



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 078**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06782210 .6**

96 Fecha de presentación : **26.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1910570**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **Gen y polipéptido relacionados con el cáncer de mama.**

30 Prioridad: **29.07.2005 US 703658 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.08.2011

73 Titular/es: **ONCOTHERAPY SCIENCE, Inc.**
2-1, Sakado 3-chome
Takatsu-ku, Kawasaki-shi
Kanagawa 213-0012, JP

72 Inventor/es: **Nakamura, Yusuke;**
Katagiri, Toyomasa y
Nakatsuru, Shuichi

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 078 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

Gen y polipéptido relacionados con el cáncer de mama.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al campo de las ciencias biológicas, y más específicamente al campo de la terapia y el diagnóstico del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a polipéptidos nuevos codificados por un gen *B7330N* nuevo que está relacionado con el cáncer de mama. Además, la invención, tal como se describe en la presente memoria, se refiere al gen *B7330N* nuevo. Los genes y los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden usar, por ejemplo, en el diagnóstico del cáncer de mama, como moléculas objetivo para el desarrollo de fármacos contra la enfermedad, y para atenuar el crecimiento celular del cáncer de mama.

Técnica antecedente

15 El cáncer de mama, una enfermedad genéticamente heterogénea, es la neoplasia maligna más habitual en la mujer. Cada año se informa en todo el mundo de una estimación de aproximadamente 800.000 casos nuevos (Parkin Dm, *et al.*, 1999, CA Cancer J Clin 49: 33-64). La mastectomía es la primera opción concurrente para el tratamiento de esta enfermedad. A pesar de la eliminación quirúrgica de los tumores primarios, se puede dar la recidiva en sitios cercanos o lejanos debido a la micrometástasis indetectable (Saphner T, *et al.*, 1996, J Clin Oncol, 14, 2738-46) en el momento del diagnóstico. Normalmente se administran agentes citotóxicos como terapia adyuvante tras la cirugía dirigidos a destruir esas células residuales o premalignas.

25 El tratamiento con agentes quimioterápicos convencionales a menudo es empírico y se basa principalmente en parámetros tumorales histológicos, y en la ausencia de una comprensión mecanística específica. Los fármacos dirigidos a objetivos específicos se están convirtiendo, por lo tanto, en el tratamiento fundamental del cáncer de mama. Se ha demostrado que el tamoxifeno y los inhibidores de la aromatasa, dos representantes de esta clase, tienen una gran respuesta usados como adyuvantes o quimioprevención en pacientes con cáncer de mama metastatizado (Fisher B, *et al.*, (1998) J Natl Cancer Inst, 90, 1371-88; Cuzick J, *et al.*, (2002) Lancet 360, 817-24). Sin embargo, la desventaja es que solamente los pacientes que expresan receptores de estrógenos son sensibles a estos fármacos. Recientemente han surgido preocupaciones relacionadas con sus efectos secundarios, en particular con respecto a la posibilidad de provocar cáncer endometrial por el tratamiento con tamoxifeno a largo plazo, así como el efecto perjudicial de fracturas óseas en las mujeres post menopáusicas en pacientes a las que se prescribe aromatasa (Coleman RE, *et al.*, (2004) Oncology. 18 (5 Supl. 3), 16-20).

35 Debido a la aparición de los efectos secundarios y la resistencia al fármaco, obviamente es necesario investigar objetivos moleculares nuevos para fármacos inteligentes selectivos basándose en los mecanismos de acción caracterizados. Para alcanzar este objetivo, se han analizado los perfiles de expresión de 77 tumores de mama, que incluyen 8 DCISs y 69 IDCs purificados por medio de una combinación de una microdissección con micro-rayo láser (LMM) y una micromatriz de cADN que representa 27.648 genes. Los datos de estos experimentos no solamente deberían proporcionar información importante sobre la tumorigénesis mamaria, sino que también tienen un valor inestimable para identificar genes candidatos cuyos productos podrían servir como marcadores de diagnóstico y/o objetivos moleculares para el tratamiento del cáncer de mama.

45 Los documentos WO 02/059377 A2 y WO 2004/078035 A2 describen GALNT6 (que corresponde a B7330N) como uno de varios genes identificados que se sobreexpresan en el cáncer de mama.

El documento EP-A-1 621 632 que corresponde al documento WO 2006/013474 muestra la activación lineal de GALNT6 (GALNAc) en el cáncer de mama y el tumor de mama en comparación con las células PBMN normales.

50 Además, el documento WO 2004/094636 describe siARNs dirigidos contra GALNT6. Marcos (Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Histochemical Society, Nueva York; 51; 761-771 (2004)) y Bennett (JBC; 274; 25362-25370 (1999)) describen anticuerpos y cebadores que se dirigen contra el polipéptido GALNT6.

55 En esta invención se aisló un gen nuevo, B7330N que se sobreexpresaba de manera significativa en las células de cáncer de mama por medio del perfil de expresión del cáncer de mama, y se confirmó además que B7330N se sobreexpresaba en las células de cáncer de mama mediante análisis de RT-PCR semicuantitativa y análisis de transferencia de Northern. Se demostró que el tratamiento de las células de cáncer de mama con siARNs inhibió de manera eficaz la expresión de B7330N e inhibió el crecimiento celular/tumoral del cáncer de mama. En conjunto, se sugiere que B7330N, también denominado *GALNT6*, es un nuevo candidato molecular destacado para el desarrollo de marcadores de diagnóstico y el desarrollo de fármacos para el cáncer de mama.

