particular sino a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Puesto que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a la mutación o la influencia medioambiental, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero se incluye todavía dentro del alcance de la expresión como se usa en este documento.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, una proteína 14911 puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, células de levadura o de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células huésped adecuadas las conocen los especialistas en la técnica.

El ADN vector puede introducirse en las células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Como se usa en este documento, las expresiones “transformación” y “transfección” pretenden referirse a diversas técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico ajeno (por ejemplo, ADN), en una célula huésped, incluyendo co-precipitación con fosfato cálcico o cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE dextrano, lipofección, o electroporación. Los procedimientos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook, y col. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección usada, solamente una pequeña fracción de células puede integrar el ADN ajeno dentro de su genoma. Para identificar y seleccionar estas integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionados preferidos incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Ácido nucleico codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica una proteína 14911 o puede introducirse en un vector diferente. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido, pueden identificarse mediante selección con fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren).

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariota o eucariota en cultivo, puede usarse para producir (es decir, expresar) una proteína 14911. Por consiguiente, la invención proporciona además procedimientos para producir una proteína 14911 usando las células huésped de la invención. En una realización, el procedimiento comprende cultivar las células huésped de la invención, (en la cual se ha introducido el vector de expresión recombinante que codifica una proteína 14911) en un medio apropiado de modo que se produzca una proteína 14911. En otra realización, el procedimiento comprende además aislar una proteína 14911 del medio o de la célula huésped.

IV. Composiciones Farmacéuticas

Las moléculas de ácido nucleico 14911, proteínas 14911, y anticuerpos anti-14911, también denominados en este documento “compuestos activos”) de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Dichas composiciones típicamente comprenden la molécula de ácido nucleico, proteína, o anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. Los compuestos activos suplementarios pueden también incorporarse en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con la vía pretendida de administración. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa, y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol, u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiamintetraacético; tampones tales como acetatos, citratos, o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para las preparaciones improvisada de soluciones o dispersiones estériles inyectables. Para la administración intravenosa, vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacterioestática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ), o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el alcance de que exista la inyectabilidad fácil en jeringas. Debe establecerse en condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse de la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o contener un medio de dispersión, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales

ES 2 266 195 T3

como manitol, sorbitol, cloruro sódico, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (por ejemplo, una proteína 14911 o un anticuerpo anti-14911) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los contenidos preferidos de preparación son secados al vacío y secados por congelación lo que produce un polvo del ingrediente activo más un ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

15 Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden estar encerradas en cápsulas de gelatina, o comprimidas en comprimidos. Para los fines de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales pueden prepararse también usando un vehículo fluido para uso como un enjuague bucal, donde el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se agita dentro de la boca y se expectora o se traga. Los agentes de unión compatibles farmacéuticamente, y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. 20 Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos, y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar. Un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto, o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido argínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como peppermint, salicilato de metilo o 25 aromatizante de naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un pulverizador de aerosol a partir de un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor apropiado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

30 La administración sistémica puede ser también mediante medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan penetradores apropiados para la barrera a penetrar en la formulación. Dichos penetradores son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal puede realizarse a través del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, el compuesto activo se formula en pomadas, báslamos, geles, o cremas, como se conoce generalmente en la técnica. Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales de supositorio, tales como aceite de coco y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

40 En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán al compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etileno-vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los especialistas en la técnica. Los materiales también pueden conseguirse en el mercado de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomiales (incluyendo liposomas dirigidos a las células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.522.811.

50 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en formas unitarias de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Las formas unitarias de dosificación como se usan en este documento se refieren a unidades físicamente separadas suministradas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido; el programa para las formas de dosificación unitarias de la invención se rige por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de formar dicho compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

60 La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal al 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción entre DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que muestran grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse 65 compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirija a dichos compuestos al sitio o al tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos del cultivo celular y los estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante en plasma que incluye la CI50 (es decir, al concentración del compuesto de ensayo que alcanza la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) como se ha determinado en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en el plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden suministrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase Patente de Estados Unidos Nº 5.328.470) o mediante inyección esterotáctica (véase, por ejemplo, Chen y col. (1994) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica, puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que, se incluye el vehículo de suministro de gen. Como alternativa, cuando el vector de suministro de genes completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro de genes.

La composición farmacéutica puede incluirse en un recipiente, envase, o dispensador, junto con instrucciones para la administración.

V. Usos y Procedimientos de la Invención

Las moléculas de ácido nucleico, proteínas, proteínas homólogas, y anticuerpos descritos en este documento, pueden usarse en uno o más de los siguientes procedimientos: a) ensayos de exploración; b) medicina predictiva (por ejemplo, ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, ensayos clínicos monitorizados y farmacogénesis); y c) procedimientos de tratamiento (por ejemplo, terapéutico y profiláctico). Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención pueden usarse, por ejemplo, para expresar proteína 14911 (por ejemplo mediante un vector de expresión recombinante en una célula huésped en aplicaciones de terapia génica), para detectar ARNm de 14911 (por ejemplo en una muestra biológica) o una alteración genética en un gen 14911, y para modular la actividad de 14911, como se describe adicionalmente a continuación. Las proteínas 14911 pueden usarse para tratar trastornos caracterizados por producción insuficiente o excesiva de un sustrato de 14911 o producción de inhibidores de 14911. Además, las proteínas 14911 pueden usarse para seleccionar sustratos 14911 de producción natural, para seleccionar fármacos o compuestos que modulan la actividad de 14911, así como para tratar trastornos caracterizados por la producción excesiva o insuficiente de proteína 14911 o la producción de formas de proteína 14911 que tienen actividad disminuida o aberrante en comparación con la proteína 14911 de tipo silvestre. Es más, los anticuerpos anti-14911 de la invención pueden usarse para detectar y aislar proteínas 14911, regular la biodisponibilidad de proteínas 14911, y modular la actividad de 14911.

A. Ensayos de Exploración

La invención proporciona un procedimiento (también denominado en este documento “ensayo de selección”) para identificar moduladores, es decir, candidatos o compuestos de ensayo o agentes (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, pequeñas moléculas u otros fármacos) que se unen a proteínas 14911, que tienen un efecto estimulador o inhibidor en, por ejemplo, la expresión de 14911 o la actividad de 14911, o que tienen un efecto estimulador o inhibidor en, por ejemplo, la expresión o actividad de un sustrato de 14911.

En una realización, la invención proporciona ensayos para seleccionar candidatos o compuestos de ensayo que son sustratos de una proteína 14911 o polipéptidos o partes biológicamente activas de los mismos. En otra realización, la invención proporciona ensayos para seleccionar candidatos o compuestos de ensayo que se unen a, o modulan la actividad de una proteína o polipéptido 14911 o partes biológicamente activas de las mismas, por ejemplo, modulan la capacidad de 14911 para interaccionar con su ligando cognado. Los compuestos de ensayo de la presente invención pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en los procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo, bibliotecas biológicas, bibliotecas de solución en fase o de fase sólida paralela dirigible espacialmente; procedimientos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución. El procedimiento de biblioteca “una perla, un compuesto” y procedimientos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica se limita a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques se aplican a bibliotecas de compuestos de péptidos, no péptidos y pequeñas moléculas (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo en: DeWitt y col. (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann y col. (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho y col. (1993) *Science* 261:1303; Carrell y col. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell y col. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 33:2061; y en Gallop y col. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en soluciones (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), o en perlas (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacterias (Ladner USP 5.223.409), esporas (Ladner USP '409), plásmidos (Cull y col. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner *supra.*).

En otra realización, un ensayo es un ensayo basado en células que comprende poner en contacto una célula que expresa una molécula diana 14911 (por ejemplo, un sustrato de fosforilación 14911) con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular (estimular o inhibir) la actividad de la molécula diana 14911. Determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de la molécula diana puede realizarse, por ejemplo, determinando la capacidad de la proteína 14911 para unirse o para interactuar con la molécula diana 14911, o determinando la capacidad de la proteína 14911 para fosforilar la molécula diana 14911.

La capacidad de la proteína 14911 para fosforilar una molécula diana 14911 puede determinarse mediante, por ejemplo, un ensayo de quinasa *in vitro*. En resumen, una molécula diana 14911, por ejemplo una molécula diana 14911 inmunoprecipitada de una línea celular que expresa dicha molécula puede incubarse con la proteína 14911 y ATP radioactivo, por ejemplo, ATP [$\gamma^{32}\text{P}$], en un tampón que contiene MgCl_2 y MnCl_2 , por ejemplo, MgCl_2 10 mM y MnCl_2 5 mM. Después de la incubación, la molécula diana 14911 inmunoprecipitada puede separarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras; transferida a una membrana; por ejemplo, una membrana PVDF, y autorradiografiada. La aparición de bandas detectables en la autorradiografía indica que el sustrato 14911 se ha fosforilado. El análisis de fosfoaminoácidos en el sustrato fosforilado puede también realizarse para determinar que residuos en el sustrato 14911 se fosforilan. En resumen, la proteína radiofosforilada puede retirarse del gel SDS y someterse a hidrólisis ácida parcial. Los productos pueden después separarse mediante electroforesis unidimensional y analizarse en, por ejemplo, un phosphoimager y compararse a los patrones de fosfoaminoácido teñido con nihidrina.

Determinar la capacidad de la proteína 14911 para unirse o interactuar con una molécula diana 14911 puede realizarse determinando la unión directa. Determinar la capacidad de la proteína 14911 para unirse o interactuar con una molécula diana 14911 puede realizarse, por ejemplo, emparejando la proteína 14911 con un radioisótopo o una marca enzimática de modo que la unión de la proteína 14911 con la molécula diana 14911 pueda determinarse detectando la proteína 14911 marcada en un complejo. Por ejemplo, las moléculas 14911, por ejemplo, proteínas 14911, pueden marcarse con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^3H , directa o indirectamente, y el radioisótopo detectado por conteo directo de radioemisión o mediante conteo de escintilación. Como alternativa, las moléculas 14911 pueden marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina o luciferasa, y la marca enzimática detectarse mediante la determinación de conversión de un sustrato apropiado al producto.

También está dentro del alcance de esta invención determinar la capacidad de un compuesto para modular la interacción entre 14911 y su molécula diana, sin el marcado de ninguno de los interaccionantes. Por ejemplo, puede usarse un microfisiómetro para detectar la interacción de 14911 con su molécula diana sin el marcaje de la 14911 o la molécula diana. McConnell, H.M. y col. (1992) *Science* 257:1906-1912. Como se usa en este documento, un "microfisiómetro" (por ejemplo, Citosensor) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la cual una célula acidifica su entorno usando un sensor potenciométrico dirigible por la luz (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación pueden usarse como indicador de la interacción entre el compuesto y el receptor.

En una realización preferida, determinar la capacidad de la proteína 14911 para unirse a o interactuar con una molécula diana 14911 puede realizarse determinando la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana puede determinarse detectando la inducción de un mensajero celular secundario de la diana (por ejemplo, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP_3 , etc), detectando la actividad catalítica/enzimática de la diana en el sustrato apropiado, detectando la inducción de un gen informador (que comprende un elemento regulador sensible a la diana unido de forma operativa a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, cloranfenicol acetil transferasa), o detectando una respuesta celular regulada por la diana.

En otra realización más, un ensayo de la presente invención es un ensayo sin células en el que una proteína 14911 o una parte biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para unirse a la proteína 14911 o a la parte biológicamente activa de la misma. La unión del compuesto de ensayo a la proteína 14911 puede determinarse directa o indirectamente como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida, el ensayo incluye poner en contacto la proteína 14911 o la parte biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a 14911 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con el compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con una proteína 14911, donde determinar la capacidad de compuesto de ensayo para interactuar con una proteína 14911 comprende determinar la capacidad del compuesto de ensayo para unirse preferentemente con 14911 o la parte biológicamente activa de la misma en comparación con el compuesto conocido.

En otra realización, el ensayo es un ensayo sin células en el que una proteína 14911 o una parte biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para modular (es decir, estimular o inhibir) la actividad de la proteína 14911 o de la parte biológicamente activa de la misma. Determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de una proteína 14911 puede realizarse, por ejemplo, determinando la capacidad de la proteína 14911 para unirse a una molécula diana 14911

mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente para determinar la unión directa. Determinar la capacidad de la proteína 14911 para unirse a una molécula diana 14911 puede también realizarse utilizando una tecnología tal como un análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA). Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 y Szabo y col. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705. Como se usa en este documento, "BIA" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interaccionantes (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en el fenómeno óptico de resonancia del plasmón superficial (SPR) pueden usarse como una indicación de interacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

En una realización alternativa, determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de una proteína 14911 puede realizarse determinando la capacidad de la proteína 14911 para modular adicionalmente la actividad de una molécula diana 14911 (por ejemplo, un componente de una vía de transducción de señales mediada por 14911). Por ejemplo, puede determinarse la actividad de la molécula efectora sobre una diana apropiada, o puede determinarse la unión del efector a una diana apropiada como se ha descrito previamente.

En otra realización más, el ensayo sin células implica poner en contacto una proteína 14911 o una parte biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a la proteína 14911 de una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con la proteína 14911, donde determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con la proteína 14911 comprende determinar la capacidad de la proteína 14911 para unirse preferentemente a o modular la actividad de una molécula diana 14911.

Los ensayos sin células de la presente invención están disponibles para uso de formas de proteínas solubles y/o unidas a membrana (por ejemplo, proteínas 14911 o partes biológicamente activas de las mismas). En el caso de ensayos sin células en los que se usa una forma de proteína unida a membrana (por ejemplo, un receptor 14911 de superficie celular) puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de modo que la forma de proteína unida a membrana se mantenga en solución. Ejemplos de dichos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-*N*-metilglucamida, decanoil-*N*-metilglucamida, Triton® X-114, Thesit®, isotridecilo (etilenglicol éter)_n, sulfonato de 3-[(3-cloramidopropil)dimetilaminio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-cloramidopropil)dimetilaminio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO), o sulfonato de *N*-dodecil=*N,N*-dimetil-3-amonio-1-propano.

En más de una realización de los procedimientos de ensayo anteriores de la presente invención, puede ser deseable inmovilizar 14911 o su molécula diana para facilitar la separación de las formas complejadas y las no complejadas de una o ambas proteínas, así como para acomodar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de ensayo con una proteína 14911, o la interacción de una proteína 14911 con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede realizarse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrifuga. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que se añade a un dominio que permite a una de las dos proteínas unirse a la matriz. Por ejemplo, proteínas de fusión 14911/glutación-S-transferasa o proteínas de fusión diana/ glutación-S-transferasa pueden adsorberse en perlas de glutación sefarosa (Sigma Chemical, St Louis, MO) o placas de microtitulación derivadas de glutación, que se combinan después con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y la proteína diana no adsorbida o la proteína 14911, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación de complejos (por ejemplo, a condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las perlas o placas de microtitulación se lavan para retirar cualquier componente no unido, la matriz se inmoviliza en el caso de las perlas, el complejo se determina directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz, y el nivel de unión a o actividad de 14911 se determina usando técnicas convencionales.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas o matrices pueden usarse también en los ensayos de selección de la invención. Por ejemplo, una proteína 14911 o una molécula diana 14911 pueden inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. proteína 14911 o moléculas diana pueden prepararse de a partir de biotina NSH (*N*-hidroxisuccinimida) usando técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos cubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, los anticuerpos reactivos con proteína 14911 o moléculas diana pero que no impiden la unión de la proteína 14911 con su molécula diana pueden derivarse de los pocillos de la placa, y la diana o proteína 14911 no unida quedar atrapada en los pocillos mediante conjugación con anticuerpos. Los procedimientos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con la proteína o molécula diana 14911, así como ensayos ligados a enzimas que dependen de detectar cualquier actividad enzimática asociada con la proteína o molécula diana 14911.

En otra realización, los moduladores de la expresión de 14911 se identifican en un procedimiento donde una célula se pone en contacto con un compuesto candidato y se determina la expresión del ARNm o de la proteína 14911 en la célula. El nivel de expresión del ARNm o de la proteína 14911 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión del ARNm o de la proteína 14911 en ausencia de ese compuesto. En base a esta comparación, el compuesto candidato puede después identificarse como un modulador de la expresión de 14911. Por ejemplo, si la expresión del ARNm o de la proteína 14911 es mayor (estadísticamente significativamente mayor) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la expresión del ARNm o de la proteína 14911. Como alternativa, si la expresión del ARNm o de la proteína 14911 es menor

(estadísticamente significativamente menor) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de la expresión del ARNm o de la proteína 14911. el nivel de expresión de ARNm o proteína 14911 en las células puede determinarse mediante procedimientos descritos en este documento para detectar ARNm o proteína 14911.

En otro aspecto más de la invención, las proteínas 14911 se pueden usar como “proteínas cebo” en ensayos con dos o tres híbridos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N°: 5.283.317; Zervos y col. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura y col. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel y col. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi y col. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; y Brent WO94/10300), para identificar otras proteínas, que se unen o interaccionan con 14911 (“proteínas de unión a 14911” o “14911-pb”) y que están implicadas en la actividad de 14911. Es probable que dichas proteínas de unión a 14911 estén también implicadas en la propagación de señales por las proteínas 14911 o las dianas 14911, como, por ejemplo, elementos cadena abajo de una vía de señalización mediada por 14911. Como alternativa, es probable que dichas proteínas de unión a 14911 también sean inhibidores.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que están constituidos de dominios de unión al ADN y activación separables. En resumen, el ensayo utiliza dos construcciones de ADN diferentes. En una construcción, el gen que codifica la proteína 14911 se condensa con un gen que codifica el dominio de unión al ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En la otra construcción, una secuencia de ADN, de una biblioteca de secuencias de ADN, que codifica una proteína no identificada, (“presa” o “muestra”) se condensa con un gen que codifica un dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas “cebo” y “presa” son capaces de interaccionar *in vivo*, formando un complejo dependiente de 14911, el dominio de unión a ADN y el dominio de activación del factor de transcripción se llevan a una gran proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de un gen informador (por ejemplo LacZ) que está unido de forma operativa a un sitio regulador transcripcional sensible al factor de transcripción. Se puede detectar la expresión del gen informador y las células de la colonia que contengan el factor transcripcional funcional pueden aislarse y usarse para obtener el gen clonado que codifica la proteína que interacciona con la proteína 14911.

Esta invención se refiere además a nuevos agentes identificados mediante los ensayos de identificación descritos anteriormente. Por consiguiente, esta dentro del alcance de esta invención usar además un agente identificado como se describe en este documento en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, se puede usar un agente identificado como se describe en este documento (un agente de modulación de 14911, una molécula de ácido nucleico 14911 antisentido, un anticuerpo específico para 14911, o una pareja de unión a 14911) en un modelo animal, para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Como alternativa, puede usarse un agente identificado como se describe en este documento en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Además, esta invención se refiere a los usos de nuevos agentes identificados por los procedimientos de selección descritos anteriormente para tratamientos como se describe en este documento.

B. Ensayos De Detección

Las partes o fragmentos de ADNc identificadas en este documento (y las correspondientes secuencias génicas completas) pueden usarse de muchas maneras como reactivos de polinucleótidos. Por ejemplo, estas secuencias se pueden utilizar para: (i) mapear sus respectivos genes en un cromosoma; y, de este modo, localizar regiones de genes asociadas con enfermedad genética; (ii) identificar un individuo a partir de una muestra biológica mínima (tipificación de tejidos); y (iii) ayuda en la identificación forense de una muestra biológica. Estas aplicaciones se describen en las subsecciones a continuación.

1. Mapeado de cromosomas

Una vez que la secuencia (o una parte de la secuencia) de un gen se ha aislado, esta secuencia puede usarse para mapear la situación del gen en un cromosoma. Este procedimiento se llama mapeado de cromosomas. Por consiguiente, partes o fragmentos de las secuencias de nucleótidos 14911, descritas en este documento, pueden usarse para mapear la situación de los genes 14911 en un cromosoma. El mapeado de las secuencias de 14911 en los cromosomas es una importante primera etapa en la correlación de estas secuencias con genes asociados a enfermedad.

En resumen, los genes 14911 pueden mapearse en los cromosomas preparando cebadores de PCR (preferiblemente de 15-25 pb de longitud) a partir de secuencias de nucleótidos 14911. Se puede usar el análisis por ordenador de las secuencias 14911 para predecir los cebadores que no abarcan mas de un exón en el ADN genómico, que de este modo complican el procedimiento de amplificación. Estos cebadores pueden después usarse para selección por PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. Sólo los híbridos que contienen el gen humano correspondiente a la secuencia 14911 producirán un fragmento amplificado.

Los híbridos de células somáticas se preparan fusionando células de diferentes mamíferos (por ejemplo, células humanas y de ratón). A medida que los híbridos de células humanas y de ratón crecen y se dividen, pierden gradualmente cromosomas humanos en un orden aleatorio, pero mantienen los cromosomas de ratón. Usando medios en los que las células de ratón no pueden crecer, porque carecen de una enzima particular, pero las humanas si pueden, se mantendrá el cromosoma humano que contiene el gen que codifica la enzima necesitada. Usando diferentes medios, se pueden establecer paneles de líneas celulares híbridas. Cada línea celular de un panel contiene un único cromosoma humano o una pequeña cantidad de cromosomas humanos y un conjunto completo de cromosomas de ratón,

permitiendo el mapeado fácil de genes individuales en cromosomas humanos específicos (D'Eustachio P. y col. (1983) *Science* 220:919-924) Se pueden producir también híbridos de células somáticas que contengan sólo fragmentos de cromosomas humanos usando cromosomas humanos con translocaciones y deleciones.

- 5 El mapeado por PCR de híbridos de células somáticas es un procedimiento rápido para asignar una secuencia particular a un cromosoma particular. Se pueden asignar tres o más secuencias por día usando un único ciclador térmico. Usando secuencias del nucleótidos 14911 para diseñar los cebadores de oligonucleótidos; la sublocalización se puede conseguir con paneles de fragmentos de cromosomas específicos. Otras estrategias de mapeado que pueden usarse de manera similar para mapear una secuencia 9o, 1p ó 1v en sus cromosomas incluyen la hibridación *in situ* (descrita en Fan, Y y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 87:6223-27), pre-selección con cromosomas tipo flujo marcados, y pre-selección mediante hibridación con cromosomas específicos de bibliotecas de ADNc.

- 15 La hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH) de una secuencia de ADN en una propagación cromosómica en metafase puede usarse adicionalmente para proporcionar una situación cromosómica precisa en una etapa. Las propagaciones cromosómicas pueden realizarse usando células cuya división se ha bloqueado en metafase mediante una sustancia química como la colcemida que altera el huso mitótico. Los cromosomas pueden tratarse brevemente con tripsina y después teñirse con Giemsa. Se desarrolla un patrón de bandas claras y oscuras en cada cromosoma, de forma que los cromosomas pueden identificarse individualmente. La técnica FISH puede usarse con secuencias de ADN tan cortas como 500 ó 600 bases. Sin embargo, los clones mayores de 1000 bases tienen una probabilidad mayor de unirse a una única situación cromosómica con suficiente intensidad de señal para detección simple. Preferiblemente 2000 bases, y más preferiblemente 2000 bases serán suficientes para conseguir buenos resultados en una cantidad de tiempo razonable. Para una revisión de esta técnica, véase Verna y col. *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques* (Pergamon Press, New York 1988).

- 25 Los reactivos para mapeado de cromosomas pueden usarse individualmente para marcar un único cromosoma o un único sitio en ese cromosoma, o pueden usarse paneles de reactivos para marcar sitios múltiples y/o cromosomas múltiples. Los reactivos correspondientes a regiones no codificantes de los genes se prefieren realmente para fines de mapeado. Es más probable que las secuencias codificantes se conserven dentro de familias de genes, aumentando de este modo las posibilidades de hibridaciones cruzadas durante el mapeado de cromosomas.

- 30 Una vez que una secuencia se ha mapeado hasta una situación cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma puede ponerse en correlación con datos de mapas genéticos. (dichos datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man, disponible on line en la Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre un gen y una enfermedad, mapeados en la misma región cromosómica se puede identificar después mediante análisis de conexión (co-herencia o genes físicamente adyacentes), descrito, por ejemplo en Egeland, J y col. (1987) *Nature*, 325:783-787.

- Es más, se pueden determinar diferencias en las secuencias de ADN entre individuos afectados y no afectados por una enfermedad asociada con el gen 14911. Si se observa una mutación en alguno o todos los individuos afectados pero no en ninguno de los no afectados, entonces la mutación es probable que sea el agente causante de esa enfermedad particular. La comparación entre individuos afectados y no afectados implica generalmente buscar primero alteraciones estructurales en los cromosomas, tales como deleciones o translocaciones que son visibles en propagaciones de cromosomas o se detectan usando PCR en base a esa secuencia de ADN. Finalmente, puede realizarse la secuenciación completa de genes de varios individuos para confirmar la presencia de una mutación y distinguir las mutaciones de los polimorfismos.

2. Tipificación de tejidos

- 50 Las secuencias 14911 de la presente invención pueden usarse también para identificar individuos a partir de muestras biológicas mínimas. El ejército de Estados Unidos, por ejemplo, está considerando el uso del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para la identificación de su personal. En esta técnica, el ADN genómico de un individuo se digiere con una o más enzimas de restricción, y se sondea en una transferencia de Southern para producir bandas únicas para identificación. Este procedimiento no padece las limitaciones actuales de las "marcas de perros", que pueden perderse, cambiarse o robarse, haciendo difícil la identificación positiva. Las secuencias de la presente invención son útiles como marcadores de ADN adicionales para RFLP (descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.272.057).

- Además, las secuencias de la presente invención pueden usarse para proporcionar una técnica alternativa que determina la secuencia real de ADN base por base de partes seleccionadas del genoma de un individuo. De este modo, las secuencias de nucleótidos 14911 descritas en este documento pueden usarse para preparar dos cebadores de PCR a partir de los extremos 5' y 3' de las secuencias. Estos cebadores pueden usarse para amplificar el ADN de un individuo y posteriormente secuenciarlo.

- 65 Los paneles de las correspondientes secuencias de ADN de los individuos, preparados de esta forma, proporcionan identificaciones individuales únicas, ya que cada individuo tendrá un conjunto único de dichas secuencias de ADN debido a diferencias alélicas. Las secuencias de la presente invención pueden usarse para obtener dichas secuencias de identificación de individuos y tejidos. Las secuencias de nucleótidos 14911 de la invención únicamente representan partes del genoma humano. La variación alélica ocurre en algún grado en las regiones codificantes de estas secuen-

cias, y en un grado mayor en las regiones no codificantes. Se estima que la variación alélica entre individuos humanos ocurre con una frecuencia de aproximadamente una vez por cada 500 bases. Cada una de las secuencias descritas en este documento puede, en algún grado, usarse como un patrón contra el cual el ADN de un individuo puede compararse para identificarlo. Puesto que se producen un gran número de polimorfismos en las regiones no codificantes, se necesitan menos secuencias para diferenciar a los individuos. Las regiones no codificantes de la SEC ID N°: 1, pueden proporcionar cómodamente identificaciones individuales positivas con un panel de quizá 10 a 1000 cebadores que cada cual produce una secuencia amplificada no codificante de 100 bases. Si se usan las secuencias codificantes predichas, tales como las de la SEC ID N°:3, una cantidad más apropiada de cebadores para identificaciones individuales positivas sería de 500 a 2000.

Si se usa un panel de reactivos de secuencias de nucleótidos 14911 descritas en este documento para generar una base de datos de identificación única para un individuo, esos mismos reactivos pueden usarse más tarde para identificar tejidos de ese individuo. Usando la base de datos de identificación única, la identificación positiva del individuo, vivo o muerto, puede hacerse a partir de muestras de tejido extremadamente pequeñas.

3. Uso de secuencias 14911 parciales en biología forense

Las técnicas de identificación basadas en ADN pueden usarse también en biología forense. La biología forense es un campo científico que utiliza la tipificación genética de las pruebas biológicas encontradas en la escena de un crimen como un medio para identificar positivamente, por ejemplo, al autor de un crimen. Para realizar dicha identificación, puede usarse la tecnología de PCR para amplificar secuencias de ADN tomadas de muestras biológicas muy pequeñas, como tejidos, por ejemplo pelo o piel, o fluidos biológicos, por ejemplo, sangre, saliva o semen, encontrados en la escena del crimen. La secuencia amplificada puede compararse después con un patrón, permitiendo de ese modo la identificación del origen de la muestra biológica.

Las secuencias de la presente invención pueden usarse para proporcionar reactivos de polinucleótidos, por ejemplo cebadores de PCR, dirigidos a loci específicos en el genoma humano, que pueden potenciar la fiabilidad de las identificaciones forenses basadas en el ADN proporcionando, por ejemplo, otro "marcador de identificación" (es decir, otra secuencia de ADN que es única para un individuo particular). Como se ha mencionado anteriormente, la información real de la secuencia de bases puede usarse para identificación como una alternativa exacta a los patrones formados por fragmentos generados por enzimas de restricción. Las secuencias dirigidas a regiones no codificantes de la SEC ID N°: 1 son particularmente apropiadas para este uso, puesto que en las regiones no codificantes se producen grandes cantidades de polimorfismos, haciendo más fácil diferenciar individuos usando esta técnica. Ejemplos de reactivos de polinucleótidos incluyen las secuencias de nucleótidos 14911 o porciones de las mismas, por ejemplo, fragmentos obtenidos de regiones no codificantes de la SEC ID N°: 1, que tengan una longitud de al menos 20 bases, preferiblemente al menos 30 bases.

Las secuencias de nucleótidos 14911 descritas en este documento pueden usarse además para proporcionar reactivos de polinucleótidos, por ejemplo, sondas marcadas o marcables que puedan usarse para, por ejemplo, una técnica de hibridación *in situ*, para identificar un tejido específico, por ejemplo tejido del cerebro. Esto puede ser muy útil en casos en los que a un patólogo forense se le presenta un tejido de origen desconocido. Pueden usarse paneles de dichas sondas de 14911 para identificar el tejido por especie y/o por tipo de órgano.

De un modo similar, estos reactivos, por ejemplo cebadores de 14911 o sondas, pueden usarse para explorar contaminaciones en cultivos de tejidos. (es decir, explorar la presencia de una mezcla de diferentes tipos de células en un cultivo).

C. Medicina Predictiva

La presente invención concierne también al campo de la medicina predictiva, en la cual se usan ensayos de diagnóstico, pronóstico y ensayos de control clínico con fines de pronóstico (predictivos) y de ese modo tratar a un individuo profilácticamente. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a ensayos de diagnóstico para determinar la expresión de la proteína y/o del ácido nucleico 14911 así como la actividad de 14911, en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo, sangre, suero, células, tejido) para de este modo determinar si un individuo está afectado con una enfermedad o trastorno o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de 14911. la invención también proporciona ensayos de pronóstico (o predictivos) para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o actividad del ácido nucleico o proteína 14911. Por ejemplo, las mutaciones en un gen 14911 pueden ensayarse en una muestra biológica. Dichos ensayos pueden usarse con fines de pronóstico ó predicción para de ese modo tratar profilácticamente a un individuo antes de la aparición de un trastorno caracterizado por o asociado a la expresión o actividad del ácido nucleico o proteína 14911.

Otro aspecto de la invención se refiere al control de la influencia de agentes (por ejemplo fármacos, compuestos) en la expresión o actividad de 14911 en ensayos clínicos.

Estos y otros agentes se describen con más detalle en las secciones siguientes.

1. Ensayos de diagnóstico

Un procedimiento ejemplar para detectar la presencia o ausencia de la proteína o ácido nucleico 14911 en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar la proteína o ácido nucleico 14911 (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) que codifica la proteína 14911 de modo que la presencia de la proteína o ácido nucleico 14911 se detecte en la muestra biológica. Un agente preferido para detectar el ARNm o el ADN genómico de 14911 es una sonda de ácido nucleico marcada capaz de hidrolizar el ARNm o el ADN genómico de 14911. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico humano de 14911, tal como el ácido nucleico de la SEC ID N°: 1. ó una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente bajo condiciones rigurosas con el ARNm o el ADN genómico de 14911. Otras sondas apropiadas para uso en los ensayos de diagnóstico de la invención se describen en este documento.

Un agente preferido para detectar la proteína 14911 es un anticuerpo capaz de unirse a la proteína 14911, preferiblemente un anticuerpo con una marca detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto o un fragmento del mismo (por ejemplo Fab o F(ab')₂). El término “marcado”, con respecto a la sonda ó anticuerpo, pretende abarcar el marcado directo de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, uniéndolo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Ejemplos de marcado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y el marcado final de una sonda de ADN con biotina de modo que pueda detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente. La expresión “muestra biológica” pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Es decir, el procedimiento de detección de la invención puede usarse para detectar ARNm proteínas o ADN genómico de 14911, en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm de 14911 incluyen hibridaciones de Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de la proteína 14911 incluyen ensayos inmunoborabentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias de Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico de 14911 incluyen hibridaciones de Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de la proteína 14911 incluyen introducir dentro de un sujeto un anticuerpo anti-14911 marcado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo cuya presencia y situación en el sujeto pueden detectarse mediante técnicas de imagen convencionales.

En una realización, la muestra biológica contiene moléculas de proteína del sujeto de ensayo. Como alternativa, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm o ADN genómico del sujeto de ensayo. Una muestra biológica preferida es un suero aislado de un sujeto mediante medios convencionales.

En otra realización los procedimientos implican además obtener una muestra biológica de control de un sujeto de ensayo, y poner en contacto la muestra de control con un compuesto o agente capaz de detectar la proteína el ARNm o el ADN genómico 14911, de modo que la presencia de la proteína el ARNm o el ADN genómico 14911, se detecte en la muestra biológica, y se compara la presencia de la proteína el ARNm o el ADN genómico 14911, en la muestra de control con la presencia de la proteína el ARNm o el ADN genómico 14911 en la muestra de ensayo.

La invención abarca también kits para detectar la presencia de 14911 en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto marcado o un agente capaz de detectar la proteína o el ARNm 14911 en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de 14911 en la muestra; y medios para comparar la cantidad de 14911 en la muestra con un patrón. El compuesto o agente puede envasarse en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para detectar la proteína o el ácido nucleico 14911.

2. Ensayos de Pronóstico

Los procedimientos de diagnóstico descritos en este documento pueden utilizarse además para identificar sujetos que tienen o en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión ó actividad aberrante de 14911. Por ejemplo, los ensayos descritos en este documento, como los ensayos de diagnóstico precedentes o los siguientes ensayos, pueden utilizarse para identificar un sujeto que tiene o en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o actividad de la proteína o ácido nucleico 14911. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de 14911 en el que una muestra de ensayo se obtiene de un sujeto y la proteína o el ácido nucleico 14911 (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) se detectan; donde la presencia de la proteína o el ácido nucleico 14911 es un diagnóstico para un sujeto que tiene o en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad aberrante de 14911, o en riesgo de desarrollarla. Como se usa en este documento, “muestra de ensayo” se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un fluido biológico (por ejemplo, suero), muestra de células, ó tejido.

Además, los ensayos de pronóstico descritos en este documento pueden usarse para determinar si se le puede administrar un agente a un sujeto (por ejemplo, un agonista, un antagonista, un péptidomimético, una proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato) para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad aberrante de 14911. Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos para determinar si un sujeto puede ser tratado eficazmente con un agente para un trastorno asociado con la expresión o actividad

aberrante de 14911, en el que se obtiene una muestra de ensayo y la actividad o expresión de la proteína o ácido nucleico 14911 se detecta (por ejemplo, donde la abundancia de la expresión o actividad de la proteína o ácido nucleico 14911 es un diagnóstico para un sujeto al que puede administrarse el agente para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de 14911).

Los procedimientos de la invención pueden usarse también para detectar alteraciones genéticas en un gen 14911, determinando de este modo si un sujeto con el gen alterado está en riesgo de un trastorno asociado con el gen 14911. En realizaciones preferidas, los procedimientos incluyen detectar, en una muestra de células del sujeto, la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por al menos una alteración que afecte a la integridad de un gen que codifica una proteína 14911, o la expresión errónea del gen 14911. Por ejemplo, dichas alteraciones pueden detectarse determinando la existencia de al menos una de éstas: 1) una delección de uno o más nucleótidos de un gen 14911; 2) una adición de uno o más nucleótidos a un gen 14911; 3) una sustitución de uno ó más nucleótidos de un gen 14911; 4) una reordenación cromosómica de un gen 14911; 5) una alteración en el nivel de transcripción de un ARN mensajero de un gen 14911; 6) una modificación aberrante de un gen 14911, tal como del patrón de metilación del ADN genómico; 7) presencia de un patrón de corte y empalme de tipo no silvestre de la transcripción de ARN mensajero de un gen 14911; 8) un nivel de tipo no silvestre de una proteína 14911; 9) pérdida alélica de un gen 14911 y 10) modificación pos-traducciona inapropiada de una proteína 14911. Como se describe en este documento, hay una gran cantidad de técnicas de ensayo conocidas en la técnica que pueden usarse para detectar alteraciones en un gen 14911. Una muestra biológica preferida es una muestra de tejido o suero aislada de un sujeto mediante medios convencionales.

En ciertas realizaciones, la detección de la alteración implica el uso de una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202), tal como PCR ancla o RACE PCR, o, como alternativa, una reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran y col. (1988) *Science* 241:1077-1080; y Nakazawa y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), la última de las cuales puede ser particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en el gen 14911 (véase Abravaya y col. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682). Este procedimiento puede incluir las etapas de recoger de una muestra de células de un paciente, aislar el ácido nucleico (por ejemplo, genómico, ARNm ó ambos) de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que hibriden específicamente con un gen 14911 bajo condiciones tales que se produzca la hibridación y amplificación del gen 14911 (si está presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto de amplificación y compararlo con la longitud de una muestra de control. Se anticipa que puede ser deseable usar la PCR y/o LCR como una etapa de amplificación preliminar junto con cualquiera de las técnicas usadas para la detección de mutaciones descritas en este documento.

Los procedimientos de amplificación alternativos incluyen: replicación de secuencias auto-sostenida (Guatelli, J.C. y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificación transduccional (Kwoh, D.Y. y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicasa (Lizardi, P.M. y col. (1988) *Bio-Technology* 6:1197), o cualquier otro procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los especialistas en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácidos nucleicos si dichas moléculas están presentes en cantidades muy bajas.

En una realización alternativa, las mutaciones en un gen 14911 de una muestra celular pueden identificarse por las alteraciones en los patrones de escisión de las enzimas de restricción. Por ejemplo, el ADN de muestra y de control se aísla, amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más endonucleasas de restricción, y las longitudes de los fragmentos se determinan mediante electroforesis en gel y se comparan. Diferencias en las longitudes de los fragmentos entre el ADN de muestra y de control indican mutaciones en el ADN de muestra. Es más, el uso de ribozimas específicas de secuencia (véase, por ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 5.498.531) puede usarse para valorar la presencia o ausencia de mutaciones específicas por el desarrollo o pérdida de un sitio de escisión de una ribozima.

En otras realizaciones, las mutaciones genéticas en 14911 pueden identificarse hibridando unos ácidos nucleicos de muestra y de control, por ejemplo ADN ó ARN, con series de alta densidad que contienen cientos o miles de sondas de oligonucleótidos (Cronin, M.T. y col. (1996) *Human Mutation* 7: 224-255; Kozal, M.J. y col. (1996) *Nature Medicine* 2: 753-759). Por ejemplo, las mutaciones genéticas en 14911 pueden identificarse en series bidimensionales que contienen sondas de ADN generadas por luz como se describe en Cronin, M.T. y col. *supra*. En resumen, se usa una primera serie de sondas para explorar en tramos largos de ADN de una muestra y un control para identificar cambios de bases entre las secuencias fabricando series lineales de sondas secuenciales solapantes. Esta etapa permite la identificación de mutaciones puntuales. A esta etapa le sigue una segunda serie de hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas usando series de sondas pequeñas y especializadas complementarias a todas las variantes de mutaciones detectadas. Cada serie de mutación está constituida de conjuntos paralelos de sondas, uno complementario al gen de tipo silvestre y otro complementario al gen mutante.