65 Los estudios diseñados para revelar los mecanismos de la carcinogénesis ya han facilitado la identificación de objetivos moleculares para los agentes antitumorales. Por ejemplo, los inhibidores de la farnesiltransferasa (FTIs) que se desarrollaron inicialmente para inhibir la ruta de señalización del crecimiento relacionada con Ras, cuya activación depende de la farnesilación postraduccion, han sido eficaces en el tratamiento de tumores dependientes de Ras en modelos animales (Sun J, *et al.*, Oncogene 16:1467-73 (1998)). Se han llevado a cabo ensayos clínicos en humanos mediante el uso de una combinación de fármacos antineoplásicos y un anticuerpo monoclonal anti-HER2, trastuzumab,

para antagonizar el receptor del proto-oncogén HER2/neu; y se ha alcanzado una respuesta clínica y una supervivencia global mejoradas de las pacientes de cáncer de mama (Molina MA, *et al.*, *Cancer Res* 61:4744-4749 (2001)). Se ha desarrollado un inhibidor de tirosina quinasa, STI-571, que inactiva de manera selectiva las proteínas de fusión bcr-abl, para tratar las leucemias mielógenas crónicas en las que la activación constitutiva de la tirosina quinasa bcr-abl desempeña un papel crucial en la transformación de los leucocitos. Se diseñan agentes de estas clases para inhibir la actividad oncogénica de productos génicos específicos (O'Dwyer ME y Druker BJ, *Curr Opin Oncol* 12:594-7 (2000)). Por lo tanto, los productos génicos activados normalmente en las células cancerosas pueden servir como objetivos potenciales para el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos.

Se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTLs) reconocen epítopos peptídicos derivados de antígenos asociados a tumores (TAAs) presentados en la molécula de la clase I del MHC, y lisan las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia MAGE como el primer ejemplo de TAAs, se han descubierto otros muchos TAAs mediante el uso de aproximaciones inmunológicas (Boon, *Int J Cancer* 54: 177-80 (1993); Boon y van der Bruggen, *J Exp Med* 183: 725-9 (1996); van der Bruggen *et al.*, *Science* 254: 1643-7 (1991); Brichard *et al.*, *J Exp Med* 178: 489-95 (1993); Kawakami *et al.*, *J Exp Med* 180: 347-52 (1994)). Algunos de los TAAs descubiertos están ahora en la fase de desarrollo clínico como objetivos de la inmunoterapia. Los TAAs descubiertos hasta ahora incluyen MAGE (van der Bruggen *et al.*, *Science* 254: 1643-7 (1991)), gp100 (Kawakami *et al.*, *J Exp Med* 180: 347-52 (1994)), SART (Shichijo *et al.*, *J Exp Med* 187: 277-88 (1998)), y NY-ESO-1 (Chen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1914-8 (1997)). Por otra parte, los productos génicos que se ha demostrado que están sobreexpresados de manera específica en las células tumorales, se ha demostrado que son reconocidos como objetivos que inducen respuestas inmunitarias celulares. Tales productos génicos incluyen p53 (Umano *et al.*, *Brit J Cancer* 84: 1052-7 (2001)), HER2/neu (Tanaka *et al.*, *Brit J Cancer* 84: 94-9 (2001)), CEA (Nukaya *et al.*, *Int J Cancer* 80: 92-7 (1999)), etc.

A pesar del progreso significativo en la investigación básica y clínica relacionada con los TAAs (Rosenberg *et al.*, *Nature Med* 4: 321-7 (1998); Mukherji *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8078-82 (1995); Hu *et al.*, *Cancer Res* 56: 2479-83 (1996)), solamente hay disponible un número limitado de TAAs candidatos para el tratamiento de adenocarcinomas, que incluyen el cáncer colorrectal. Los TAAs expresados abundantemente en las células cancerosas, y al mismo tiempo aquellos cuya expresión se limita a las células cancerosas, serían candidatos prometedores como objetivos inmunoterapéuticos. Además, se espera que la identificación de nuevos TAAs que induzcan respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas estimule el uso clínico de la estrategia de vacunación con péptidos en diversos tipos de cáncer (Boon y van der Bruggen, *J Exp Med* 183: 725-9 (1996); van der Bruggen *et al.*, *Science* 254: 1643-7 (1991); Brichard *et al.*, *J Exp Med* 178: 489-95 (1993); Kawakami *et al.*, *J Exp Med* 180: 347-52 (1994); Shichijo *et al.*, *J Exp Med* 187: 277-88 (1998); Chen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1914-8 (1997); Harris, *J Natl Cancer Inst* 88: 1442-55 (1996); Butterfield *et al.*, *Cancer Res* 59: 3134-42 (1999); Vissers *et al.*, *Cancer Res* 59: 5554-9 (1999); van der Burg *et al.*, *J Immunol* 156: 3308-14 (1996); Tanaka *et al.*, *Cancer Res* 57: 4465-8 (1997); Fujie *et al.*, *Int J Cancer* 80: 169-72 (1999); Kikuchi *et al.*, *Int J Cancer* 81: 459-66 (1999); Oiso *et al.*, *Int J Cancer* 81: 387-94 (1999)).