En otra realización más, puede utilizarse cualquiera de una diversidad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el gen 14911 y detectar mutaciones comparando la secuencia de la muestra de 14911 con la correspondiente secuencia de tipo silvestre (control). Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen las basadas en las técnicas desarrolladas por Maxam y Gilbert ((1977) *Proc. Natl. Sci. USA* 74:560) o Sanger ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463). También se contempla que se pueda utilizar una diversidad de procedimientos de

secuenciación automáticos cuando se realicen los ensayos de diagnóstico ((1995) *Biotechniques* 19:448), incluyendo secuenciación por espectrometría de masas (véase, por ejemplo, Publicación Internacional de PCT N° WO 94/16101; Cohen y col. (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; y Griffin y col. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38: 147-159).

Otros procedimientos para detectar mutaciones en el gen 14911 incluyen aquellos en los que se usa una protección contra los agentes de escisión para detectar bases desapareadas en ARN/ARN o heterodúplex de ARN/ADN (Myers y col. (1985) *Science* 230:1242). En general, la técnica de “escisión desapareada” comienza proporcionando heterodúplex formados por ARN o ADN híbrido (marcado) que contiene la secuencia de tipo silvestre de 14911 con un ARN o ADN potencialmente mutante obtenido de la muestra de tejido. Los dúplex de doble cadena se tratan con un agente que escinde las regiones de cadena sencilla del dúplex, tales como las que existirán debido a desapareamientos de pares de bases entre las cadenas de control y de muestra. Por ejemplo, los dúplex ARN/ADN pueden tratarse con ARNasa y los híbridos ARN/ADN con la nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones desapareadas. En otras realizaciones, los dúplex ADN/ADN o los dúplex ARN/ADN se tratan con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina para digerir las regiones desapareadas. Después de la digestión de las regiones desapareadas, el material resultante se separa después por tamaño en geles de poliacrilamida desnaturalizada para determinar el sitio de mutación. Véase, por ejemplo, Cotton y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleeba y col. (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295). En una realización preferida, el ADN ó ARN de control puede marcarse para la detección.

En otras realizaciones más aún, la reacción de escisión de los desapareamientos, emplea una o más proteínas que reconocen los pares de bases desapareadas en ADN de doble cadena (llamadas “enzimas reparadoras del desapareamiento del ADN”) en sistemas definidos para detectar y mapear mutaciones puntuales en ADNc de 14911 obtenidos de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde la A en desapareamientos G/A y la timidina ADN glicosilasa de células HeLa escinde la T en desapareamientos G/T (Hsu y col. (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). De acuerdo con una realización ejemplar, una sonda basada en la secuencia de 14911, por ejemplo, una secuencia de tipo silvestre de 14911, se hibrida con un ADNc u otro producto de ADN de las células de ensayo. El dúplex se trata con una enzima reparadora de los desapareamientos de ADN, y los productos de escisión, si existe alguno, se pueden detectar con protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N°: 5.459.039.

En otras realizaciones, se usarán las alteraciones en la movilidad electroforética para identificar mutaciones en los genes 14911. Por ejemplo, los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) pueden usarse para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo silvestre (Orita y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 86:2766, véase también Cotton (1993) *Mutat Res* 285:125-144; y Hayashi (1992) *Genet Anal Tech Appl* 9:73-79). Los fragmentos de ADN de cadena sencilla de ácidos nucleicos de 14911 de la muestra y de control se desnaturalizarán y luego se dejarán renaturalizar. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos de cadena sencilla varía de acuerdo con la secuencia, la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un cambio en una única base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo aumentará usando ARN (en lugar de ADN), en el cual la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una realización preferida, el procedimiento objeto utiliza análisis de heterodúplex para separar moléculas heterodúplex de doble cadena basándose en cambios en la movilidad electroforética (Keen y col. (1991) *Trends Genet* 7:5).

En otra realización más, para ensayar el movimiento de los fragmentos mutantes o de tipo silvestre en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturalización, se usa la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) (Myers y col. (1985) *Nature* 313:495). Cuando se usa la DGGE como procedimiento de análisis, se modificará el ADN para asegurar que no se desnaturaliza completamente, por ejemplo añadiendo por PCR una sujeción de GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC, de difícil separación. En una realización adicional, se utiliza un gradiente de temperatura en lugar del gradiente de desnaturalización, para identificar diferencias en la movilidad del ADN de control y de muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753).

Ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, aunque sin limitación, hibridación selectiva con oligonucleótidos, amplificación selectiva o extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, pueden prepararse cebadores de oligonucleótidos en los que la mutación conocida se sitúa en el centro y después hibrida con el ADN diana en condiciones que permitan la hibridación sólo si se encuentra un emparejamiento perfecto (Saiki y col. (1986) *Nature* 324:163); (Saiki y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230). Dichos oligonucleótidos específicos de alelos hibridan con ADN diana amplificado por PCR o con varias mutaciones diferentes si los oligonucleótidos están unidos a la membrana de hibridación e hibridados con ADN diana marcado.

Como alternativa, la tecnología de amplificación de alelos específicos que depende de amplificación selectiva por PCR se usará junto con la presente invención. Los oligonucleótidos usados como cebadores para amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de forma que la amplificación depende de hibridación diferencial) (Gibbs y col. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) o en el extremo 3' de un cebador donde, en las condiciones apropiadas, se puede prevenir el desapareamiento o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner y col. (1993) *Tibtech* 11:238). Además, sería deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para conseguir una detección basada en la escisión (Gasparini y col. (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). Se anticipa que en ciertas realizaciones la amplificación también puede realizarse usando ligasa Taq para amplificación (Baranny (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189). En dichos casos, el ligamiento sólo se producirá si hay un

emparejamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia 5', haciendo posible detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico buscando la presencia o ausencia de amplificación.

Los procedimientos descritos en este documento pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico pre-
 5 envasados que comprenden al menos una sonda de ácido nucleico o anticuerpo reactivo descrito en este documento, que puede usarse convenientemente, por ejemplo, en ajustes clínicos para diagnosticar pacientes que muestren síntoma o historial familiar de una enfermedad o dolencia que implique un gen 14911.

Además, puede utilizarse cualquier tipo celular o tejido en el que se exprese 14911 en los ensayos de pronóstico
 10 descritos en este documento.

3. Control de los Efectos durante los ensayos clínicos

El control de la influencia de los agentes (por ejemplo, fármacos o compuestos) sobre la expresión o actividad de
 15 una proteína 14911 puede aplicarse no sólo en una exploración básica de fármacos sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente determinada por un ensayo de exploración como se describe en este documento para aumentar la expresión génica, los niveles de proteínas de 14911, o regular al alza la actividad de 14911, puede controlarse en ensayos clínicos de sujetos que muestran expresión génica, niveles de proteínas de 14911 disminuidas, o actividad de 14911 regulada a la baja. Como alternativa, la eficacia de un agente determinada por un ensayo
 20 de exploración para disminuir la expresión génica, niveles de proteínas de 14911, o regular a la baja la actividad de 14911, puede controlarse en ensayos clínicos de sujetos que muestran expresión génica, niveles de proteínas de 14911 aumentados, o actividad de 14911 regulada al alza. En dichos ensayos clínicos, la expresión o actividad de un gen 14911, y preferiblemente, otros genes que han estado implicados en un trastorno pueden usarse como una "lectura" de marcadores del fenotipo de una célula particular.

Por ejemplo, y no a modo de limitación, los genes, incluyendo 14911, que se modulan en las células mediante
 tratamiento con un agente (por ejemplo, compuesto, fármaco o pequeña molécula) que modula la actividad de 14911 (por ejemplo, identificado en un ensayo de exploración como se ha descrito en este documento) pueden ser idénticos. Por tanto, para estudiar el efecto de agentes en un trastorno asociado con 14911, por ejemplo, en un ensayo clínico,
 30 pueden aislarse células y prepararse y analizarse ARN para los niveles de expresión de 14911 y otros genes implicados en el trastorno asociado con 14911, respectivamente. Los niveles de expresión génica (es decir, el patrón de expresión génica) pueden cuantificarse mediante análisis de transferencia de Northern o RT-PCR, como se ha descrito en este documento, o como alternativa midiendo la cantidad de proteína producida, mediante uno de los procedimientos como se ha descrito en este documento, o midiendo los niveles de actividad de 14911 u otros genes. De este modo, el
 35 patrón de expresión génica puede servir como marcador, indicativo de la respuesta fisiológica de las células al agente. Por consiguiente, este estado de respuesta puede determinarse antes, y en diversos puntos durante el tratamiento del individuo con el agente.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para controlar la eficacia de
 40 tratamiento a un sujeto con un agente, (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, pequeña molécula, u otro fármaco candidato identificado mediante los ensayos de exploración descritos en este documento) que comprende las etapas de (i) obtener una muestra de pre-administración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de una proteína, ARNm, o ADN genómico 14911 en la muestra pre-administración; (iii) obtener una o más muestras post-administración del sujeto; (iv) detectar el nivel
 45 de expresión de una proteína, ARNm, o ADN genómico 14911 en las muestras post-administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad de la proteína, ARNm, o ADN genómico 14911 en la muestra pre-administración con la proteína, ARNm, o ADN genómico 14911 en la muestra o muestras post-administración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto en consecuencia. Por ejemplo, la administración aumentada del agente puede ser deseable para aumentar la expresión o actividad de 14911 a niveles más altos que los detectados, es decir, para
 50 aumentar la eficacia del agente. Como alternativa, la administración disminuida del agente puede ser deseable para disminuir la expresión o actividad de 14911 a niveles más bajos que los detectados, es decir para disminuir la eficacia del agente. De acuerdo con dicha realización, la expresión o actividad de 14911 puede usarse como indicador de la eficacia de un agente, incluso en ausencia de una respuesta fenotípica observable.

4. Uso de Moléculas 14911 como Marcadores Sustitutos

Las moléculas 14911 de la invención son también útiles como marcadores de trastornos o estados de enfermedad, como marcadores para precursores de estados de enfermedad, como marcadores de predisposición a estados de enfermedad, como marcadores de actividad de fármacos, o como marcadores del perfil farmacogenómico de un sujeto.
 60 Usando los procedimientos descritos en este documento, la presencia, ausencia y/o cantidad de las moléculas 14911 de la invención puede detectarse, y puede ponerse en correlación con uno o más estados biológicos *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas 14911 de la invención pueden servir como marcadores sustitutos para uno o más trastornos o estados de enfermedad o para afecciones que conducen a estados de enfermedad. Como se usa en este documento, un "marcador sustituto" es un marcador bioquímico objetivo que tiene correlación con la ausencia o presencia de una enfermedad o
 65 trastorno, o con la evolución de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, con la presencia o ausencia de un tumor). La presencia o cantidad de dichos marcadores es independiente de la enfermedad. Por lo tanto, estos marcadores pueden servir para indicar si un particular curso de tratamiento es eficaz para aliviar un estado de enfermedad o trastorno. Los marcadores sustitutos son de uso particular cuando la presencia o alcance de un estado de enfermedad o trastorno es

difícil de evaluar a través de metodologías convencionales (por ejemplo, estados tempranos de tumores), o cuando se desea una evaluación de la evolución de la enfermedad antes de que se alcance un criterio de valoración clínico potencialmente peligroso (por ejemplo, una evaluación de una enfermedad cardiovascular puede hacerse usando niveles de colesterol como marcador sustituto, y un análisis de la infección por VIH puede hacerse usando niveles de ARN de VIH como marcador sustituto, mucho antes de las consecuencias no deseadas del infarto de miocardio o SIDA desarrollado por completo). Ejemplos del uso de marcadores sustitutos en la técnica incluyen: Kooem y col. (2000) *J. mass Spectrom.* 35: 258-265; y James (1994) *AIDS Treatment News Archive* 209.

Las moléculas 14911 de la invención son también útiles como marcadores farmacodinámicos. Como se usa en este documento, un “marcador farmacodinámico” es un marcador bioquímico objetivo que tiene correlación específicamente con efectos de los fármacos. La presencia o cantidad de un marcador farmacodinámico no se relaciona con el estado de enfermedad o trastorno para el que se está administrando el fármaco; por lo tanto, la presencia o cantidad del marcador es indicativa de la presencia o actividad del fármaco en un sujeto. Por ejemplo, un marcador farmacocinético puede ser indicativo de la concentración del fármaco en un tejido biológico, en el que el marcador se expresa o transcribe o no se expresa o transcribe en este tejido en relación con el nivel del fármaco. De esta manera, la distribución o captación del fármaco puede controlarse mediante el marcador farmacodinámico. De forma similar, la presencia o cantidad del marcador farmacodinámico puede relacionarse con la presencia o cantidad del producto metabólico de un fármaco, de modo que la presencia o cantidad del marcador es indicativa de la tasa de descomposición relativa del fármaco *in vivo*. Los marcadores farmacodinámicos son de uso particular para aumentar la sensibilidad de la detección de efectos de fármacos, particularmente cuando el fármaco se administra a dosis bajas. Puesto que incluso una pequeña cantidad de un fármaco puede ser suficiente para activar múltiples rondas de transcripción o expresión de marcador (por ejemplo, un marcador 14911), el marcador amplificador puede estar en una cantidad que es mucho más fácilmente detectable que el propio fármaco. Además, el marcador puede detectarse más fácilmente debido a la naturaleza del propio marcador; por ejemplo, usando los procedimientos descritos en este documento, pueden emplearse anticuerpos anti-14911 en un sistema de detección basado en inmunidad para un marcador de proteínas, o pueden usarse sondas específicas para 14911 radiomarcadas para detectar un marcador de ARNm 14911. Además, el uso de un marcador farmacodinámico puede ofrecer predicciones basadas en el mecanismo del riesgo debido al tratamiento de fármacos más allá del intervalo de posibles observaciones directas. Ejemplos del uso de marcadores farmacodinámicos en la técnica incluyen: Matsuda y col. US 6.0033.862; Tais y col. (1991) *Env. Health Perpect.* 90: 229-238; Schentag (1999) *AM. J. Health-Syst. Pharm.* 56 Suppl. 3: S21-S24; y Nicolau (1999) *AM, J. Health-Syst. Pharm.* 56 Suppl. 3: S16-S20.

Las moléculas 14911 de la invención son también útiles como marcadores farmacogenómicos. Como se usa en este documento, un “marcador farmacogenómico” es un marcador bioquímico objetivo que tiene correlación con una respuesta o susceptibilidad clínica específica a un fármaco en un sujeto (Véase, por ejemplo, McLeod y col. (1999) *Eur. J. Cancer* 35(12): 1650-1652). La presencia o cantidad del marcador farmacogenómico se relaciona con la respuesta predicha del sujeto a un fármaco o clase de fármacos específica antes de la administración del fármaco. Evaluando la presencia o cantidad de uno o más marcadores farmacogenómicos en un sujeto, puede seleccionarse una terapia de fármacos que sea la más apropiada para el sujeto, o que se prevé que tenga un mayor grado de éxito. Por ejemplo, en base a la presencia o cantidad de ARN, o proteína (por ejemplo, proteína o ARN 14911) para marcadores tumorales específicos en un sujeto, puede seleccionarse un fármaco o un curso de tratamiento que esté optimizado para el tratamiento del tumor específico que es probable esté presente en el sujeto. De forma similar, la presencia o ausencia de una mutación específica de secuencia en el ADN 14911 puede tener correlación con la respuesta al fármaco de 14911. El uso de marcadores farmacogenómicos permite por lo tanto, la aplicación del tratamiento más apropiado para cada sujeto sin tener que administrar la terapia.

C. Procedimientos de Tratamiento

La presente invención proporciona procedimientos profilácticos y terapéuticos para tratar un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con expresión o actividad aberrante de 14911. Con respecto a los procedimientos profilácticos y terapéuticos de tratamiento, dichos tratamientos deben adaptarse o modificarse específicamente, en base al conocimiento obtenido del campo de la farmacogenómica. Como se usa en este documento, el término “tratamiento” se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislada de un paciente, que tienen una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el fin de curar, sanar, aliviar, paliar, alterar, remediar, hacer mejoras en, favorecer o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad. Un agente terapéutico incluye, aunque sin limitación, pequeñas moléculas, péptidos, anticuerpos, ribozimas y oligonucleótidos antisentido. “Farmacogenómica”, como se usa en este documento, se refiere a la aplicación de tecnologías de genómica tales como secuenciación génica, genética estadística, y análisis de la expresión génica de fármacos en el desarrollo clínico y en el mercado. Más específicamente, el término se refiere al estudio de cómo los genes de un paciente determinan su respuesta a un fármaco (por ejemplo, el “fenotipo de respuesta a un fármaco”, o el “genotipo de respuesta a un fármaco” de un paciente). Por tanto, otro aspecto de la invención proporciona procedimientos para adaptar un tratamiento profiláctico o terapéutico adicional de un individuo con las moléculas 14911 de la presente invención o moduladores de 14911 de acuerdo con el genotipo de respuesta al fármaco de ese individuo. La farmacogenómica permite a un médico o doctor dirigir tratamientos profilácticos o terapéuticos a pacientes que se beneficiarán al máximo del tratamiento y evitar el tratamiento a pacientes que experimentarán efectos secundarios tóxicos relacionados con el fármaco.

Por tanto, las moléculas 14911 pueden actuar como nuevas dianas de diagnóstico y agentes terapéuticos para controlar uno o más trastornos. Ejemplos de dichos trastornos, por ejemplo, trastornos asociados con quinasa u otros trastornos asociados con 14911, incluyen aunque sin limitación, trastornos proliferativos y/o de diferenciación celular, trastornos asociados con el metabolismo óseo, trastornos inmunes, por ejemplo, inflamatorios, trastornos cardiovasculares, incluyendo trastornos de las células endoteliales, trastornos del hígado, trastornos víricos, trastornos del dolor o metabólicos.

La expresión y/o actividad aberrante de moléculas 14911 puede mediar trastornos asociados con el metabolismo óseo. “Metabolismo óseo” se refiere a efectos directos o indirectos en la formación o degeneración de estructuras óseas, por ejemplo, formación del hueso, reabsorción del hueso, etc., que puede afectar en última instancia a las concentraciones de calcio y fosfato en el suero. Esta expresión también incluye actividades mediadas por los efectos de las moléculas 14911 en las células óseas, por ejemplo, osteoclastos y osteoblastos, que pueden a su vez dar como resultado la formación y degeneración del hueso. Por ejemplo, las moléculas 14911 pueden apoyar ciertas actividades de los osteoclastos que reabsorben el hueso, tales como la estimulación de la diferenciación de monolitos y fagocitos mononucleares en osteoclastos. Por consiguiente, las moléculas 14911 que modulan la producción de células óseas pueden influir en la formación y degeneración del hueso, y pueden por tanto, usarse para tratar trastornos óseos. Ejemplos de dichos trastornos incluyen, aunque sin limitación, osteoporosis, osteodistrofia, osteomalacia, raquitismo, osteitis fibrosa quística, osteodistrofia renal, osteosclerosis, tratamiento anti-convulsivo, fibrogénesis imperfecta ósea, hiperparatiroidismo secundario, hipoparatiroidismo, hiperparatiroidismo, cirrosis, ictericia obstructiva, metabolismo inducido por fármacos, carcinoma medular, enfermedad renal crónica, raquitismo, sarcoidosis, antagonismo a glucocorticoides, síndrome de malabsorción, esteatorrea, esprué tropical, hipercalcemia idiopática y fiebre de la leche.

El ácido nucleico y proteína 14911 de la invención pueden usarse para tratar y/o diagnosticar diversos trastornos inmunes, por ejemplo, inflamatorios, (por ejemplo, inflamatorios respiratorios). Ejemplos de trastornos o enfermedades inmunes incluyen, aunque sin limitación, enfermedades autoinmunes (incluyendo, por ejemplo, diabetes mellitas, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psorática), esclerosis múltiple, encefalomiелitis, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eczematosa), psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad intestinal inflamatoria, por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, asma, asma alérgico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, vaginitis, proctitis, erupciones de fármaco, reacciones leprosas inversas, eritema nudoso leproso, uveitis autoinmune, encefalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición sensorineural bilateral progresiva idiopática, anemia aplásica, anemia de los hematocritos puros, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprué idiopático, liquen plano, enfermedad de Grave, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveitis posterior y fibrosis pulmonar intersticial), enfermedad injerto contra huésped, casos de transplante, y alergia tal como alergia atópica.

Ejemplos de trastornos que implican al corazón o “trastorno cardiovasculares” incluyen, aunque sin limitación, una enfermedad, trastorno, o estado que implica al sistema cardiovascular, por ejemplo, el corazón, los vasos sanguíneos, y/o la sangre. Un trastorno cardiovascular puede estar causado por un desequilibrio en la presión arterial, un mal funcionamiento del corazón, o una oclusión de un vaso sanguíneo, por ejemplo, por un trombo. Ejemplos de trastornos cardiovasculares incluyen, aunque sin limitación, hipertensión, aterosclerosis, espasmo arterial coronario, enfermedad arterial coronaria, arritmias, fallo cardíaco, incluyendo aunque sin limitación, hipertrofia cardíaca, fallo cardíaco del lado izquierdo y fallo cardíaco del lado derecho; enfermedad cardíaca isquémica, incluyendo aunque sin limitación angina de pecho, infarto de miocardio, enfermedad cardíaca isquémica crónica, y muerte súbita cardíaca; enfermedad cardíaca hipertensa, incluyendo aunque sin limitación, enfermedad cardíaca hipertensa sistémica (del lado izquierdo) y enfermedad cardíaca hipertensa pulmonar (del lado derecho); enfermedad cardíaca vascular, incluyendo aunque sin limitación, degeneración valvular provocada por calcificación tal como calcificación de una válvula aórtica congénitamente bicuspidal, y calcificación mitral anular, y degeneración mixomatosa de la válvula mitral (prolapso de la válvula mitral), fiebre reumática y enfermedad cardíaca reumática, endocarditis infecciosa, y vegetaciones no infecciosas, tales como endocarditis tromboide no bacteriana y endocarditis del lupus eritematoso sistémico (enfermedad de Libman-Sacks), enfermedad cardíaca carcinoide, y complicaciones de las válvulas artificiales; enfermedad miocárdica, incluyendo aunque sin limitación, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva, y miocarditis; enfermedad pericárdica, incluyendo aunque sin limitación, efusión pericárdica y hemopericardio y pericarditis, incluyendo pericarditis aguda y pericarditis sanada, y enfermedad cardíaca reumatoide; enfermedad cardíaca neoplásica, incluyendo aunque sin limitación, tumores cardíacos primarios, tales como mixoma, lipoma, fibroelastoma papilar, rabdomioma, y sarcoma, y efectos cardíacos de neoplasmas no cardíacos; enfermedad cardíaca congénita, incluyendo aunque sin limitación, cianosis tardía de izquierda a derecha, tal como defecto septal del atrio, defecto septal ventricular, ductus arterioso permeable, y defecto septal atrioventricular, cianosis temprana de derecha a izquierda, tal como tetralogía de Fallot, transposición de las grandes arterias, truncus arterioso, atresia tricúspide, y conexión venosa pulmonar total anómala, anomalías obstructivas congénitas, tales como acortamiento de la aorta, atresia y estenosis pulmonar, y atresia y estenosis aórtica, trastornos que implican transplantes cardíacos, y fallo cardíaco congestivo.

Una enfermedad o trastorno cardiovascular incluye también un trastorno celular endotelial.

Como se usa en este documento, un “trastorno celular endotelial” incluye un trastorno caracterizado por actividad celular endotelial aberrante, sin regular, o no deseada, por ejemplo, proliferación, migración, angiogénesis, o vascularización; o expresión aberrante de moléculas de adhesión a la superficie celular o genes asociados con la an-

giogénesis, por ejemplo, TIE-2, FLT y FLK. Trastornos de células endoteliales incluyen tumorigénesis, metástasis tumoral, psoriasis, retinopatía diabética, endometriosis, enfermedad de Grave, enfermedad isquémica (aterosclerosis), y enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, artritis reumatoide).

5 Los trastornos que pueden tratarse o diagnosticarse mediante procedimientos descritos en este documento incluyen, aunque sin limitación, trastornos asociados con una acumulación en el hígado de tejido fibroso, tal como el
 10 resultante de un desequilibrio entre la producción y la degradación de la matriz extracelular acompañada por el colapso y condensación de las fibras preexistentes. Los procedimientos descritos en este documento pueden usarse para diagnosticar o tratar necrosis hepatocelular o lesiones inducidas por un amplia diversidad de agentes incluyendo procedimientos que alteran la homeostasis, tales como proceso inflamatorio, daño tisular resultante de lesión tóxica o
 15 flujo sanguíneo hepático, e infecciones (por ejemplo, bacteriana, vírica y parasitaria). Por ejemplo, los procedimientos pueden usarse para la detección temprana de lesión hepática, tal como hipertensión portal o fibrosis hepática. Además, los procedimientos pueden emplearse para detectar fibrosis del hígado atribuida a errores innatos del metabolismo, por ejemplo, fibrosis resultante de un trastorno de almacenamiento tal como enfermedad de Gaucher (anormalidades
 20 lipídicas) o una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, deficiencia de antitripsina-A1; un trastorno que media en la acumulación (por ejemplo, almacenamiento) de una sustancia exógena, por ejemplo, hemocromatosis (síndrome de la sobrecarga de hierro) y enfermedades del almacenamiento de cobre (enfermedad de Wilson), trastornos que dan como resultado la acumulación de un metabolito tóxico (por ejemplo, tirosinemia, fructosemia y galactosemia) y trastornos peroxisomiales (por ejemplo, síndrome de Zellweger). Adicionalmente, los procedimientos descritos en este documento pueden usarse para la detección temprana y tratamiento de enfermedades del hígado asociadas con la
 25 administración de diversos productos químicos o fármacos, tales como por ejemplo, metotrexato, isoniazida, axifenisatina, metildopa, clorpropazina, tolbutamida o alcohol, o que representa una manifestación hepática de un trastorno cardiovascular tal como obstrucción del flujo biliar intra o extrahepático o una alteración en la circulación hepática resultante, por ejemplo, de fallo cardíaco crónico, enfermedad veno-oclusiva, trombosis de la vena portal o síndrome de Budd-Chiari.

Adicionalmente, las moléculas 14911 pueden jugar un papel importante en la etiología de ciertas enfermedades víricas, incluyendo aunque sin limitación Hepatitis B, Hepatitis C, y virus del herpes simples (VHS). Los moduladores de la actividad de 14911 podrían usarse para controlar enfermedades víricas. Los moduladores podrían usarse en el
 30 tratamiento y/o diagnóstico de tejido infectado por virus o fibrosis tisular asociada a virus, especialmente fibrosis del hígado y el hígado. Además, los moduladores de 14911 pueden usarse en el tratamiento de carcinoma asociado a virus, especialmente cáncer hepatocelular.

Adicionalmente, las 14911 pueden jugar un papel importante en la regulación de trastornos del metabolismo y del
 35 dolor. Las enfermedades del desequilibrio metabólico incluyen, aunque sin limitación, obesidad, anorexia nerviosa, cachexia, trastornos lipídicos, y diabetes. Ejemplos de trastornos del dolor incluyen, aunque sin limitación, respuesta al dolor provocada durante diversas formas de lesión tisular, por ejemplo, inflamación, infección, e isquemia, normalmente denominada hiperalgesia (descritas en, por ejemplo, Campos H.L. (1987) Pain, New York: McGraw-Hill); dolor asociado con trastornos musculoesqueléticos, por ejemplo, dolor articular; dolores de cabeza; dolor asociado
 40 con cirugía; dolor relacionado con síndrome de intestino irritable; o dolor del pecho.

1. Procedimientos profilácticos

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para prevenir en un sujeto una enfermedad o afección
 45 asociada con una expresión o actividad aberrante de 14911, por medio de la administración al sujeto de 14911 o un agente que modula la expresión de 14911 o al menos una actividad de 14911. Los sujetos con riesgo de una enfermedad que se produce o a la que contribuye la expresión o actividad aberrante de 14911 pueden identificarse, por ejemplo, por cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico como los descritos en este documento. La administración de un agente profiláctico puede realizarse antes de la manifestación de síntomas característicos de
 50 la aberración de 14911, de tal manera que se prevenga una enfermedad o trastorno o, como alternativa, se retrase su progresión. Dependiendo del tipo de aberración de 14911 puede usarse, por ejemplo, 14911, un agonista de 14911 o un antagonista de 14911 para tratar al sujeto. El agente apropiado puede determinarse basándose en ensayos de selección descritos en este documento.

2. Procedimientos Terapéuticos

Otro aspecto de la invención se refiere a procedimientos para modular la expresión o actividad de 14911 con fines
 terapéuticos. Por consiguiente, en una realización ilustrativa, el procedimiento modulador de la invención implica poner en contacto una célula con 14911 o un agente que modula una o más de las actividades de la proteína 14911
 60 asociadas con la célula. Un agente que modula la actividad de la proteína 14911 puede ser un agente como se describe en este documento, tal como un ácido nucleico o una proteína, una molécula diana natural de una proteína 14911 (por ejemplo, un sustrato de fosforilación de 14911), un anticuerpo contra 14911, un agonista o antagonista de 14911, un peptidomimético de un agonista o antagonista de 14911, u otra molécula pequeña. En una realización, el agente estimula una o más actividades de 14911. Los ejemplos de estos agentes estimuladores incluyen la proteína 14911
 65 activa y una molécula de ácido nucleico que codifica 14911 que se ha introducido en la célula. En otra realización, el agente inhibe una o más actividades de 14911. Los ejemplos de estos agentes inhibidores incluyen moléculas de ácido nucleico de 14911 antisentido, anticuerpos anti-14911 e inhibidores de 14911. Estos procedimientos moduladores pueden realizarse *in vitro* (por ejemplo, por medio del cultivo de la célula con el agente) o, como alternativa, *in vivo*

(por ejemplo, por medio de la administración del agente a un sujeto). Como tal, la presente invención proporciona procedimientos para tratar a un individuo que padece una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión o actividad aberrante de una proteína o molécula de ácido nucleico de 14911. En una realización, el procedimiento implica administrar un agente (por ejemplo, un agente identificado por un ensayo de selección descrito en este documento) o una combinación de agentes que modulan (por ejemplo, regulan positiva o negativamente) la expresión o actividad de 14911. En otra realización, el procedimiento implica la administración de una proteína o molécula de ácido nucleico de 14911 como terapia para compensar la expresión o actividad aberrante o reducida de 14911.

La estimulación de la actividad de 14911 es deseable en situaciones en las que la proteína 14911 está regulada negativamente de forma anormal y/o en las que es probable que un aumento de la actividad de 14911 tenga un efecto beneficioso. De manera similar, la inhibición de la actividad de 14911 es deseable en situaciones en las que la proteína 14911 está regulada positivamente de forma anormal y/o en las que es probable que una disminución de la actividad de 14911 tenga un efecto beneficioso.

3. Farmacogenómica

Las moléculas de 14911 de la presente invención, así como los agentes o moduladores que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad de 14911 (por ejemplo, la expresión del gen 14911), identificados por un ensayo de selección descrito en este documento, pueden administrarse a los individuos para tratar (profiláctica o terapéuticamente) trastornos (por ejemplo, trastorno cardiovasculares tales como insuficiencia cardíaca congestiva) asociados con una actividad aberrante de 14911. Junto con dicho tratamiento, puede considerarse la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y la respuesta de ese individuo a un compuesto o fármaco extraño). Las diferencias en el metabolismo de agentes terapéuticos pueden ocasionar una toxicidad grave o fallo terapéutico al alterar la relación entre la dosis y la concentración sanguínea del fármaco farmacológicamente activo. De esta manera, un médico puede considerar la aplicación del conocimiento obtenido en estudios farmacogenómicos relevantes en la determinación de si se administra una molécula de 14911 o modulador de 14911, así como adaptar la dosificación y/o régimen terapéutico del tratamiento con una molécula de 14911 o modulador de 14911.

La farmacogenómica trata de variaciones hereditarias clínicamente significativas en la respuesta a fármacos debido a la alteración de la disposición del fármaco y su acción anormal en personas afectadas. Véase, por ejemplo, Eichelbaum, M. *et al.* (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23 (10-11):983-985 y Linder, M.V., *et al.* (1997) *Clin. Chem.* 43(2):254-266. En general, pueden diferenciarse dos tipos de condiciones farmacogenéticas. Condiciones genéticas transmitidas como un solo factor que altera la manera en la que actúan los fármacos sobre el cuerpo (acción alterada del fármaco) o condiciones genéticas transmitidas como factores individuales que alteran la manera en la que el cuerpo actúa sobre los fármacos (metabolismo alterado del fármaco). Estas condiciones farmacogenéticas pueden producirse como defectos genéticos raros o como polimorfismos naturales. Por ejemplo, la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía hereditaria común en la que la complicación clínica principal es la hemólisis después de la ingestión de fármacos oxidantes (antimaláricos, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y del consumo de habas.

Una estrategia farmacogenómica para identificar genes que predicen la respuesta al fármaco, conocida como “asociación de genoma completo”, se basa principalmente en un mapa de alta resolución del genoma humano que consta de marcadores relacionados con genes ya conocidos (por ejemplo, un mapa de marcadores de genes “bialelicos” que consta de 60.000-100.000 sitios polimórficos o variables en el genoma humano, de los que cada uno tiene dos variantes). Este mapa genético de alta resolución puede compararse con un mapa del genoma de cada uno de un número estadísticamente significativo de pacientes que participan en un ensayo de fármacos de Fase II/III para identificar marcadores asociados con una respuesta a los fármacos observada o efecto secundario particular. Como alternativa, este mapa de alta resolución puede generarse a partir de una combinación de unos diez millones de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) conocidos en el genoma humano. Como se usa en este documento, un “SNP” es una alteración común que tiene lugar en una sola base nucleotídica en un tramo de ADN. Por ejemplo, puede producirse un SNP cada 1000 bases de ADN. Un SNP puede estar implicado en un proceso de enfermedad, sin embargo, la inmensa mayoría no están asociados con enfermedades. Dado un mapa genético basado en la aparición de dichos SNP, los individuos pueden agruparse en categorías genéticas dependiendo de un modelo particular de SNP en su genoma individual. De esta manera, los regímenes de tratamiento pueden adaptarse a grupos de individuos genéticamente similares, teniendo en cuenta rasgos que pueden ser comunes entre estos individuos genéticamente similares.

Como alternativa, puede utilizarse un procedimiento denominado “la estrategia del gen candidato” para identificar genes que predicen una respuesta al fármaco. De acuerdo con este procedimiento, si se conoce un gen que codifica un fármaco diana (por ejemplo, una proteína 14911 o un receptor de 14911 de la presente invención), todas las variantes comunes de ese gen pueden identificarse de una manera bastante sencilla en la población y puede determinarse si la posesión de una versión del gen frente a otra está asociada con una respuesta particular al fármaco.

Como realización ilustrativa, la actividad de ciertas enzimas metabolizadoras de fármacos es un determinante principal tanto de la intensidad como de la duración de la acción de un fármaco. El descubrimiento de polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de fármacos (por ejemplo, N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y enzimas del citocromo P450 CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación en cuanto a por qué algunos pacientes no consiguen los efectos esperados del fármaco o muestran una respuesta exagerada al fármaco y toxicidad grave después de tomar una dosis convencional y segura del fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos de la población, el

metabolizador extensivo (EM) y el metabolizador deficiente (PM). La prevalencia de PM es diferente entre diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica CYP2D6 es muy polimórfico y se han identificado varias mutaciones en PM, que conducen a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores deficientes de CYP2D6 y CYP2C19 experimentan con bastante frecuencia una respuesta exagerada al fármaco y efectos secundarios cuando reciben dosis convencionales. Si un metabolito es el resto terapéutico activo, PM no muestra ninguna respuesta terapéutica, como se demuestra para el efecto analgésico de la codeína mediado por su metabolito formado por CYP2D6, morfina. El otro extremo son los denominados metabolizadores ultrarrápidos que no responden a dosis convencionales. Recientemente, se ha identificado que la base molecular del metabolismo ultrarrápido se debe a la amplificación del gen de CYP2D6.

Como alternativa, puede utilizarse un procedimiento denominado el “perfilado de expresión génica” para identificar genes que predicen la respuesta al fármaco. Por ejemplo, la expresión génica de un animal al que se le ha administrado un fármaco (por ejemplo, una molécula de 14911 o modulador de 14911 de la presente invención) puede dar una indicación de si se han activado rutas génicas relacionadas con la toxicidad.

Puede usarse la información generada a partir de más de una de las estrategias farmacogenómicas anteriores para determinar la dosificación y los regímenes de tratamiento apropiados para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o selección de un fármaco, puede evitar reacciones adversas o fallos terapéuticos y de esta manera mejorar la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un sujeto con una molécula 14911 o un modulador de 14911, tal como un modulador identificado por uno de los ensayos de selección ilustrativos descritos en este documento.

Esta invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deben considerarse limitantes. El contenido de todas las referencias, patentes y publicaciones de solicitudes de patente citadas a lo largo de esta solicitud se incorporan en este documento como referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1

Expresión y distribución tisular del ARNm de 14911

Se usó RT-PCT cuantitativa a tiempo real TaqMan para detectar la presencia de una transcripción de ARN correspondiente a la proteína 14911 humana en varios tejidos. Se descubrió que los ortólogos correspondientes de 14911 se expresan en una diversidad de tejidos o líneas celulares. Los resultados de esta selección se muestran en las Figuras 6-14.

Se usó PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) para detectar la presencia de la transcripción de ARN correspondiente a 14911 humano en el ARN preparado a partir de tejidos tumorales y normales. Se evaluaron niveles de expresión relativos de 14911 en célula cerebrales y pulmonares usando PCR TaqMan y se encontró un aumento de la expresión en 2/5 líneas de células tumorales de pulmón en comparación con un control de epitelio bronquial humano normal (NHBE); 5/8 muestras de tumor de pulmón en comparación con tejido pulmonar normal; y 2/4 muestras de tumor de pulmón en comparación con un control de epitelio bronquial humano normal (NHBE). Los resultados de esta comparación se muestran en las Figuras 6-8, respectivamente. La Figura 9 indica algún aumento de la expresión en DLD-1, NCIH125 y tejidos de tumor pulmonar. También se encontró un aumento de la expresión en 3/3 muestras de glioma en comparación con tejidos cerebrales normales como se muestra en la Figura 10. Además, se encontró un aumento de la expresión en 3/6 muestras de tumor cerebral en comparación con los tejidos cerebrales normales como se muestra en la Figura 12.

En la Figura 11 se muestra la regulación negativa de los niveles de expresión de 14911 en 7/8 tumores de mama. La Figura 12 también muestra una baja expresión en tumor de mama.

También se encontró un aumento de la expresión en 2/3 muestras de metástasis de colon y 1/7 muestras de tumor de colon en comparación con tejidos de colon normales, como se muestra en la Figura 13.

La figura 14 ilustra los niveles de expresión relativos y la distribución en tejidos del gen 14911 en diversos tejidos usando PCR TaqMan.

Los resultados del perfilado de expresión usando técnicas de hibridación *in situ* han demostrado que se ha detectado ARNm de 14911 en tumores humanos de colon, pulmón, cerebro y mama. Se ha demostrado expresión positiva de 14911 en 2/4 tumores de pulmón en comparación con la ausencia de expresión, 0/2, en muestras de tejido pulmonar normal. Además, se ha demostrado que 14911 se expresa tanto en tumores como en tejidos normales, específicamente en 1/4 muestras de tumores de colon y 1/1 muestras de tejido de colon normal, 1/2 tumores de mama y 1/1 muestras de tejido de mama normal; y 1/3 tumores cerebrales y 2/2 muestras de tejido cerebral normal.

Como se ve por estos resultados, se ha descubierto que en algunas células tumorales están sobre o infraexpresadas moléculas 14911, pudiendo estar propagando estas moléculas de manera inapropiada señales de proliferación celular o de supervivencia celular. Como tales, las moléculas 14911 pueden servir como identificadores específicos y nuevos de estas células tumorales. Además, los inhibidores de las moléculas 14911 también son útiles para el tratamiento de

cánceres tales como el cáncer cerebral, metástasis de colon y cáncer pulmonar y preferiblemente cáncer pulmonar, y son útiles como diagnóstico. Además, los activadores de las moléculas 14911 también son útiles para el tratamiento de cánceres, preferiblemente el cáncer de mama, y útiles como diagnóstico.