Se ha informado reiteradamente que las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) estimuladas con péptidos de ciertos donantes sanos producen niveles significativos de IFN- γ en respuesta al péptido, pero rara vez ejercen citotoxicidad contra células tumorales de una manera limitada a HLA-A24 o -A0201 en ensayos de liberación de ^{51}Cr (Kawano *et al.*, *Cancer Res* 60: 3550-8 (2000); Nishizaka *et al.*, *Cancer Res* 60: 4830-7 (2000); Tamura *et al.*, *Jpn J Cancer Res.* 92: 762-7 (2001)). Sin embargo, tanto HLA-A24 como HLA-A0201 son uno de los alelos más habituales de HLA en la población japonesa, así como en la población caucásica (Date *et al.*, *Tissue Antigens* 47: 93-101 (1996); Kondo *et al.*, *J Immunol* 155: 4307-12 (1995); Kubo *et al.*, *J Immunol* 152: 3913-24 (1994); Imanishi *et al.*, *Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Oxford University Press, Oxford*, 1065 (1992); Williams *et al.*, *Tissue Antigens* 49: 129 (1997)). Así, los péptidos antigénicos de los cánceres presentados por estos HLAs pueden ser especialmente útiles para el tratamiento de cánceres en las poblaciones japonesa y caucásica. Además, se sabe que la inducción de CTL de baja afinidad *in vitro* resulta normalmente del uso del péptido a concentración elevada, lo que genera un nivel elevado de complejos péptido/MHC específicos en las células presentadoras de antígenos (APCs), lo cual activará de manera eficaz estos CTL (Alexander-Miller *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4102-7 (1996)).

Sumario de la invención

Para aislar objetivos moleculares nuevos para los tratamientos del cáncer de mama, se investigaron los perfiles precisos de expresión genómica de 77 casos con cáncer de mama premenopáusico mediante el uso de una combinación de micromatriz de cADN y microdissección con micro-rayo láser. Entre los genes activados, se identificó B7330N, también denominado UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 6 (*GALNT6*), que estaba sobreexpresado al triple en 27 de 77 (35%) casos de cáncer de mama de los que se pudieron obtener datos de la expresión. La RT-PCR semicuantitativa posterior confirmó que B7330N estaba activado en 7 de 12 muestras clínicas de cáncer de mama y 7 de 20 líneas celulares de cáncer de mama, en comparación con los órganos humanos normales que incluían células ductales de mama o mama normal. Los análisis de transferencia de Northern revelaron que el transcrito de B7330N se expresaba solamente en líneas celulares de cáncer de mama y placenta, páncreas, estómago, tráquea, glándula mamaria y médula ósea humanas normales. La tinción inmunocitoquímica demuestra que la localización subcelular de B7330N exógena apareció en forma de un patrón granuloso en las vesículas de secreción de las células COS7. La inducción de cADN de B7330N en las células COS7 condujo a la secreción del producto génico en los medios de cultivo y dio como resultado un incremento del crecimiento celular. El tratamiento de las células de

ES 2 364 078 T3

cáncer de mama con ARNs pequeños de interferencia (siARNs) inhibió de manera eficaz la expresión de B7330N e inhibió el crecimiento celular/tumoral de las líneas celulares de cáncer de mama, T47D y BT-20, lo que indica que este gen desempeña un papel clave en la proliferación del crecimiento celular de una manera autocrina. Las pruebas combinadas indican que B7330N representa un candidato prometedor para el desarrollo de la terapia de selección de
5 objetivos moleculares, y podría servir como un marcador tumoral destacado de diagnóstico para pacientes con cáncer de mama.

B7330N codifica una proteína de 622 aminoácidos. Según un análisis de transferencia de Northern, se demostró que la expresión de B7330N se limitaba a las líneas celulares de cáncer de mama y a placenta, páncreas, estómago,
10 tráquea, glándula mamaria y médula ósea humanas normales.

Muchos fármacos antineoplásicos no son solamente tóxicos para las células cancerosas, sino también para las células que crecen normalmente. Sin embargo, los agentes que inhiben la expresión de B7330N no pueden afectar de
15 manera adversa a otros órganos debido al hecho de que la expresión normal de B7330N está limitada a la placenta, páncreas, estómago, tráquea, glándula mamaria y médula ósea, y así se puede usar de manera conveniente para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama.

Así, se describe en la presente memoria un gen aislado, B7330N, que sirve como candidato a marcador de diagnóstico para el cáncer de mama así como de objetivo potencial prometedor para el desarrollo de estrategias nuevas para el diagnóstico y para el desarrollo de agentes antineoplásicos eficaces. Además, se describe en la presente memoria un polipéptido codificado por este gen, así como la producción y el uso del mismo. De manera más específica, se describe en la presente memoria el polipéptido humano nuevo, B7330N, o un equivalente funcional del mismo, cuyas expresiones están elevadas en las células de cáncer de mama.

El polipéptido B7330N incluye una proteína de 622 aminoácidos codificada por el marco de lectura abierto de SEQ ID NO: 24 ó 26. El polipéptido B7330N incluye preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25. La presente solicitud también proporciona una proteína aislada codificada a partir de al menos una porción de la secuencia polinucleotídica de B7330N, o de secuencias polinucleotídicas al menos un 15% y más preferiblemente al menos un 25% complementarias respecto de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 24 ó 26.