5 Ejemplo 2

Expresión de proteína 14911 recombinante en células bacterianas

En este ejemplo, 14911 se expresa como un polipéptido de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) recombinante en *E. coli* y se aísla y caracteriza el polipéptido de fusión. Específicamente, se fusiona 14911 a GST y este polipéptido de fusión se expresa en *E. coli*, por ejemplo, en la cepa PEB199. La expresión de la proteína de fusión GST-14911 en PEB199 se induce por IPTG. El polipéptido de fusión recombinante se purifica a partir de lisados bacterianos brutos de la cepa de PEB199 inducida por cromatografía de afinidad sobre perlas de glutatión. Usando un análisis electroforético en gel de poliacrilamida del polipéptido purificado a partir de los lisados bacterianos, se determina el peso molecular del polipéptido de fusión resultante.

Ejemplo 3

Expresión de proteína 14911 recombinante en células COS

Para expresar el gen 14911 en células COS, se usa el vector pcDNA/Amp de Invitrogen Corporation (San Diego, CA). Este vector contiene un origen de replicación de SV40, un gen de resistencia a ampicilina, un origen de replicación de *E. coli*, un promotor de CMV seguido de una región de poliengarce, y un intrón y sitio de poliadenilación de SV40. En la región de poliengarce del vector se clona un fragmento de ADN que codifica la proteína 14911 entera y una señal HA (Wilson *et al* (1984) *Cell* 37:767) o una señal FLAG fusionada en fase a su extremo 3' del fragmento, poniendo de esta manera la expresión de la proteína recombinante bajo el control del promotor de CMV.

Para construir el plásmido, la secuencia de ADN de 14911 se amplifica por PCR usando dos cebadores. El cebador 5' contiene el sitio de restricción de interés seguido de aproximadamente veinte nucleótidos de la secuencia codificante de 14911 que empieza desde el codón de iniciación; la secuencia 3' terminal contiene secuencias complementarias al otro sitio de restricción de interés, un codón de detención de la traducción, la señal HA o la señal FLAG y los últimos 20 nucleótidos de la secuencia codificante de 14911. El fragmento amplificado por PCR y el vector pCDNA/Amp se digieren con las enzimas de restricción apropiadas y el vector se desfosforila usando la enzima CIAP (New England Biolabs, Beverly, MA). Preferiblemente, los dos sitios de restricción elegidos son diferentes de manera que el gen 14911 se inserte en la orientación correcta. La mezcla de unión se usa para transformar células *E. coli* (pueden usarse cepas HB101, DH5 α , SURE, disponible en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA), el cultivo transformado se pone en placas con medio de ampicilina y se seleccionan las colonias resistentes. El ADN plasmídico se aísla a partir de los transformantes y se examina por análisis de restricción la presencia del fragmento correcto.

Posteriormente, se transfectan células COS con ADN plasmídico de 14911-pcDNA/Amp usando los procedimientos de co-precipitación con fosfato cálcico o cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Pueden encontrarse otros procedimientos adecuados para transfectar células hospedadoras en Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. La expresión del polipéptido VR-3 o VR-5 se detecta por radiomarcaje (pueden usarse ³⁵S-metionina o ³⁵S-cisteína disponible en NEN, Boston, MA) e inmunoprecipitación (Harlow, E. y Lane, D. *Anticuerpos: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988) usando un anticuerpo monoclonal con especificidad por HA. En resumen, las células se marcan durante 8 horas con ³⁵S-metionina (o ³⁵S-cisteína). Después, el medio de cultivo se recoge y las células se lisan usando detergentes (tampón RIPA, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, SDS al 0,1%, DOC al 0,5%, Tris 50 mM, pH 7,5). Tanto el lisado celular como el medio de cultivo se precipitan con un anticuerpo monoclonal específico para HA. Los polipéptidos precipitados después se analizan por SDS-PAGE.

Como alternativa, el ADN que contiene la secuencia codificante de 14911 se clona directamente en el poliengarce del vector pCDNA/Amp usando los sitios de restricción apropiados. El plásmido resultante se utiliza para transfectar células COS de la manera descrita anteriormente y la expresión del polipéptido 14911 se detecta por radiomarcaje e inmunoprecipitación usando un anticuerpo monoclonal específico para 14911.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico 14911 aislada seleccionada del grupo constituido por:

a) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:2, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc del plásmido depositado con el ATCC como Número de Acceso PTA-3435; y

b) una molécula de ácido nucleico constituida por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°:1, o una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°:3, o la secuencia de nucleótidos del inserto de ADN del plásmido depositado con el ATCC como Número de Acceso PTA-3435.

2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, que es la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°:1

3. Una célula huésped que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

4. Un polipéptido 14911 aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:2.

5. Un procedimiento para producir un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:2, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc del plásmido depositado con el ATCC como Número de Acceso PTA-3435, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 3 en condiciones en las que la molécula de ácido nucleico se exprese.

6. Un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico en una muestra, que comprende:

a) poner en contacto la muestra con un compuesto que hibrida de forma selectiva con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o se une al polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico; y

b) determinar si el compuesto hibrida con el ácido nucleico o se une al polipéptido en la muestra.

7. Un kit que comprende un compuesto que hibrida de forma selectiva con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o un anticuerpo que se une de forma específica a un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico e instrucciones para uso.

8. Un procedimiento para identificar un compuesto que se une a un polipéptido o modula la actividad del polipéptido de la reivindicación 4 que comprende las etapas de:

a) poner en contacto un polipéptido, o una célula que expresa un polipéptido de la reivindicación 4 con un compuesto de ensayo; y

b) determinar si el polipéptido se une al compuesto de ensayo o determinar el efecto del compuesto de ensayo sobre la actividad del polipéptido.

9. Un procedimiento *in vitro* para identificar un ácido nucleico asociado con cáncer de mama que comprende:

a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama que comprende moléculas de ácido nucleico con una sonda de hibridación que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

b) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en la muestra que hibrida específicamente con la sonda;

c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende moléculas de ácido nucleico con una sonda de hibridación que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con un ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

d) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en la muestra que hibrida específicamente con la sonda.

e) comparar el nivel de ácidos nucleicos que hibridan con la sonda en la primera muestra con el nivel de ácidos nucleicos que hibridan con la sonda en la segunda muestra, donde un nivel disminuido de ácidos nucleicos que hibridan en la primera muestra en relación con la segunda muestra indica que la molécula de ácido nucleico en la primera muestra se asocia con cáncer de mama.

10. Un procedimiento *in vitro* para identificar un ácido nucleico asociado con cáncer de pulmón, de cerebro o de colon que comprende:

a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende moléculas de ácido nucleico con una sonda de hibridación que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

b) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en la muestra que hibrida específicamente con la sonda;

c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende moléculas de ácido nucleico con una sonda de hibridación que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con un ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

d) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en la muestra que hibrida específicamente con la sonda.

e) comparar el nivel de ácidos nucleicos que hibridan con la sonda en la primera muestra con el nivel de ácidos nucleicos que hibridan con la sonda en la segunda muestra, donde un nivel aumentado de ácidos nucleicos que hibridan en la primera muestra en relación con la segunda muestra indica que la molécula de ácido nucleico en la primera muestra se asocia con cáncer de pulmón, cerebro o colon.

11. Un procedimiento *in vitro* para identificar un ácido nucleico asociado con cáncer de mama que comprende:

a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama que comprende moléculas de ácido nucleico con un primer y segundo cebador de amplificación, comprendiendo el primer cebador al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y comprendiendo el segundo cebador al menos 25 nucleótidos contiguos del complemento de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

b) incubar la muestra en condiciones que permitan la amplificación de ácido nucleico;

c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende moléculas de ácido nucleico con un primer y segundo cebador de amplificación, comprendiendo el primer cebador al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y comprendiendo el segundo cebador al menos 25 nucleótidos contiguos del complemento de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

d) incubar la muestra en condiciones que permitan la amplificación de ácido nucleico.

e) comparar el nivel de amplificación de ácido nucleico en la primera muestra en relación con el nivel de amplificación de ácido nucleico en la segunda muestra, donde un nivel disminuido de amplificación de ácido nucleico en la primera muestra en relación con la segunda muestra indica que la molécula de ácido nucleico se asocia con cáncer de mama.

12. Un procedimiento *in vitro* para identificar un ácido nucleico asociado con cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende:

a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende moléculas de ácido nucleico con un primer y segundo cebador de amplificación, comprendiendo el primer cebador al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y comprendiendo el segundo cebador al menos 25 nucleótidos contiguos del complemento de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

b) incubar la muestra en condiciones que permitan la amplificación de ácido nucleico;

c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende moléculas de ácido nucleico con un primer y segundo cebador de amplificación, comprendiendo el primer cebador al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y comprendiendo el segundo cebador al menos 25 nucleótidos contiguos del complemento de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

d) incubar la muestra en condiciones que permitan la amplificación de ácido nucleico.

e) comparar el nivel de amplificación de ácido nucleico en la primera muestra en relación con el nivel de amplificación de ácido nucleico en la segunda muestra, donde un nivel aumentado de amplificación de ácido nucleico en la primera muestra en relación con la segunda muestra indica que la molécula de ácido nucleico se asocia con cáncer de pulmón, cerebro o colon.

13. Un procedimiento *in vitro* para identificar un polipéptido asociado con cáncer de mama que comprende:

ES 2 266 195 T3

a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama que comprende polipéptidos, con un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 4;

5 b) detectar la presencia de un polipéptido en la muestra, que se une específicamente al anticuerpo;

c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende polipéptidos, con un anticuerpo que se une específicamente con el polipéptido de la reivindicación 4;

10 d) detectar la presencia de un polipéptido en la muestra que se une al anticuerpo;

e) comparar el nivel de unión a anticuerpo en la primera muestra en relación con el nivel de unión a anticuerpo en la segunda muestra, donde un nivel disminuido de unión a anticuerpo en la primera muestra en relación con la segunda muestra indica que el polipéptido se asocia con cáncer de mama.

15 14. Un procedimiento *in vitro* para identificar un polipéptido asociado con cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende:

20 a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende polipéptidos, con un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 4;

b) detectar la presencia de un polipéptido en la muestra, que se une específicamente al anticuerpo;

25 c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende polipéptidos, con un anticuerpo que se une específicamente con el polipéptido de la reivindicación 4;

d) detectar la presencia de un polipéptido en la muestra que se une al anticuerpo;

30 e) comparar el nivel de unión a anticuerpo en la primera muestra en relación con el nivel de unión a anticuerpo en la segunda muestra, donde un nivel aumentado de unión a anticuerpo en la primera muestra en relación con la segunda muestra indica que el polipéptido se asocia con cáncer de pulmón, cerebro o colon.

35 15. Un procedimiento *in vitro* para identificar un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama que comprende:

40 a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama, que comprende moléculas de ácido nucleico, con una sonda de hibridación que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

b) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en la muestra que hibrida específicamente con la sonda;

45 c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende moléculas de ácido nucleico con una sonda de hibridación que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

d) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en la muestra que hibrida de forma específica con la sonda;

50 e) comparar el nivel de ácidos nucleicos que hibridan con la sonda en la primera muestra con el nivel de ácidos nucleicos que hibridan con la sonda en la segunda muestra, donde un nivel disminuido de ácidos nucleicos que hibridan en la primera muestra en relación con la segunda muestra identifica un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama.

55 16. Un procedimiento *in vitro* para identificar un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende:

60 a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende moléculas de ácido nucleico, con una sonda de hibridación que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

b) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en la muestra que hibrida específicamente con la sonda;

65 c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende moléculas de ácido nucleico con una sonda de hibridación que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

ES 2 266 195 T3

d) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en la muestra que hibrida de forma específica con la sonda;

5 e) comparar el nivel de ácidos nucleicos que hibridan con la sonda en la primera muestra con el nivel de ácidos nucleicos que hibridan con la sonda en la segunda muestra, donde un nivel aumentado de ácidos nucleicos que hibridan en la primera muestra en relación con la segunda muestra identifica un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon.

10 17. Un procedimiento *in vitro* para identificar a un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama que comprende:

15 a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama que comprende moléculas de ácido nucleico con un primer y segundo cebador de amplificación, comprendiendo el primer cebador al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y comprendiendo el segundo cebador al menos 25 nucleótidos contiguos del complemento de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

20 b) incubar la muestra en condiciones que permiten la amplificación de ácido nucleico;

25 c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende moléculas de ácido nucleico con un primer y segundo cebador de amplificación, comprendiendo el primer cebador al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y comprendiendo el segundo cebador al menos 25 nucleótidos contiguos del complemento de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

d) incubar la muestra en condiciones que permiten la amplificación de ácido nucleico;

30 e) comparar el nivel de amplificación de ácido nucleico en la primera muestra en relación con el nivel de amplificación de ácido nucleico en la segunda muestra, donde un nivel disminuido de amplificación de ácido nucleico en la primera muestra en relación con la segunda muestra identifica un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama.

35 18. Un procedimiento *in vitro* para identificar a un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende:

40 a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende moléculas de ácido nucleico con un primer y segundo cebador de amplificación, comprendiendo el primer cebador al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y comprendiendo el segundo cebador al menos 25 nucleótidos contiguos del complemento de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

45 b) incubar la muestra en condiciones que permitan la amplificación de ácido nucleico;

50 c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende moléculas de ácido nucleico con un primer y segundo cebador de amplificación, comprendiendo el primer cebador al menos 25 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y comprendiendo el segundo cebador al menos 25 nucleótidos contiguos del complemento de la SEC ID N°: 1, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2;

d) incubar la muestra en condiciones que permitan la amplificación de ácido nucleico;

55 e) comparar el nivel de amplificación de ácido nucleico en la primera muestra en relación con el nivel de amplificación de ácido nucleico en la segunda muestra, donde un nivel aumentado de amplificación de ácido nucleico en la primera muestra en relación con la segunda muestra identifica un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon.

60 19. Un procedimiento *in vitro* para identificar a un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama que comprende:

65 a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de mama o en riesgo de desarrollar cáncer de mama que comprende polipéptidos, con un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 4;

b) detectar la presencia de un polipéptido en la muestra que se une al anticuerpo;

c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende polipéptidos, con un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 4;

d) detectar la presencia de un polipéptido en la muestra que se une al anticuerpo;

e) comparar el nivel de unión a anticuerpo en la primera muestra en relación con el nivel de unión a anticuerpo en la segunda muestra, donde un nivel disminuido de unión a anticuerpo en la primera muestra en relación con la segunda muestra indica que el polipéptido se asocia con cáncer de mama;

20. Un procedimiento *in vitro* para identificar a un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende:

a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto que tiene cáncer de pulmón, cerebro o colon o en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, cerebro o colon que comprende polipéptidos, con un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 4;

b) detectar la presencia de un polipéptido en la muestra que se une al anticuerpo;

c) poner en contacto una segunda muestra de un control que comprende polipéptidos, con un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 4;

d) detectar la presencia de un polipéptido en la muestra que se une al anticuerpo;

e) comparar el nivel de unión a anticuerpo en la primera muestra en relación con el nivel de unión a anticuerpo en la segunda muestra, donde un nivel aumentado de unión a anticuerpo en la primera muestra en relación con la segunda muestra indica que el polipéptido se asocia con cáncer de pulmón, cerebro o colon.

21. Un procedimiento para identificar un anticuerpo capaz de tratar cáncer o un trastorno de proliferación y/o diferenciación celular **caracterizado** por la actividad del polipéptido de la reivindicación 4, que comprende ensayar la capacidad del anticuerpo para modular la actividad del polipéptido de la reivindicación 4, identificando de este modo un anticuerpo capaz de tratar cáncer o un trastorno de proliferación y/o diferenciación celular **caracterizado** por actividad aberrante del polipéptido de la reivindicación 4.

22. Un procedimiento para identificar un ácido nucleico antisentido o una ribozima capaz de tratar cáncer o un trastorno de proliferación y/o diferenciación celular **caracterizado** por la expresión aberrante del ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 que comprende ensayar la capacidad del compuesto para modular la expresión del ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2, identificando de este modo un compuesto capaz de tratar cáncer o un trastorno de proliferación y/o diferenciación celular **caracterizado** por la expresión aberrante del ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2.

23. Un procedimiento *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento de cáncer o un trastorno de proliferación y/o diferenciación celular, en una muestra obtenidas de un sujeto que se trata con un protocolo en evaluación, que comprende evaluar el nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 1 o un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico en la muestra, donde un cambio en el nivel de expresión del ácido nucleico o el polipéptido después del tratamiento, en relación con el nivel antes del tratamiento, es indicativo de la eficacia del tratamiento de cáncer o un trastorno de proliferación y/o diferenciación celular.

24. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, donde el cambio en el nivel de expresión es un aumento y el cáncer es cáncer de mama.

25. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, donde el cambio en el nivel de expresión es una disminución y el cáncer es cáncer de pulmón, cerebro o colon.

26. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar cáncer o un trastorno de proliferación y/o diferenciación celular en una muestra obtenida de un sujeto, que comprende:

evaluar la expresión o actividad de una molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 1 o un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico en la muestra, de modo que una diferencia en el nivel de del ácido nucleico o el polipéptido en relación con un sujeto normal o una cohorte de sujetos normales es indicativa de cáncer o un trastorno de proliferación y/o diferenciación celular.

27. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, donde la diferencia en el nivel de expresión es una disminución y el cáncer es cáncer de mama.

28. un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, donde la diferencia en el nivel de expresión es un aumento y el cáncer es cáncer de pulmón, cerebro o colon.

CTGCCCCGATAGTATAAATCGAGGATCCAGGTCTGGGAGATTCAACC	M G A N T S R	7 SEC ID N° 2
	ATG GGA GCC AAC ACT TCA AGA	21 SEC ID N° 1
	↑SEC ID N° 3→	
K P P V F D E N E D V N F D H F E I L R		27
AAA CCA CCA GTG TTT GAT GAA AAT GAA GAT GTC AAC TTT GAC CAC TTT GAA ATT TTG CGA		81
A I G K G S F G K V C I V Q K N D T K K		47
GCC ATT GGG AAA GGC AGT TTT GGG AAG GTC TGC ATT GTA CAG AAG AAT GAT ACC AAG AAG		141
M Y A M K Y M N K Q K C V E R N E V R N		67
ATG TAC GCA ATG AAG TAC ATG AAT AAA CAA AAG TGC GTG GAG CGC AAT GAA GTG AGA AAT		201
V F K E L Q I M Q G L E H P F L V N L W		87
GTC TTC AAG GAA CTC CAG ATC ATG CAG GGT CTG GAG CAC CCT TTC CTG GTT AAT TTG TGG		261
Y S F Q D E E D M F M V V D L L L G G D		107
TAT TCC TTC CAA GAT GAG GAA GAC ATG TTC ATG GTG GTG GAC CTC CTG CTG GGT GGA GAC		321
L R Y H L Q Q N V H F K E E T V K L F I		127
CTG CGT TAT CAC CTG CAA CAG AAC GTC CAC TTC AAG GAA GAA ACA GTG AAG CTC TTC ATC		381
C E L V M A L D Y L Q N Q R I I H R D M		147
TGT GAG CTG GTC ATG GCC CTG GAC TAC CTG CAG AAC CAG CGC ATC ATT CAC AGG GAT ATG		441
K P D N I L L D E H G H V H I T D F N I		167
AAG CCT GAC AAT ATT TTA CTT GAC GAA CAT GGG CAC GTC CAC ATC ACA GAT TTC AAC ATT		501
A A M L P R E I Q I T T M A G T K P Y M		187
GCT GCG ATG CTG CCC AGG GAG ATA CAG ATT ACC ACC ATG GCT GGC ACC AAG CCT TAC ATG		561
A P E M F S S R K G A G Y S F A V D W W		207
GCA CCT GAG ATG TTC AGC TCC AGA AAA GGA GCA GGC TAT TCC TTT GCT GTT GAC TGG TGG		621

FIG.1A

S L G V T A Y E L L R G R R P Y H I R S 227
 TCC CTG GGA GTG ACG GCA TAT GAA CTG CTG AGA GGC CGG AGA CCG TAT CAT ATT CGC TCC 681

 S T S S K E I V H T F E T T V V T Y P S 247
 AGT ACT TCC AGC AAG GAA ATT GTA CAC ACG TTT GAG ACG ACT GTT GTA ACT TAC CCT TCT 741

 A W S Q E M V S L L K K L L E P N P D Q 267
 GCC TGG TCA CAG GAA ATG GTG TCA CTT CTT AAA AAG CTA CTC GAA CCT AAT CCA GAC CAA 801

 R F S Q L S D V Q N F P Y M N D I N W D 287
 CGA TTT TCT CAG TTA TCT GAT GTC CAG AAC TTC CCG TAT ATG AAT GAT ATA AAC TGG GAT 861

 A V F Q K R L I P G F I P N K G R L N C 307
 GCA GTT TTT CAG AAG AGG CTC ATT CCA GGT TTC ATT CCT AAT AAA GGC AGG CTG AAT TGT 921

 D P T F E L E E M I L E S K P L H K K K 327
 GAT CCT ACC TTT GAA CTT GAG GAA ATG ATT TTG GAG TCC AAA CCT CTA CAT AAG AAA AAA 981

 K R L A K K E K D M R K C D S S Q T C L 347
 AAG CGT CTG GCA AAG AAG GAG AAG GAT ATG AGG AAA TGC GAT TCT TCT CAG ACA TGT CTT 1041

 L Q E H L D S V Q K E F I I F N R E K V 367
 CTT CAA GAG CAC CTT GAC TCT GTC CAG AAG GAG TTC ATA ATT TTC AAC AGA GAA AAA GTA 1101

 N R D F N K R Q P N L A L E Q T K D P Q 387
 AAC AGG GAC TTT AAC AAA AGA CAA CCA AAT CTA GCC TTG GAA CAA ACC AAA GAC CCA CAA 1161

 G E D G Q N N L * 397
 GGT GAG GAT GGT CAG AAT AAC AAC TTG TAA 1191
 AGGCCTCATGCTCTTCTTGGGACAACTCTCATGCCAGAAC
 ← SEC ID N° 3 →

FIG.1B

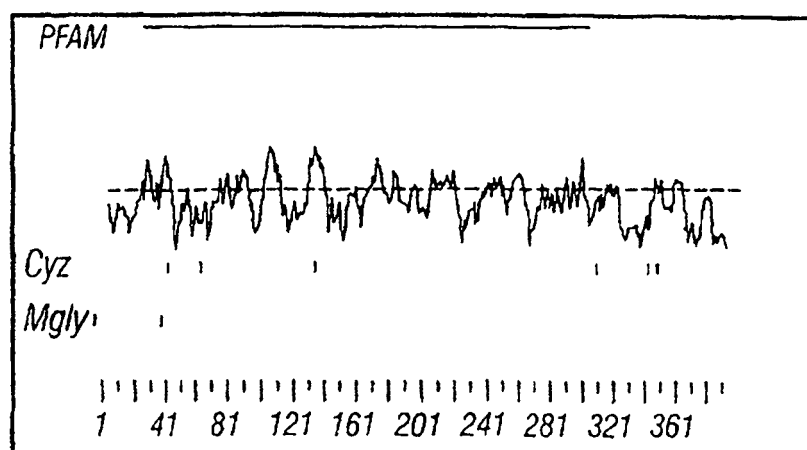


FIG.2

```

*->yelleklGeGsfGkVykakhk.tgkivAvKilkkels.....1 SEC ID N° 6
+e+l+ +G+GsfGkV ++ +t+k +A+K ++k++ +t++ ++ +
14911 23 FEILRAIGKSGFKVCIVQKNDTKKMYAMKYNKQKCVernevrnVF 69

rEiqilkrIsHpNIvr11gvfedtdhlylvmEymegGdLfdy1rrngpl
E+qi++ l Hp++v+l++f+ +++ + +v ++ gGdL+ +l++n ++
14911 70 KELQIMQGLEHPFLVNLWYSFQ-DEEDMFMVVDLLGGDLRYHLQQNVHF 118

sekeakkialQilrGleYlHsngivHRDLKpeNILLdengtvKiaDFGLA
e+ +k ++ ++ +l+YL +++i+HRD+Kp+NILLde+g+v i+DF +A
14911 119 KEETVKLFI CELVMALDYLQNRQRIHRDMKPDNILLDEHGHVHITDFNIA 168

rll...eklttfvGtpwYmmAPEvileg... rgysskvDvWSlGvilyEl
+ l+++ tt GT +Ym APE +t++t gys +vD+WSlGv+ yEl
14911 169 AMLpreIQITTMAGTKPYM-APEM-FSSrkgAGYSEFAVDWWSlGVTAYEL 216

ltggplfpgadlpafgtggdevdqliifvklPfsdelpktridpleelfr
l g + P++ ++ +e++
14911 217 LRg-----RRPYH----IRSSTSSKEIVH 236

ikkr.r1plpsncSeelkdLlkkcLnkDPskRpGsatakeilnhpwf<-*
+++ ps +S e+ +Llkk+L+++P +R + ++ n p++
14911 237 TFETtVVtYPSAWSQEMVSLlKKLLEPEPNPDQRFs--QLSDVQNFpYM 281

```

FIG.3

```

*->reIdWdkLEnkeiePPFKPk-* SEC ID N° 7
+I+Wd + +k+ +P F+P+
14911 282 NDINWDAVFQKRlIPGFIPN 301

```

FIG.4

Interrogante: 172 PREIQITTMAGTKPYMAPEMESSRKGAGYSFAVDWWSLGVTAPELLRGRPPYHIRSSTSS 231
 Sujeto: P + + +MA YMAPE S+ YS D WS GV YE+L G+ P+ S S SEC ID N° 8
 282 PYYVSMKSMA--PEYMAPES--SATNYQKYSTKSDVWSEGVILYEMLTGKPPFFPGESEVS 338

Interrogante: 232 KEIVHTFETTvvTYPsAwSQEMVSLlKKllEPNPDQRFsQLSDVQNFPYMNDINWDVAFQ 291
 Sujeto: +E + + + + + K++E +R Q S N P ++ D + +

Interrogante: 339 EEPYQSMKNMEVLEMGPEETIQKVMskIVEKK-GERMPQPSS-SNCPEVSQEAkd-LLK 395

Interrogante: 292 KRLIPGFIPNKGRlNCDPtFE 312
 Sujeto: K L P K R PTFE
 396 KCLQKD--PEKRR-----PTFE 410

Interrogante: 126 FICELVMALDYL--QNQR---IIHR-----DMKPDNILLDEHGh 159
 Sujeto: ++ ++ L+YL +Nq+ IIHR D+KP+NILLDE H SEC ID N° 9
 191 YVHQIAKGLEYLHsKNQKHQGIHRAKKVDLKPENILLDEESH 233

Interrogante: 23 FEILRAI-GKGSEgKVCIVQKNDTK---KMVAMKYMNKQKcVERNEVRNVEKE 71
 Sujeto: +E+L+ + GKGSFGKV + T ++ A+K M K+K +E++ + K+ SEC ID N° 10
 34 YELlKlLGKGsFGKVYKAKHKSTSTTGEVVAVKVMKKKVMKSSKSSKK 86

Interrogante: 250 SQEMVSLlKKllEPNPDQRFsQLSDVQNFPY 280
 Sujeto: SQE LLK L+ +P++R ++ P+ SEC ID N° 11
 387 SQEAkdLLKCLQKDPEKRRPTFEILQHPW 417

FIG. 5

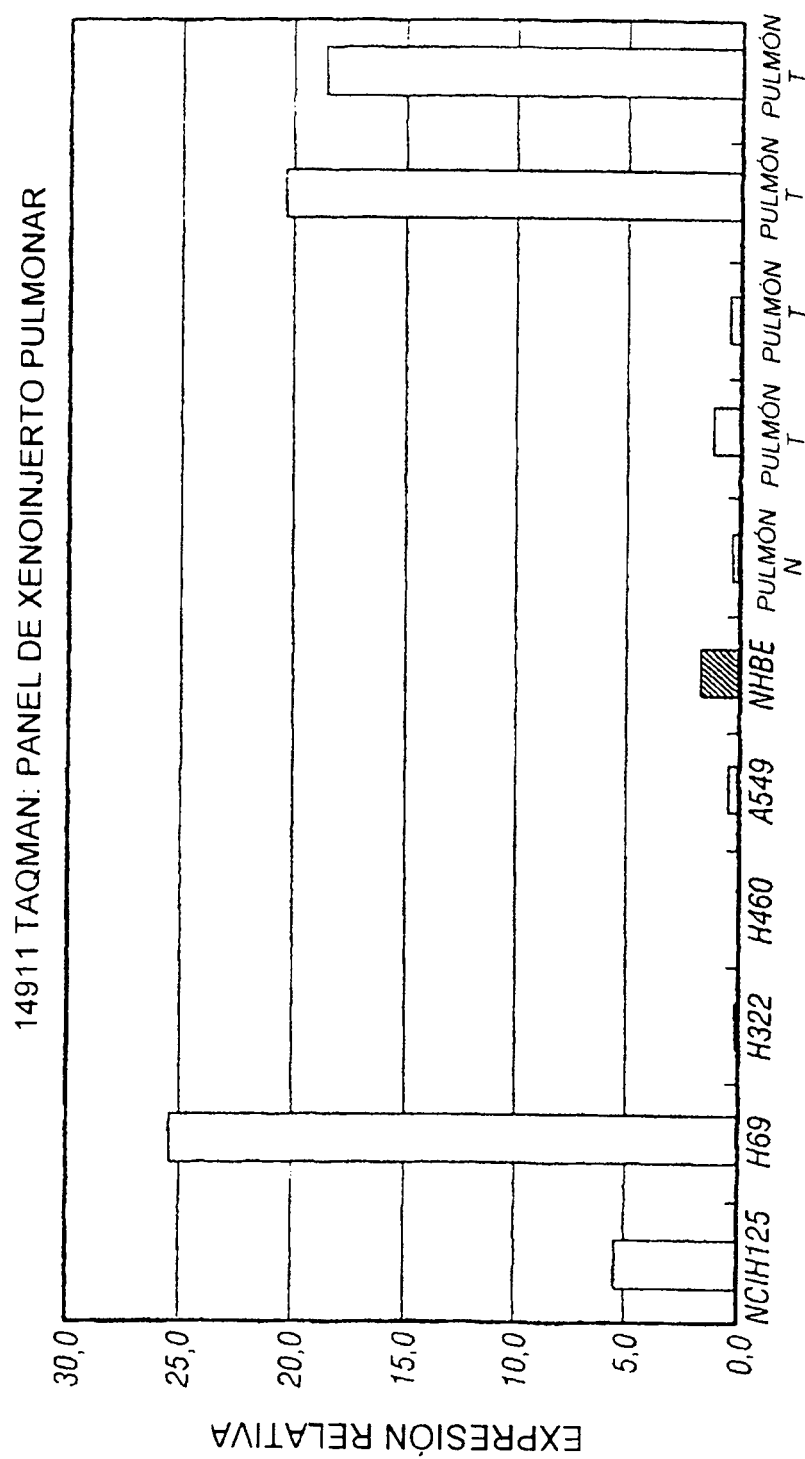


FIG. 6

14911 TAQMAN: PANEL DE TUMORES PULMONARES

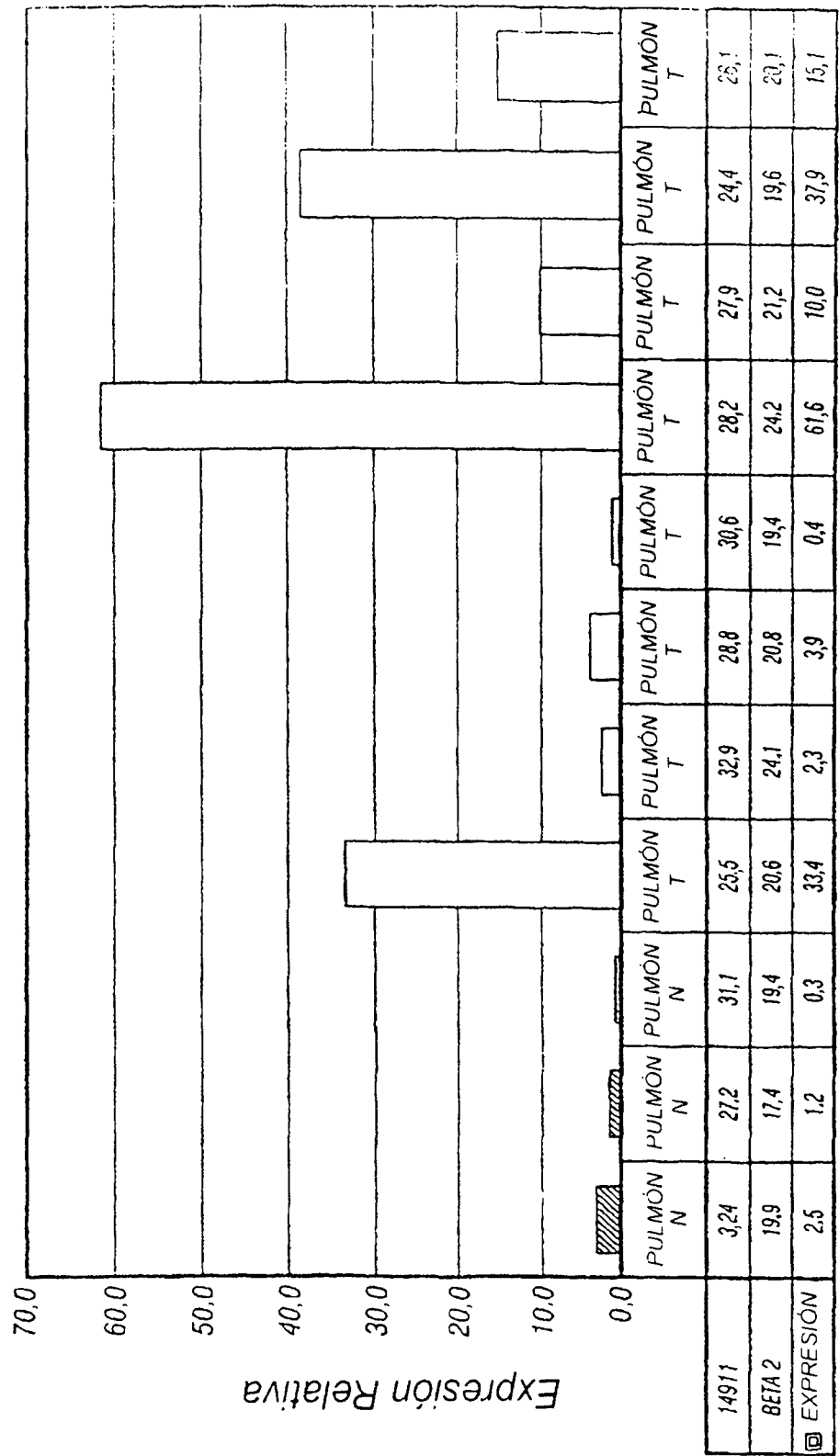


FIG. 7

EXPRESIÓN DE 14911 EN MUESTRAS Y LÍNEAS CELULARES CLÍNICAS PULMONARES

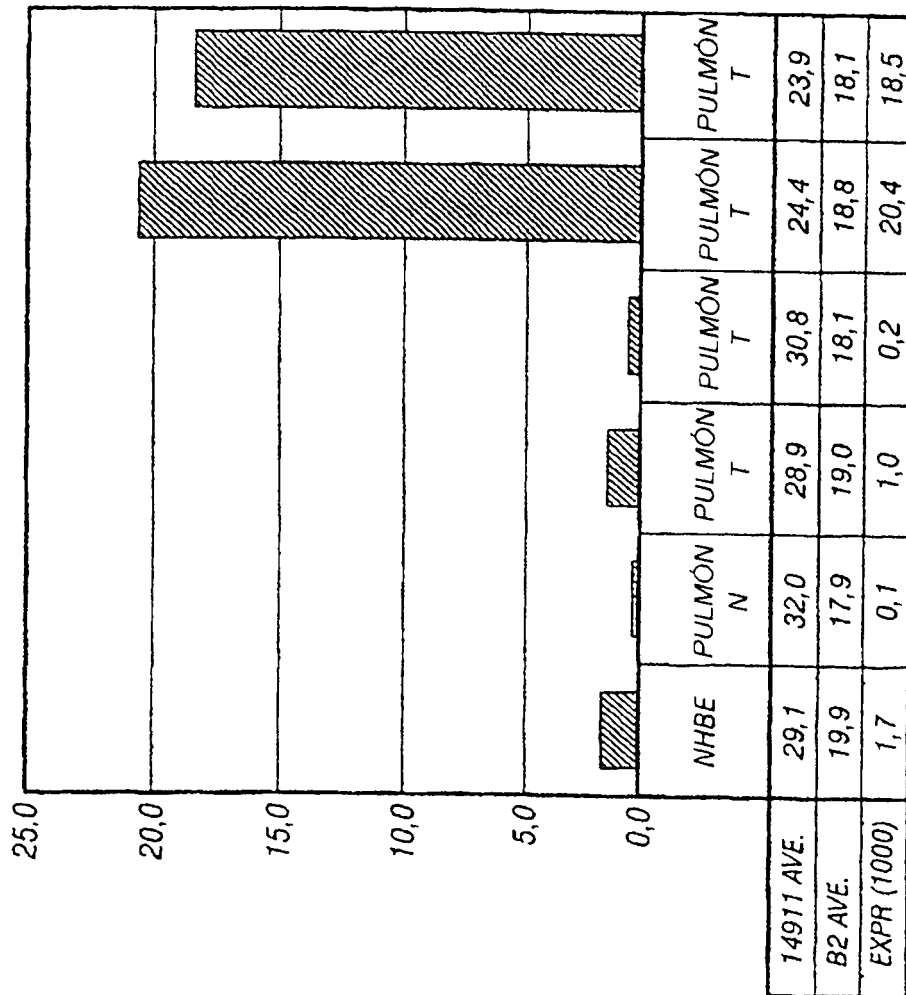


FIG. 8

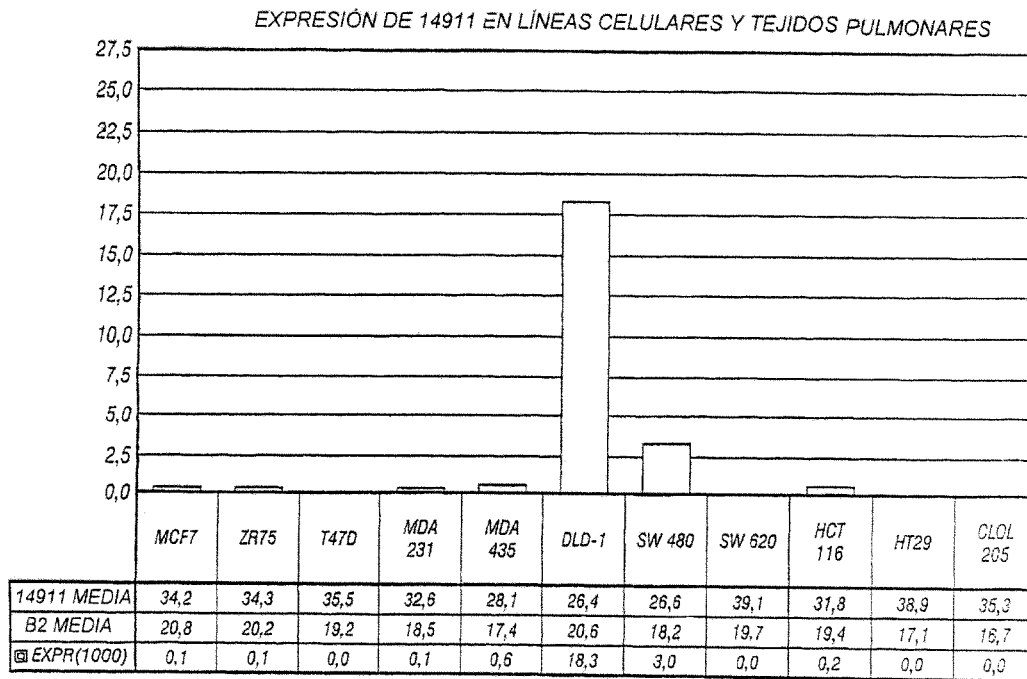


FIG. 9A

EXPRESIÓN DE 14911 EN LÍNEAS CELULARES Y TEJIDOS PULMONARES

NCIH12 5	NCIH 67	NCIH 322	NCIH 460	A549	NHBE	PULMÓN N	PULMÓN T	PULMÓN T	PULMÓN T	PULMÓN T
26,9	24,9	34,7	38,3	30,8	29,1	32,0	28,9	30,8	24,4	23,9
19,4	19,6	20,2	19,3	19,7	19,9	17,9	19,0	18,1	18,8	18,1
5,4	25,6	0,0	0,0	0,4	1,7	0,1	1,0	0,2	20,4	18,5