La presente invención proporciona además un gen humano nuevo B7330N cuya expresión está notablemente elevada en la gran mayoría de cánceres de mama en comparación con el epitelio ductal de mama no canceroso. El gen B7330N aislado incluye una secuencia polinucleotídica como se describe en SEQ ID NO: 24 ó 26. En particular, el cADN de B7330N incluye 4381 ó 4556 nucleótidos que contienen un marco de lectura abierto de 1869 nucleótidos (SEQ ID NO: 24 ó 26). La invención, tal como se describe en la presente memoria, abarca además los polinucleótidos que hibridan con, y que son al menos un 15% y más preferiblemente al menos un 25% complementarios respecto a, la secuencia polinucleotídica expuesta en SEQ ID NO: 24 ó 26, hasta el punto de que codifican una proteína B7330N o un equivalente funcional de la misma. Los ejemplos de tales polinucleótidos son las moléculas degeneradas y los mutantes alélicos de B7330N codificados por la secuencia de sEq ID NO: 24 ó 26.

Tal como se usa en la presente memoria, un gen aislado es un polinucleótido cuya estructura no es idéntica a la de cualquier polinucleótido que se da de manera natural o a la de cualquier fragmento de un polinucleótido genómico que se da de manera natural que abarca más de tres genes distintos. El término, por lo tanto, incluye, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico que se da de manera natural en el genoma del organismo en el que se da de manera natural; (b) un polinucleótido incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote de manera que la molécula resultante no es idéntica a ningún vector o ADN genómico que se da de manera natural; (c) una molécula diferente tal como cADN, un fragmento genómico, un fragmento producido mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia nucleotídica recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica un polipéptido de fusión.

Por lo tanto, en un aspecto, se describe en la presente memoria un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido o un fragmento del mismo. Preferiblemente, el polinucleótido aislado incluye una secuencia nucleotídica que es al menos un 60% idéntica a la secuencia nucleotídica mostrada en SEQ ID NO: 24 ó 26. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislada es al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, idéntica a la secuencia nucleotídica mostrada en SEQ ID NO: 24 ó 26. En el caso de un polinucleótido aislado que es más largo o equivalente en longitud a la secuencia de referencia, p. ej., SEQ ID NO: 24 ó 26, la comparación se realiza con la longitud completa de la secuencia de referencia. Cuando el polinucleótido aislado es más corto que la secuencia de referencia, p. ej., más corto que SEQ ID NO: 24 ó 26, la comparación se realiza con un segmento de la secuencia de referencia de la misma longitud (excluyendo cualquier bucle necesario para el cálculo de la homología).

También se describe en la presente memoria un método para producir una proteína transfectando o transformando una célula hospedadora con una secuencia polinucleotídica que codifica la proteína B7330N, y expresando la secuencia polinucleotídica. Además, también se describen en la presente memoria vectores que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica la proteína B7330N, y células hospedadoras que albergan polinucleótidos que codifican la proteína B7330N. Tales vectores y células hospedadoras se pueden usar para producir la proteína B7330N.

También se describe en la presente memoria un agente de unión que reconoce de manera específica la proteína B7330N. Por ejemplo, un agente de unión puede ser un anticuerpo generado hacia una proteína B7330N. De manera alternativa, un agente de unión puede ser un ligando específico para la proteína, o un polipéptido sintético que se une de manera específica a la proteína (véase, p. ej., el documento WO2004044011). También se describe en la presente memoria un polinucleótido antisentido (p. ej., ADN antisentido), ribozima, y siRNA (ARN pequeño de interferencia) del gen *B7330N*.

La presente invención proporciona además un método para diagnosticar el cáncer de mama que incluye la etapa de determinar el nivel de expresión del gen en una muestra biológica de un sujeto, comparar el nivel de expresión del gen *B7330N* con el nivel de una muestra normal, y definir que un nivel de expresión elevado del gen *B7330N* en la muestra indica que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Además, se describe en la presente memoria un método para cribar en busca de un compuesto para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama. El método incluye poner en contacto el polipéptido B7330N con los compuestos de ensayo, y seleccionar los compuestos de ensayo que se unen o que inhiben la actividad biológica del polipéptido B7330N.

Además, se describe en la presente memoria un método para cribar en busca de un compuesto para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, en el que el método incluye poner en contacto un compuesto de ensayo con una célula que expresa el polipéptido B7330N o a la que se le ha introducido un vector que comprende la región reguladora transcripcional de *B7330N* en posición 5' respecto de un gen indicador, y seleccionar el compuesto de ensayo que inhibe el nivel de glicosilación del polipéptido B7330N. En estas realizaciones, el nivel de glicosilación es el de la asparagina 476 del polipéptido B7330N.

También se describe en la presente memoria un método de cribado en busca de un compuesto para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, en el que el método incluye poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido B7330N, o una célula que expresa el polipéptido B7330N, y seleccionar el compuesto de ensayo que inhibe el nivel de glicosilación del polipéptido B7330N. En estas realizaciones, el nivel de glicosilación es el de la asparagina 476 del polipéptido B7330N.

También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama. La composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, un agente antineoplásico. La composición farmacéutica puede comprender al menos una porción de S-oligonucleótidos antisentido, moléculas de siRNA o ribozimas contra la secuencia polinucleotídica de *B7330N* mostrada y descrita en SEQ ID NO: 24 ó 26, respectivamente. Los objetivos de siRNA adecuados son una secuencia de SEQ ID NOs: 18 ó 22. Así, un siRNA tal como se describe en la presente memoria comprende una secuencia nucleotídica de SEQ ID NOs: 18 ó 22. Esto se puede seleccionar de manera preferible como objetivo para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama según la invención tal como se describe en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden ser también aquellas que comprenden los compuestos seleccionados mediante los presentes métodos de cribado en busca de compuestos para el tratamiento o la prevención de enfermedades proliferativas celulares tales como el cáncer de mama.