FIG. 9B

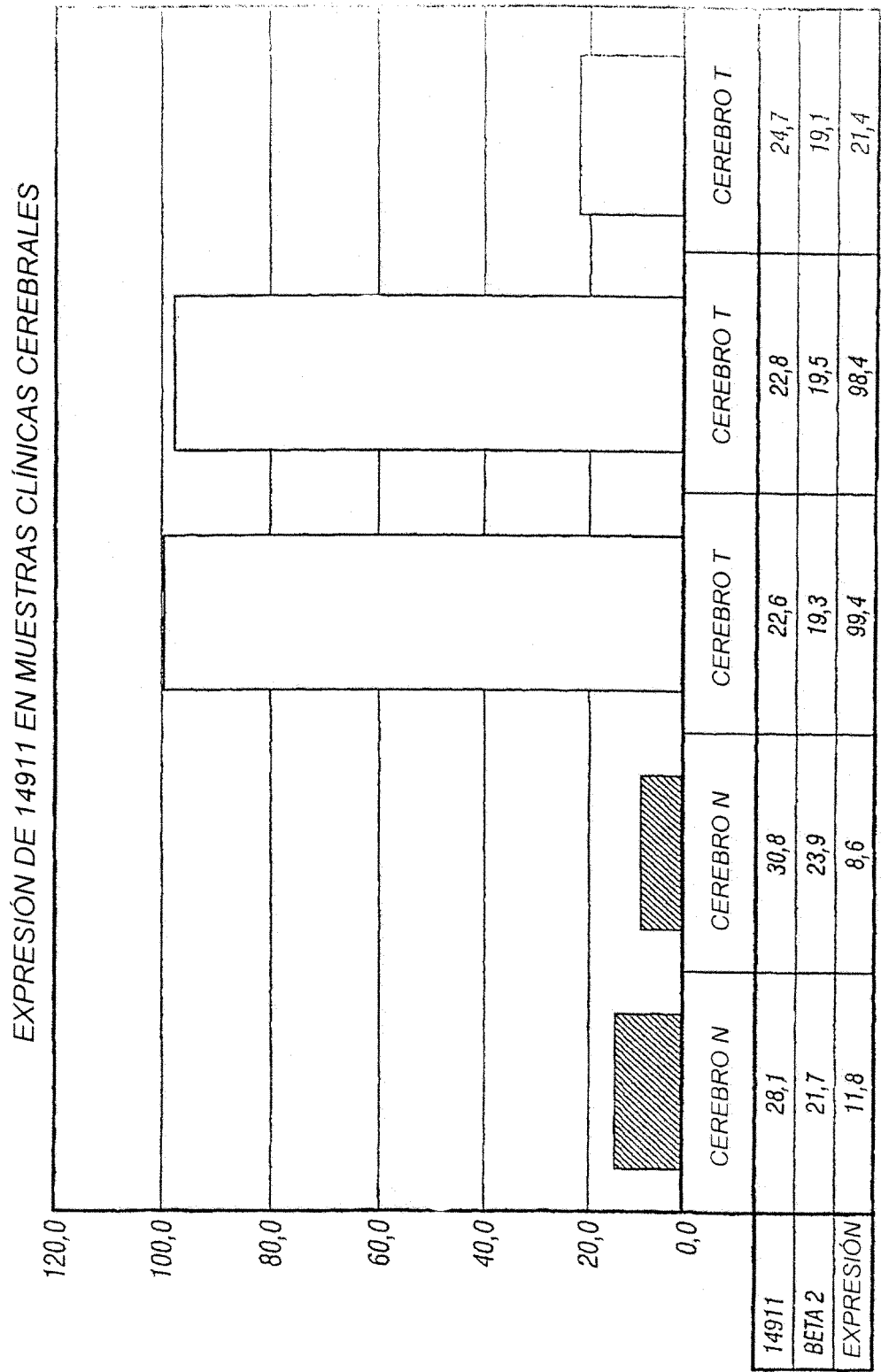


FIG. 10

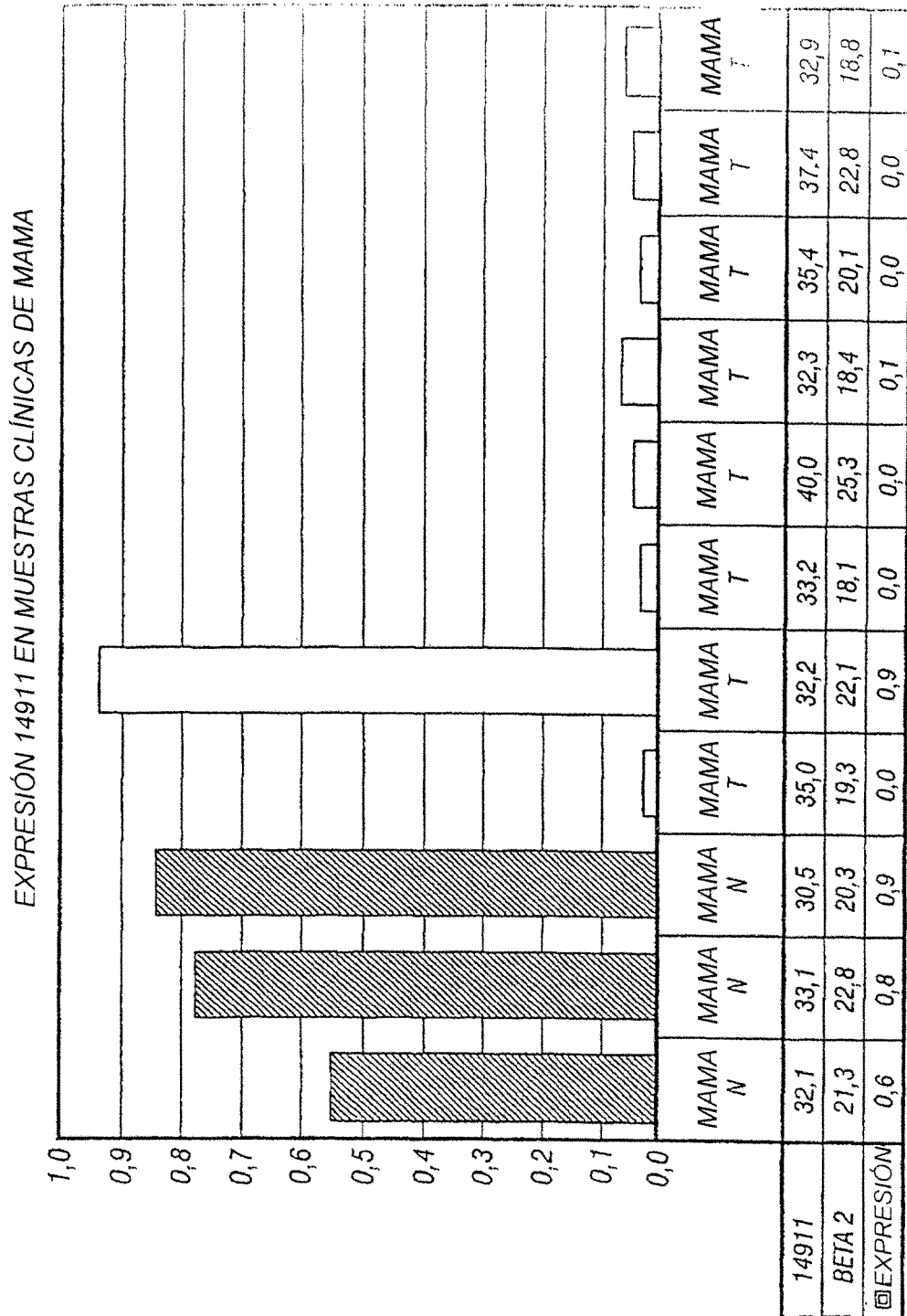


FIG. 11

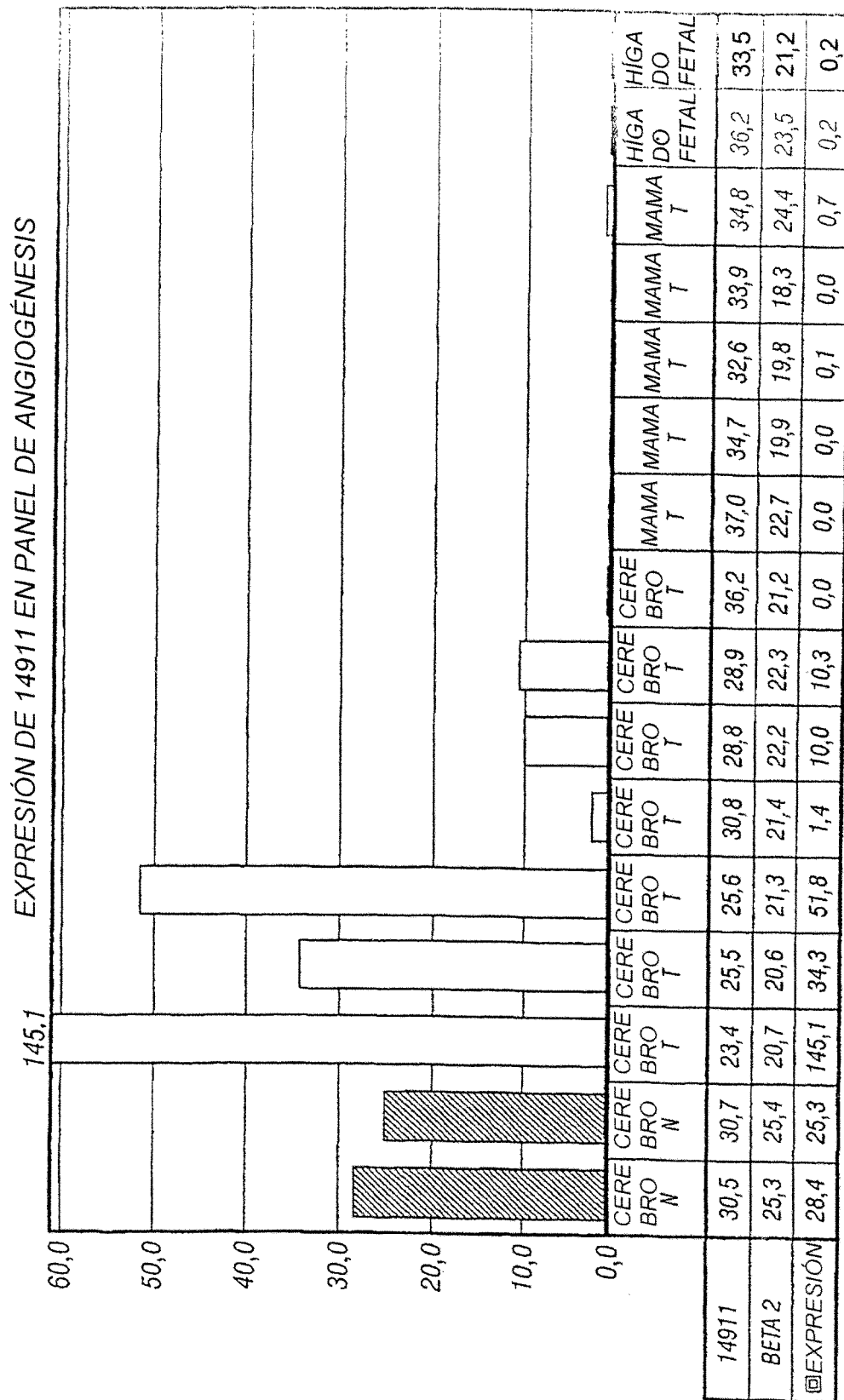


FIG. 12

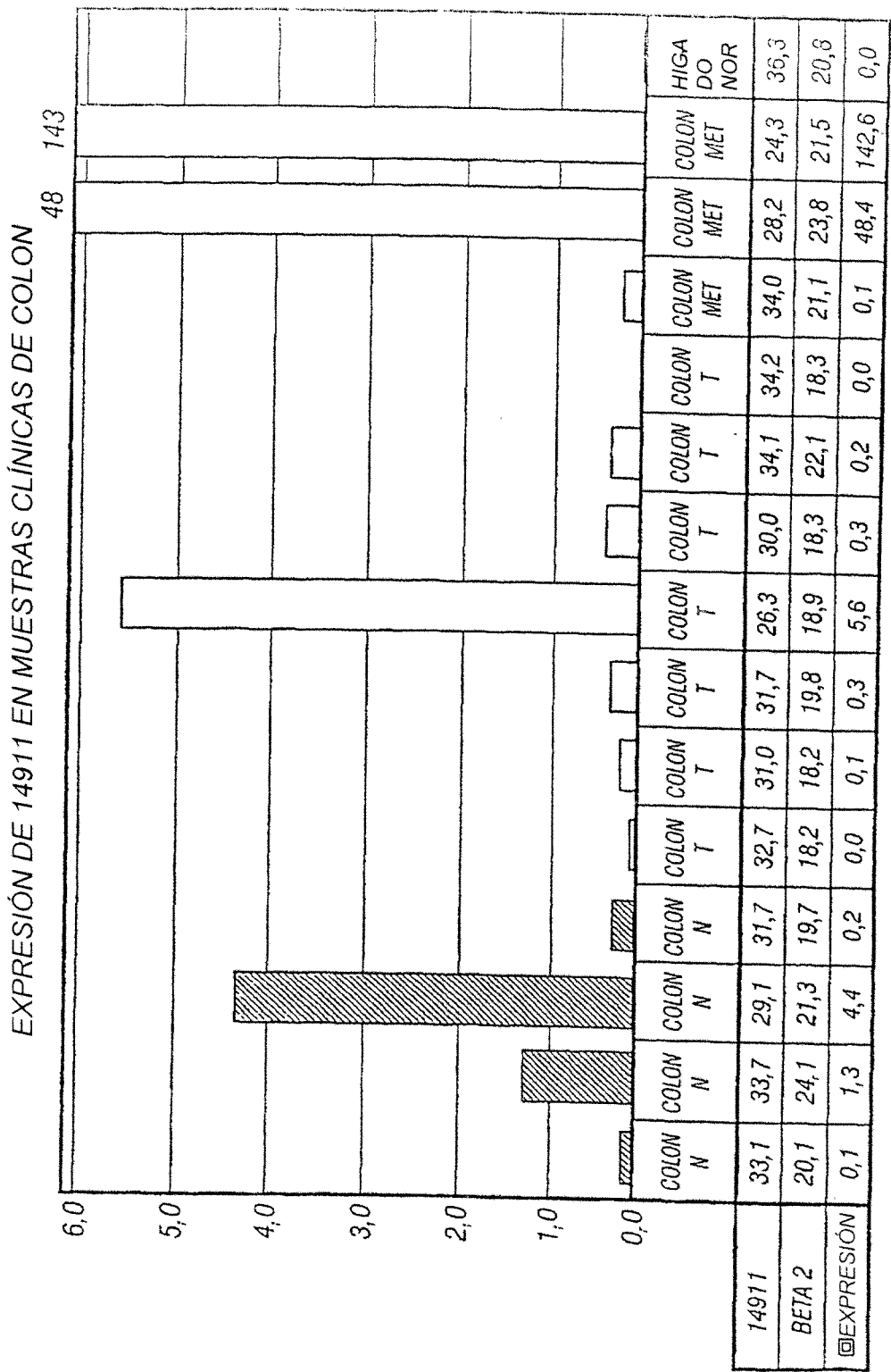
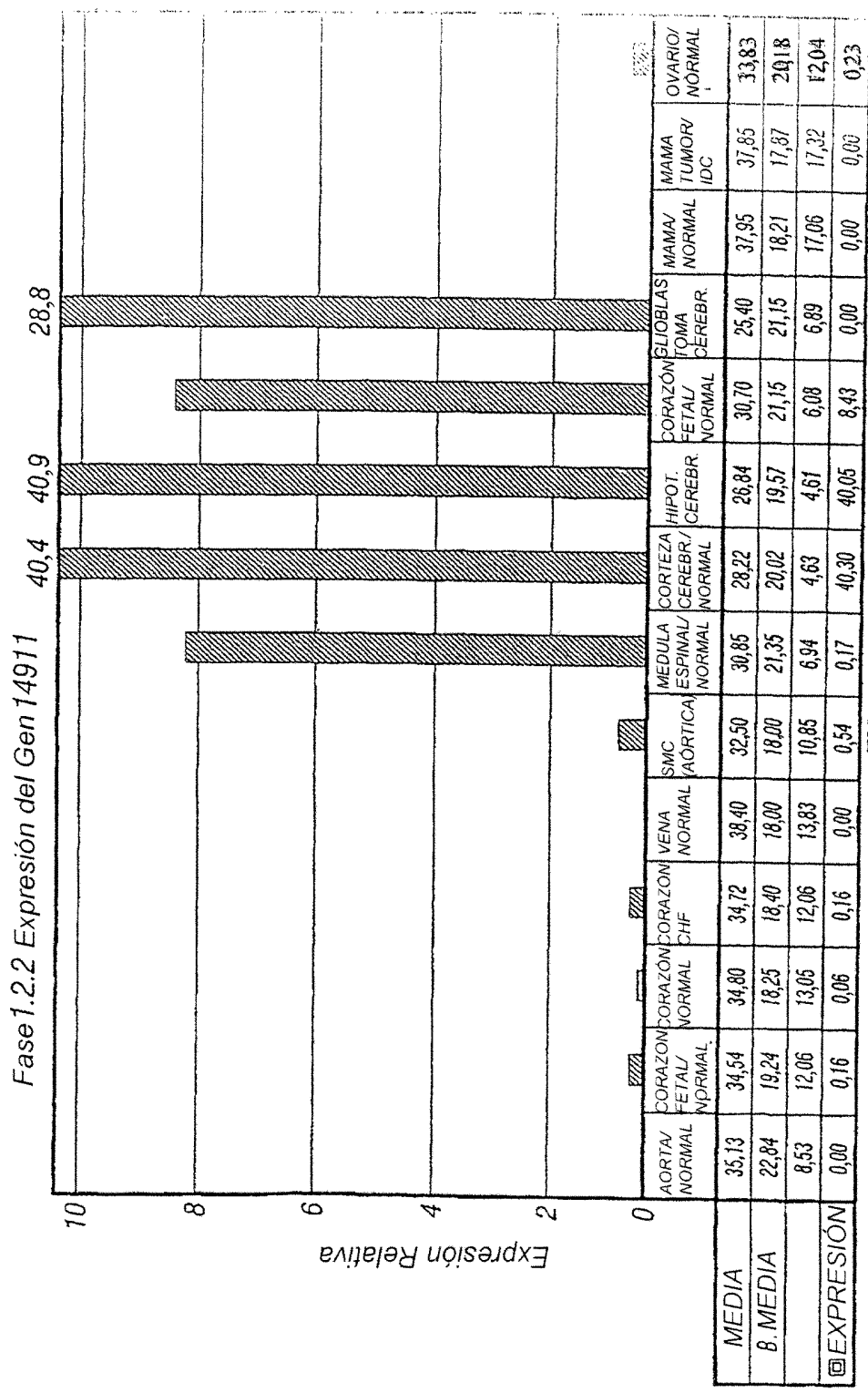


FIG. 13



OVARIO/ TUMOR	PANCREAS	PRÓSTATA/ NORMAL	PRÓSTATA/ TUMOR	COLON NORMAL	COLON TUMOR	COLON IBD	RIÑÓN NORMAL	HIGADO NORMAL	HIGADO/ FIBROSIS	HIGADO/ FETAL/ NORMAL	PULMÓN/ NORMAL	PULMÓN/ TUMOR	PULMÓN/ COPO	BAZO/ NORMAL	AMIG- DALAS/ NORMAL
33,83	34,94	34,67	34,67	37,60	38,83	35,00	29,50	30,04	35,90	37,03	31,49	28,83	28,01	40,00	40,00
18,90	18,90	18,45	17,51	18,77	18,50	17,00	19,90	18,55	19,52	20,80	17,48	17,02	17,50	19,81	17,18
12,28	14,81	13,50	13,90	18,06	18,77	15,14	17,02	18,45	13,92	13,57	11,34	8,00	8,75	17,53	20,16
0,20	0,03	0,08	0,07	0,00	0,00	0,00	7,70	0,00	0,00	0,00	0,30	3,02	2,32	0,6	0,00

FIG. 14B

GANG. LINF. / NORMAL	TIMO/ NORMAL	EPI TEL. NORMAL	CELULAS ENDOTELIALES	MUSC. ESQUELETICO	FIBRO BLAS/ (DERMA)	PIEL NORMAL	ADIPOSO NORMAL	OSTEO BLAS. (PRIM.)	OSTEO BLAS. (SIN DIF)	OSTEO BLAS. (DIF)	OSTEO CLAS.	SMC AORTICA TEMP.	SMC AORTICA TARD.	HUVE FINAS. C	HUVE ESTAT. C
30.47	35.52	30.07	40.00	32.40	36.63	31.84	33.43	40.00	38.50	37.23	40.00	34.14	40.00	34.57	34.25
17.99	19.20	19.01	19.57	18.41	18.16	20.43	16.21	18.45	18.41	19.96	17.02	19.07	22.34	19.40	19.01
18.82	13.66	7.00	17.47	11.42	13.00	8.75	12.54	17.89	18.51	18.81	20.32	15.01	16.00	12.50	14.54
0.00	0.00	4.50	0.00	0.37	0.00	2.33	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00

FIG. 14C

ES 2 266 195 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Millenium Pharmaceuticals, Inc.

5 <120> NUEVAS MOLÉCULAS DE PROTEÍNA QUINASA 14911 Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 38155-20010.40

10 <140> PCT/US 01/13785

<141> 25-04-2001

15 <160> 11

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

20 <211> 1281

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <220>

<221> CDS

<222> (49)...(1239)

30 <400> 1

35	ctgcccggat agtataaatac gaggatccag gtctgggcag attcaacc atg gga gcc	57
	Met Gly Ala	
	1	
40	aac act tca aga aaa cca cca gtg ttt gat gaa aat gaa gat gtc aac	105
	Asn Thr Ser Arg Lys Pro Pro Val Phe Asp Glu Asn Glu Asp Val Asn	
	5 10 15	
45	ttt gac cac ttt gaa att ttg cga gcc att ggg aaa ggc agt ttt ggg	153
	Phe Asp His Phe Glu Ile Leu Arg Ala Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly	
	20 25 30 35	
50	aag gtc tgc att gta cag aag aat gat acc aag aag atg tac gca atg	201
	Lys Val Cys Ile Val Gln Lys Asn Asp Thr Lys Lys Met Tyr Ala Met	
	40 45 50	
55	aag tac atg aat aaa caa aag tgc gtg gag cgc aat gaa gtg aga aat	249
	Lys Tyr Met Asn Lys Gln Lys Cys Val Glu Arg Asn Glu Val Arg Asn	
	55 60 65	
60	gtc ttc aag gaa ctc cag atc atg cag ggt ctg gag cac cct ttc ctg	297
	Val Phe Lys Glu Leu Gln Ile Met Gln Gly Leu Glu His Pro Phe Leu	
	70 75 80	
65	gtt aat ttg tgg tat tcc ttc caa gat gag gaa gac atg ttc atg gtg	345
	Val Asn Leu Trp Tyr Ser Phe Gln Asp Glu Glu Asp Met Phe Met Val	
	85 90 95	
70	gtg gac ctc ctg ctg ggt gga gac ctg cgt tat cac ctg caa cag aac	393
	Val Asp Leu Leu Leu Gly Gly Asp Leu Arg Tyr His Leu Gln Gln Asn	
	100 105 110 115	

ES 2 266 195 T3

5	gtc cac ttc aag gaa gaa aca gtg aag ctc ttc atc tgt gag ctg gtc Val His Phe Lys Glu Glu Thr Val Lys Leu Phe Ile Cys Glu Leu Val 120 125 130	441
10	atg gcc ctg gac tac ctg cag aac cag cgc atc att cac agg gat atg Met Ala Leu Asp Tyr Leu Gln Asn Gln Arg Ile Ile His Arg Asp Met 135 140 145	489
15	aag cct gac aat att tta ctt gac gaa cat ggg cac gtg cac atc aca Lys Pro Asp Asn Ile Leu Leu Asp Glu His Gly His Val His Ile Thr 150 155 160	537
20	gat ttc aac att gct gcg atg ctg ccc agg gag ata cag att acc acc Asp Phe Asn Ile Ala Ala Met Leu Pro Arg Glu Ile Gln Ile Thr Thr 165 170 175	585
25	atg gct ggc acc aag cct tac atg gca cct gag atg ttc agc tcc aga Met Ala Gly Thr Lys Pro Tyr Met Ala Pro Glu Met Phe Ser Ser Arg 180 185 190 195	633
30	aaa gga gca ggc tat tcc ttt gct gtt gac tgg tgg tcc ctg gga gtg Lys Gly Ala Gly Tyr Ser Phe Ala Val Asp Trp Trp Ser Leu Gly Val 200 205 210	681
35	acg gca tat gaa ctg ctg aga ggc cgg aga ccg tat cat att cgc tcc Thr Ala Tyr Glu Leu Leu Arg Gly Arg Arg Pro Tyr His Ile Arg Ser 215 220 225	729
40	agt act tcc agc aag gaa att gta cac acg ttt gag acg act gtt gta Ser Thr Ser Ser Lys Glu Ile Val His Thr Phe Glu Thr Thr Val Val 230 235 240	777
45	act tac cct tct gcc tgg tca cag gaa atg gtg tca ctt ctt aaa aag Thr Tyr Pro Ser Ala Trp Ser Gln Glu Met Val Ser Leu Leu Lys Lys 245 250 255	825
50	cta ctc gaa cct aat cca gac caa cga ttt tct cag tta tct gat gtc Leu Leu Glu Pro Asn Pro Asp Gln Arg Phe Ser Gln Leu Ser Asp Val 260 265 270 275	873
55	cag aac ttc ccg tat atg aat gat ata aac tgg gat gca gtt ttt cag Gln Asn Phe Pro Tyr Met Asn Asp Ile Asn Trp Asp Ala Val Phe Gln 280 285 290	921
60	aag agg ctc att cca ggt ttc att cct aat aaa ggc agg ctg aat tgt Lys Arg Leu Ile Pro Gly Phe Ile Pro Asn Lys Gly Arg Leu Asn Cys 295 300 305	969
65	gat cct acc ttt gaa ctt gag gaa atg att ttg gag tcc aaa cct cta Asp Pro Thr Phe Glu Leu Glu Glu Met Ile Leu Glu Ser Lys Pro Leu 310 315 320	1017
	cat aag aaa aaa aag cgt ctg gca aag aag gag aag gat atg agg aaa His Lys Lys Lys Lys Arg Leu Ala Lys Lys Glu Lys Asp Met Arg Lys 325 330 335	1065

ES 2 266 195 T3

	tgc gat tct tct cag aca tgt ctt ctt caa gag cac ctt gac tct gtc	1113
	Cys Asp Ser Ser Gln Thr Cys Leu Leu Gln Glu His Leu Asp Ser Val	
	340 345 350 355	
5		
	cag aag.gag ttc ata att ttc aac aga gaa aaa gta aac agg gac ttt	1161
	Gln Lys Glu Phe Ile Ile Phe Asn Arg Glu Lys Val Asn Arg Asp Phe	
	360 365 370	
10		
	aac aaa aga caa cca aat cta gcc ttg gaa caa acc aaa gac cca caa	1209
	Asn Lys Arg Gln Pro Asn Leu Ala Leu Glu Gln Thr Lys Asp Pro Gln	
	375 380 385	
15		
	ggc gag gat ggc cag aat aac aac ttg taa aggcctcatg tcttcttctt	1259
	Gly Glu Asp Gly Gln Asn Asn Asn Leu *	
	390 395	
20		
	gggacaatct catgccagaa ac	1281
	<210> 2	
	<211> 396	
25		
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 266 195 T3

<400> 2

```

Met Gly Ala Asn Thr Ser Arg Lys Pro Pro Val Phe Asp Glu Asn Glu
 1          5          10          15
5 Asp Val Asn Phe Asp His Phe Glu Ile Leu Arg Ala Ile Gly Lys Gly
 20          25          30
Ser Phe Gly Lys Val Cys Ile Val Gln Lys Asn Asp Thr Lys Lys Met
 35          40          45
10 Tyr Ala Met Lys Tyr Met Asn Lys Gln Lys Cys Val Glu Arg Asn Glu
 50          55          60
Val Arg Asn Val Phe Lys Glu Leu Gln Ile Met Gln Gly Leu Glu His
 65          70          75          80
Pro Phe Leu Val Asn Leu Trp Tyr Ser Phe Gln Asp Glu Glu Asp Met
 85          90          95
15 Phe Met Val Val Asp Leu Leu Leu Gly Gly Asp Leu Arg Tyr His Leu
 100          105          110
Gln Gln Asn Val His Phe Lys Glu Glu Thr Val Lys Leu Phe Ile Cys
 115          120          125
20 Glu Leu Val Met Ala Leu Asp Tyr Leu Gln Asn Gln Arg Ile Ile His
 130          135          140
Arg Asp Met Lys Pro Asp Asn Ile Leu Leu Asp Glu His Gly His Val
 145          150          155          160
His Ile Thr Asp Phe Asn Ile Ala Ala Met Leu Pro Arg Glu Ile Gln
 165          170          175
25 Ile Thr Thr Met Ala Gly Thr Lys Pro Tyr Met Ala Pro Glu Met Phe
 180          185          190
Ser Ser Arg Lys Gly Ala Gly Tyr Ser Phe Ala Val Asp Trp Trp Ser
 195          200          205
30 Leu Gly Val Thr Ala Tyr Glu Leu Leu Arg Gly Arg Arg Pro Tyr His
 210          215          220
Ile Arg Ser Ser Thr Ser Ser Lys Glu Ile Val His Thr Phe Glu Thr
 225          230          235          240
35 Thr Val Val Thr Tyr Pro Ser Ala Trp Ser Gln Glu Met Val Ser Leu
 245          250          255
Leu Lys Lys Leu Leu Glu Pro Asn Pro Asp Gln Arg Phe Ser Gln Leu
 260          265          270
40 Ser Asp Val Gln Asn Phe Pro Tyr Met Asn Asp Ile Asn Trp Asp Ala
 275          280          285
Val Phe Gln Lys Arg Leu Ile Pro Gly Phe Ile Pro Asn Lys Gly Arg
 290          295          300
45 Leu Asn Cys Asp Pro Thr Phe Glu Leu Glu Glu Met Ile Leu Glu Ser
 305          310          315          320
Lys Pro Leu His Lys Lys Lys Lys Arg Leu Ala Lys Lys Glu Lys Asp
 325          330          335
Met Arg Lys Cys Asp Ser Ser Gln Thr Cys Leu Leu Gln Glu His Leu
 340          345          350
50 Asp Ser Val Gln Lys Glu Phe Ile Phe Asn Arg Glu Lys Val Asn
 355          360          365
Arg Asp Phe Asn Lys Arg Gln Pro Asn Leu Ala Leu Glu Gln Thr Lys
 370          375          380
55 Asp Pro Gln Gly Glu Asp Gly Gln Asn Asn Asn Leu
 385          390          395

```

<210> 3

<211> 1191

60 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 266 195 T3

<400> 3

	atgggagcca	acacttcaag	aaaaccacca	gtgtttgatg	aaaatgaaga	tgtcaacttt	60
	gaccactttg	aaattttgcg	agccattggg	aaaggcagtt	ttgggaaggt	ctgcatttga	120
5	cagaagaatg	ataccaagaa	gatgtacgca	atgaagtaca	tgaataaaca	aaagtgcgtg	180
	gagcgcaatg	aagtgagaaa	tgtcttcaag	gaactccaga	tcatgcaggg	tctgggagcac	240
	cctttcctgg	ttaatttggt	gtattccttc	caagatgagg	aagacatggt	catggtggtg	300
	gacctcctgc	tgggtggaga	cctgcgttat	cacctgcaac	agaacgtcca	cttcaaggaa	360
	gaaacagtga	agctcttcat	ctgtgagctg	gtcatggccc	tggactacct	gcagaaccag	420
10	cgcattcattc	acagggatat	gaagcctgac	aatattttac	ttgacgaaca	tgggcacgtg	480
	cacatcacag	atttcaacat	tgtcgcgatg	ctgccagggg	agatacagat	taccaccatg	540
	gctggcacca	agccttacat	ggcacctgag	atgttcagct	ccagaaaagg	agcaggctat	600
	tcctttgctg	ttgactgggt	gtccctggga	gtgacggcat	atgaactgct	gagaggccgg	660
	agaccgtatc	atattcgctc	cagtacttcc	agcaaggaaa	ttgtacacac	gtttgagacg	720
15	actgttgtaa	cttacccttc	tgccctggta	caggaaatgg	tgtcacttct	taaaaagcta	780
	ctcgaaccta	atccagacca	acgattttct	cagttatctg	atgtccagaa	cttcccgtat	840
	atgaatgata	taaactggga	tgcagttttt	cagaagagggc	tcattccagg	tttcattcct	900
	aataaaggca	ggctgaattg	tgatcctacc	tttgaacttg	aggaaatgat	tttggagtcc	960
20	aaacctctac	ataagaaaaa	aaagcgtctg	gcaaagaagg	agaaggatat	gaggaaatgc	1020
	gattcttctc	agacatgtct	tcttcaagag	caccttgact	ctgtccagaa	ggagtccata	1080
	attttcaaca	gagaaaaagt	aaacagggac	tttaacaaaa	gacaacccaa	tctagccttg	1140
	gaacaaacca	aagaccacaca	aggtgaggat	ggtcagaata	acaacttgta	a	1191

25 <210> 4

<211> 270

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de consenso del sitio quinasa Ser/Thr

35 <221> VARIANTE

<222> (1)...(270)

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

40

45

50

55

60

65

ES 2 266 195 T3

<400> 4

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1           5           10           15
5 Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa
 20           25           30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35           40           45
10 Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50           55           60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65           70           75           80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85           90           95
15 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100          105          110
Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Arg Asp
 115          120          125
20 Xaa Lys Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130          135          140
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Asp Phe Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 145          150          155          160
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165          170          175
25 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp
 180          185          190
Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195          200          205
30 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 210          215          220
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 225          230          235          240
35 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa
 245          250          255
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa
 260          265          270

```

40 <210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> aminoácido de consenso

50 <221> VARIANTE

<222> (1)...(30)

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

55 <400> 5

```

Gly Xaa Gly Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10           15
60 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys
 20           25           30

```

<210> 6

65 <211> 278

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 266 195 T3

<220>

<223> aminoácido de consenso

5 <400> 6

```

Tyr Glu Leu Leu Glu Lys Leu Gly Glu Gly Ser Phe Gly Lys Val Tyr
 1          5          10          15
Lys Ala Lys His Lys Thr Gly Lys Ile Val Ala Val Lys Ile Leu Lys
10          20          25          30
Lys Glu Ser Leu Ser Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu Lys Arg Leu Ser
          35          40          45
His Pro Asn Ile Val Arg Leu Leu Gly Val Phe Glu Asp Thr Asp Asp
          50          55          60
15 His Leu Tyr Leu Val Met Glu Tyr Met Glu Gly Gly Asp Leu Phe Asp
          65          70          75          80
Tyr Leu Arg Arg Asn Gly Pro Leu Ser Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile
          85          90          95
20 Ala Leu Gln Ile Leu Arg Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Asn Gly Ile
          100          105          110
Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Glu Asn Gly
          115          120          125
Thr Val Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Glu Lys Leu
          130          135          140
25 Thr Thr Phe Val Gly Thr Pro Trp Tyr Met Met Ala Pro Glu Val Ile
          145          150          155          160
Leu Glu Gly Arg Gly Tyr Ser Ser Lys Val Asp Val Trp Ser Leu Gly
          165          170          175
30 Val Ile Leu Tyr Glu Leu Leu Thr Gly Gly Pro Leu Phe Pro Gly Ala
          180          185          190
Asp Leu Pro Ala Phe Thr Gly Gly Asp Glu Val Asp Gln Leu Ile Ile
          195          200          205
Phe Val Leu Lys Leu Pro Phe Ser Asp Glu Leu Pro Lys Thr Arg Ile
          210          215          220
35 Asp Pro Leu Glu Glu Leu Phe Arg Ile Lys Lys Arg Arg Leu Pro Leu
          225          230          235          240
Pro Ser Asn Cys Ser Glu Glu Leu Lys Asp Leu Leu Lys Lys Cys Leu
          245          250          255
40 Asn Lys Asp Pro Ser Lys Arg Pro Gly Ser Ala Thr Ala Lys Glu Ile
          260          265          270
Leu Asn His Pro Trp Phe
          275

```

45 <210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> aminoácido de consenso

55 <400> 7

```

Arg Blu Ile Asp Trp Asp Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ile Glu Pro Pro
 1          5          10          15
60 Phe Lys Pro Lys
          20

```

<210> 8

65 <211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 266 195 T3

<220>

<223> aminoácido de consenso

5 <400> 8

```

      Pro Tyr Tyr Val Ser Met Lys Ser Met Ala Pro Glu Tyr Met Ala Pro
      1          5          10          15
10    Glu Ser Ser Ala Thr Asn Tyr Gln Lys Tyr Ser Thr Lys Ser Asp Val
      20          25          30
      Trp Ser Phe Gly Val Ile Leu Tyr Glu Met Leu Thr Gly Lys Pro Pro
      35          40          45
      Phe Phe Pro Gly Glu Ser Glu Val Ser Glu Glu Glu Pro Tyr Gln Ser
      50          55          60
15    Met Lys Asn Met Glu Val Leu Glu Met Gly Pro Glu Glu Thr Ile Gln
      65          70          75          80
      Lys Val Met Ser Lys Ile Val Glu Lys Lys Gly Glu Arg Met Pro Gln
      85          90          95
20    Pro Ser Ser Ser Asn Cys Pro Glu Val Ser Gln Glu Ala Lys Asp Leu
      100          105          110
      Leu Lys Lys Cys Leu Gln Lys Asp Pro Glu Lys Arg Arg Pro Thr Phe
      115          120          125
      Glu

```

25 <210> 9

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> aminoácido de consenso

35 <400> 9

```

      Tyr Val His Gln Ile Ala Lys Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Lys Asn
      1          5          10          15
40    Gln Lys His Gln Gly Ile Ile His Arg Ala Lys Lys Val Asp Leu Lys
      20          25          30
      Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Glu Glu Ser His
      35          40

```

45 <210> 10

<211> 53

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> aminoácido de consenso

55

<400> 10

```

      Tyr Glu Leu Leu Lys Lys Leu Leu Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val
      1          5          10          15
60    Tyr Lys Ala Lys His Lys Ser Thr Ser Thr Thr Gly Glu Val Val Ala
      20          25          30
      Val Lys Val Met Lys Lys Lys Lys Val Met Glu Lys Ser Ser Lys Glu
      35          40          45
65    Ser Ser Ser Lys Lys
      50

```

ES 2 266 195 T3

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> aminoácido de consenso

10

<400> 11

	Ser	Gln	Glu	Ala	Lys	Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	Cys	Leu	Gln	Lys	Asp	Pro
15	1				5				10					15		
	Glu	Lys	Arg	Arg	Pro	Thr	Phe	Glu	Glu	Ile	Leu	Gln	His	Pro	Trp	
			20					25					30			

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65