El curso de acción de la composición farmacéutica es idealmente inhibir el crecimiento de las células cancerosas tales como las células de cáncer de mama. La composición farmacéutica se puede aplicar a mamíferos, lo que incluye seres humanos y animales domesticados.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de los análisis mediante RT-PCR semicuantitativa y transferencia de Northern. Expresión de *B7330N* en (a) células tumorales de pacientes de cáncer de mama y tejidos humanos normales, (b) líneas celulares de cáncer de mama; HBC4, HBC5, HBL-100, HCC1937, MCF-7, MDA-MB-231, SKBR3, T47D, YMB1 (panel superior), BT-20, BT-474, BT-549, HCC1143, HCC1500, HCC1599, MDA-MB-157, MDA-MB-435s, MDA-MB-453, OCUCB-FandZR-75-1 (panel inferior) y glándula mamaria. Análisis de transferencia de Northern de los transcritos de *B7330N* en diversos tejidos humanos (c), y líneas celulares de cáncer de mama y órganos vitales humanos normales (d).

La Figura 2 (a) muestra la localización subcelular de la proteína *B7330N* exógena. La Figura 2 (b) muestra la expresión exógena de la proteína *B7330N* mediante un análisis de transferencia de Western.

La Figura 3 (a) muestra el tratamiento con N-glicosidasa de la proteína *B7330N*. La Figura 3 (b) muestra el análisis de transferencia de Western con *B7330N* de tipo natural, mutante N476A, y mutante N611A en lisados celulares. La Figura 3 (c) muestra el efecto de la N-glicosilación sobre la secreción de la proteína *B7330N*.

La Figura 4 muestra el efecto inhibitor del crecimiento de ARNs pequeños de interferencia (siARNs) diseñados para reducir la expresión de *B7330N* en células T47D y en células BT-20. La Figura 4 (a) muestra la RT-PCR semicuantitativa que demuestra la inhibición de la expresión endógena de *B7330N* en líneas celulares de cáncer de mama, T47d y BT-20. Se usó *GAPDH* como control interno. La Figura 4 (b) muestra el ensayo de MTT que demuestra una disminución del número de colonias mediante la eliminación de *B7330N* en células T47D y en células BT-20. La Figura 4 (c) muestra el ensayo de formación de colonias que demuestra la disminución del número de colonias mediante la eliminación de *B7330N* en células T47D y en células BT-20.

La Figura 5 muestra la detección del efecto autocrino de B7330N. a, Los cultivos de COS7 en medio que contenía B7330N mostraron un aumento del crecimiento celular en comparación con las células COS7 en un medio sin B7330N. b, Disminución del crecimiento de las células de cáncer de mama tras la exposición a pAb anti-B7330N. Las células se expusieron durante 5 días a IgG de conejo pre-inmune o pAb anti-HIG2, a concentraciones de 10,2 mg/mL. El histograma muestra los valores medios de tres experimentos, \pm DE.

La Figura 6 muestra la homo-dimerización de las proteínas B7330N. Análisis mediante inmunoprecipitación de células COS-7 transfectadas con Mock y pCAGGS-B7330N-HA y pcDNA3.1-B7330N-myc.

Figura 7. Expresión de B7330N en líneas celulares de cáncer de mama y en cortes de tejido. a, Expresión de la proteína B7330N endógena en líneas celulares de cáncer de mama en comparación con la línea celular HMEC, examinada mediante análisis de transferencia de Western con el uso de un anticuerpo anti-B7330N purificado por afinidad. b, Dos líneas celulares de cáncer de mama, SKBR3 y T47D se tiñeron inmunocitoquímicamente con anticuerpo anti-B7330N (rojo) y DAPI (azul) para distinguir el núcleo (véase la sección de Materiales y Métodos). c, Resultados de la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer de mama (571T y 164T) mama normal (425N). La proteína B7330N endógena se tiñó mediante el uso de un pAb anti-B7330N. La expresión apenas se detectó en los tejidos de mama normal (425N), pero las células cancerosas se tiñeron intensamente en el citoplasma en todos los tejidos cancerosos investigados, que incluyen los tejidos intraductales (164T) y papilo-tubulares (571T). Las figuras representativas fueron a partir de la observación microscópica con el aumento original, superior; x 100 e inferior; x 200. d, Resultados de la tinción inmunohistoquímica de los órganos vitales normales. La proteína B7330N endógena se tiñó mediante el uso de un pAb anti-B7330N. No se observó expresión en el corazón, pulmón, hígado, riñón y páncreas.

Figura 8. Efecto estimulador del crecimiento de B7330N exógena en las células NIH3T3. a, Análisis de transferencia de Western de las células que expresaban B7330N exógena a nivel elevado o de las transfectadas con un vector simulado. La introducción exógena de la expresión de B7330N se validó con un anticuerpo monoclonal anti-marcador de HA. La β -actina sirvió como control de carga. b, Crecimiento *in vitro* de células NIH3T3-B7330N. Células NIH3T3 transfectadas con WT-B7330N (WT-B7330N -1, y -2) y con vector simulado (N7H3T3-Mock-1 y -2), medidas mediante el ensayo de MTT.

30 Descripción detallada de la invención

Las palabras “un”, “uno” y “el”, tal como se usan en la presente memoria, significan “al menos uno”, a menos que se indique específicamente de otra manera. En toda esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que aparecen a continuación, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, se entenderá que la palabra “comprender”, y las variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, implican la inclusión de una entidad o etapa mencionadas o grupo de entidades o etapas, pero sin la exclusión de cualquier otra entidad o etapa o grupo de entidades o etapas.

Para revelar los mecanismos del cáncer de mama e identificar nuevos marcadores de diagnóstico y/o objetivos para fármacos para el tratamiento y/o la prevención de estos tumores, los presentes inventores analizaron los perfiles de expresión de genes en el cáncer de mama mediante el uso de una micromatriz de cADN de todo el genoma combinada con una microdissección con micro-rayo láser. Como resultado, se identificó que *B7330N* estaba sobreexpresado en las células de cáncer de mama. Además, la inhibición de la expresión del gen *B7330N* con ARNs pequeños de interferencia (siRNAs) dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento de las células cancerosas. Estos hallazgos indican que B7330N otorga actividades oncogénicas a las células cancerosas, y que la inhibición de la actividad de estas proteínas podría ser una estrategia prometedora para el tratamiento y la prevención de enfermedades proliferativas tales como los cánceres de mama.

50 *B7330N*

El gen de B7330N se describe en la presente memoria. El cADN de B7330N consiste en 4381 ó 4556 nucleótidos que contienen un marco de lectura abierto de 1869 nucleótidos (SEQ ID NO: 24 ó 26; N° de acceso de GenBank AB265820). Estos marcos de lectura abiertos codifican una proteína de 622 aminoácidos.

Así, se describen en la presente memoria los polipéptidos sustancialmente puros codificados por estos genes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, así como los equivalentes funcionales de los mismos, hasta el punto de que codifican una proteína B7330N. Los ejemplos de polipéptidos funcionalmente equivalentes a B7330N incluyen, por ejemplo, las proteínas homólogas de otros organismos que corresponden a la proteína B7330N humana, así como los mutantes de las proteínas B7330N humanas.

La expresión “funcionalmente equivalente”, tal como se describe en la presente memoria, significa que el polipéptido en cuestión tiene actividad para estimular la proliferación celular como la proteína B7330N y para conferir actividad oncogénica a las células cancerosas. El hecho de si el polipéptido en cuestión tiene una actividad de proliferación celular o no, se puede juzgar introduciendo el ADN que codifica el polipéptido en cuestión en una célula, expresando el polipéptido respectivo y detectando la estimulación de la proliferación de las células o el incremento de la actividad de formación de colonias. Tales células incluyen, por ejemplo, NIH3T3, COS7 y HEK293.

Los métodos de preparación de polipéptidos funcionalmente equivalentes respecto de una proteína dada son muy conocidos para una persona experta en la técnica, e incluyen los métodos conocidos de introducción de mutaciones en la proteína. Por ejemplo, un experto en la técnica puede preparar polipéptidos funcionalmente equivalentes a la proteína B7330N humana introduciendo una mutación adecuada en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas mediante mutagénesis dirigida (Hashimoto-Gotoh *et al.*, *Gene* 152:271-5 (1995); Zoller y Smith, *Methods Enzymol* 100: 468-500 (1983); Kramer *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12: 9441-56, (1984). Kramer y Fritz, *Methods Enzymol* 154: 350-67 (1987); Kunkel, *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 488-92 (1985); Kunkel, *et al.*, *Methods Enzymol* 204: 125-39 (1991)). Las mutaciones de aminoácidos también se pueden dar en la naturaleza. El polipéptido descrito en la presente memoria incluye las proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos de la proteína B7330N humana en la que uno o más aminoácidos están mutados, con tal de que los polipéptidos mutados resultantes sean funcionalmente equivalentes a la proteína B7330N humana. El número de aminoácidos a mutar en tal mutante es generalmente de 10 aminoácidos o menos, preferiblemente 6 aminoácidos o menos, y más preferiblemente 3 aminoácidos o menos.

Se sabe que las proteínas mutadas o modificadas, las proteínas que tienen secuencias de aminoácidos modificadas mediante la sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o más residuos de aminoácidos de una cierta secuencia de aminoácidos, conservan la actividad biológica original (Mark *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5662-6 (1984); Zoller y Smith, *Nucleic Acids Res* 10: 6487-500 (1982); Dalbadie-McFarland *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6409-13 (1982)).

El residuo de aminoácido a mutar se muta preferiblemente hasta un aminoácido diferente en el que se conservan las propiedades de la cadena lateral del aminoácido (un proceso conocido como sustitución conservativa de aminoácidos). Los ejemplos de las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos son los aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), los aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), y las cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características comunes: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene una base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene un resto aromático (H, F, Y, W). Obsérvese que las letras entre paréntesis indican los códigos de una letra de los aminoácidos.

Un equivalente funcional preferible de la proteína B7330N tal como se describe en la presente memoria conserva un sitio de glicosilación de la misma. Por ejemplo, se confirmó que la proteína B7330N estaba glicosilada en 476N. Por lo tanto, en las realizaciones preferidas, un equivalente funcional de la proteína B7330N consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende 476N o un homólogo a 476N en una secuencia homóloga. La secuencia de aminoácidos del equivalente funcional de una proteína B7330N en una posición homóloga a la posición 476^a se puede determinar comparando las secuencias de aminoácidos. No es necesario que la posición en una proteína de interés sea la posición 476^a. Por ejemplo, en el caso de una proteína que tiene la estructura de la proteína B7330N que se ha modificado, por ejemplo, mediante una adición, inserción y/o delección de uno o más aminoácidos, la posición homóloga puede ser una posición distinta de la posición 476^a. En tal proteína, para determinar una posición homóloga a la posición 476^a en la proteína B7330N, las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas se alinean de forma que coincidan los aminoácidos mutuos así como los aminoácidos que tienen propiedades tan similares como sea posible, insertando huecos adecuados en ambas secuencias de aminoácidos si es necesario. Así, se puede determinar qué posición en una proteína de interés corresponde a una posición homóloga a la posición 476^a de la proteína B7330N. Los expertos en la técnica conocen dicho método, y se puede llevar a cabo fácilmente mediante el uso de programas informáticos disponibles comercialmente o publicados, por ejemplo, el programa informático analítico GENETYX-MAC VER. 10 (Software), etc.

Un ejemplo de un polipéptido al cual se añaden uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de la proteína B7330N humana es una proteína de fusión que contiene la proteína B7330N humana. Las proteínas de fusión, las fusiones de la proteína B7330N humana y otros péptidos o proteínas están incluidos en la presente invención. Las proteínas de fusión se pueden hacer mediante técnicas muy conocidas para un experto en la técnica, por ejemplo uniendo el ADN que codifica la proteína B7330N humana de la invención con ADN que codifica otros péptidos o proteínas, de forma que los marcos de lectura coincidan, insertando el ADN de fusión en un vector de expresión y expresándolo en un hospedador. No existe limitación en cuanto a los péptidos o las proteínas fusionadas a la proteína de la presente invención.

Los péptidos conocidos que se pueden usar como péptidos que se fusionan a la proteína de la presente invención incluyen, por ejemplo, FLAG (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6: 1204-10 (1988)), 6xHis que contiene seis residuos de His (histidina), 10xHis, aglutinina de la gripe (HA), fragmento de c-myc humana, fragmento de VSP-GP, fragmento de p18HIV, marcador de T7, marcador de HSV, marcador de E, fragmento del antígeno SV40T, marcador de Ick, fragmento de α -tubulina, marcador de B, fragmento de la Proteína C y similares. Los ejemplos de proteínas que se pueden fusionar a una proteína de la invención incluyen GST (glutathion-S-transferasa), aglutinina de la gripe (HA), región constante de inmunoglobulina, β -galactosidasa, MBP (proteína de unión a maltosa) y similares.

Se pueden preparar proteínas de fusión fusionando ADN disponible comercialmente, que codifica los péptidos o proteínas de fusión discutidas anteriormente, con el ADN que codifica el polipéptido de la presente invención y expresando el ADN fusionado preparado.

ES 2 364 078 T3

Un método alternativo conocido en la técnica para aislar polipéptidos funcionalmente equivalentes es, por ejemplo, el método que usa una técnica de hibridación (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning 2ª ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989)). Un experto en la técnica puede aislar fácilmente un ADN que tiene una homología elevada con todo o parte de la secuencia de ADN que codifica la proteína B7330N humana (es decir, SEQ ID NO: 24 ó 26), y aislar polipéptidos funcionalmente equivalentes a la proteína B7330N humana a partir del ADN aislado. Los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen aquellos que están codificados por ADN que hibrida con todo o parte de la secuencia de ADN que codifica la proteína B7330N humana, y que son funcionalmente equivalentes a la proteína B7330N humana. Estos polipéptidos incluyen homólogos de mamíferos que corresponden a la proteína derivada de seres humanos (por ejemplo, un polipéptido codificado por un gen de mono, rata, conejo y ganado bovino). Al aislar un cADN sumamente homólogo al ADN que codifica la proteína B7330N humana a partir de animales, es especialmente preferible usar tejidos de células de cáncer de mama y placenta, páncreas, estómago, traquea, glándula mamaria y médula ósea humanas normales.

Las condiciones de hibridación para el aislamiento de un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a la proteína B7330N humana pueden ser seleccionadas de manera rutinaria por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, la hibridación se puede llevar a cabo realizando una prehibridación a 68°C durante 30 min o más mediante el uso del “tampón Rapid-hyb” (Amersham LIFE SCIENCE), añadiendo una sonda marcada, y calentando a 68°C durante 1 hora o más. La siguiente etapa de lavado se puede llevar a cabo, por ejemplo, en condiciones de rigurosidad baja. Las condiciones de rigurosidad baja son, por ejemplo, 42°C, SSC 2x, 0,1% de SDS, o preferiblemente 50°C, SSC 2x, 0,1% de SDS. Más preferiblemente, se usan condiciones de rigurosidad elevada. Unas condiciones de rigurosidad elevada son, por ejemplo, lavar 3 veces en SSC 2x, 0,01% de SDS a temperatura ambiente durante 20 min, después lavar 3 veces en SSC 1x, 0,1% de SDS a 37°C durante 20 min, y lavar dos veces en SSC 1x, 0,1% de SDS a 50°C durante 20 min. Sin embargo, diversos factores, tales como la temperatura y la concentración salina, pueden influir en la rigurosidad de la hibridación, y un experto en la técnica puede seleccionar de manera adecuada los factores para conseguir la rigurosidad necesaria.

En lugar de la hibridación, se puede utilizar un método de amplificación génica, por ejemplo, el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para aislar un ADN que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a la proteína B7330N humana, mediante el uso de un cebador sintetizado basándose en la información de secuencia del ADN que codifica la proteína (SEQ ID NO: 24 ó 26).

Los polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a la proteína B7330N humana codificados por el ADN aislado por medio de las técnicas de hibridación anteriores o las técnicas de amplificación génica anteriores tienen normalmente una homología elevada respecto de la secuencia de aminoácidos de la proteína B7330N humana. “Homología elevada” se refiere en general a una homología del 40% o más, preferiblemente 60% o más, más preferiblemente 80% o más, aún más preferiblemente 85%, 90%, 93%, 95%, 98%, 99% o más entre una secuencia polipeptídica o una secuencia polinucleotídica y una secuencia de referencia. El porcentaje de homología (también denominado porcentaje de identidad) se lleva a cabo generalmente entre dos secuencias alineadas de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son muy conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias y la comparación se puede llevar a cabo, p. ej., mediante el uso del algoritmo de “Wilbur y Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80: 726-30 (1983)”.

Un polipéptido tal como se describe en la presente memoria tiene variaciones en la secuencia de aminoácidos, el peso molecular, el punto isoeléctrico, la presencia o ausencia de cadenas de hidrocarburos, o la forma, dependiendo de la célula o el hospedador usado para producirlo o el método de purificación utilizado. No obstante, con tal de que tenga una función equivalente a la de la proteína B7330N descrita en la presente memoria, estará dentro del alcance de la invención.

El polipéptido descrito en la presente memoria se puede preparar como una proteína recombinante o una proteína natural mediante métodos muy conocidos para los expertos en la técnica. Se puede preparar una proteína recombinante insertando un ADN que codifica el polipéptido descrito en la presente memoria (por ejemplo, el ADN que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26) en un vector de expresión adecuado, introduciendo el vector en una célula hospedadora adecuada, obteniendo el extracto, y purificando el polipéptido sometiendo el extracto a cromatografía, p. ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa, filtración en gel o cromatografía de afinidad mediante la utilización de una columna a la que se fijan anticuerpos hacia la proteína descrita en la presente memoria, o combinando más de una de las columnas anteriormente mencionadas.

Además, cuando el polipéptido descrito en la presente memoria se expresa en células hospedadoras (por ejemplo, células animales y *E. coli*) en forma de una proteína de fusión con la proteína glutatión-S-transferasa o en forma de una proteína recombinante complementada con múltiples histidinas, la proteína recombinante expresada se puede purificar mediante el uso de una columna de glutatión o una columna de níquel. De manera alternativa, cuando el polipéptido descrito en la presente memoria se expresa en forma de una proteína marcada con c-myc, múltiples histidinas o FLAG, se puede detectar y purificar mediante el uso de anticuerpos hacia c-myc, His o FLAG, respectivamente.

Después de purificar la proteína de fusión, también es posible excluir regiones distintas del polipéptido objetivo cortando con trombina o factor-Xa, según sea necesario.

ES 2 364 078 T3

Se puede aislar una proteína natural mediante métodos conocidos para una persona experta en la técnica, por ejemplo, poniendo en contacto la columna de afinidad, en la que están unidos anticuerpos que se unen a la proteína B7330N descritos más adelante, con el extracto de tejidos o células que expresan el polipéptido de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

5

También se incluyen los polipéptidos parciales de los polipéptidos descritos en la presente memoria.

El péptido parcial tiene una secuencia de aminoácidos específica del polipéptido de la presente invención y consiste en al menos 7 aminoácidos, preferiblemente 8 aminoácidos o más, y más preferiblemente 9 aminoácidos o más. El péptido parcial se puede usar, por ejemplo, para preparar anticuerpos hacia el polipéptido descrito en la presente memoria cribando en busca de un compuesto que se une al polipéptido descrito en la presente memoria, y cribando en busca de inhibidores del polipéptido descrito en la presente memoria.

Se puede producir un péptido parcial tal como se describe en la presente memoria mediante ingeniería genética, mediante métodos conocidos de síntesis peptídica o digiriendo el polipéptido de la invención con una peptidasa adecuada. Para la síntesis peptídica, por ejemplo, se puede usar la síntesis en fase sólida o la síntesis en fase líquida.

También se describen en la presente memoria otros polinucleótidos que codifican los polipéptidos de B7330N descritos anteriormente. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria se pueden usar para la producción *in vivo* o *in vitro* del polipéptido descrito anteriormente, o se pueden aplicar a la terapia génica para enfermedades que se atribuyen a una anomalía genética en el gen que codifica la proteína descrita en la presente memoria. Se puede usar cualquier forma del polinucleótido descrito en la presente memoria con tal de que codifique el polipéptido descrito en la presente memoria, lo que incluye mRNA, ARN, cADN, ADN genómico, polinucleótidos sintetizados químicamente. El polinucleótido descrito en la presente memoria incluye un ADN que comprende una secuencia nucleotídica dada así como sus secuencias degeneradas, con tal de que el ADN resultante codifique un polipéptido como se describe en la presente memoria.

El polinucleótido descrito en la presente memoria se puede preparar mediante métodos conocidos para una persona experta en la técnica. Por ejemplo, el polinucleótido descrito en la presente memoria se puede preparar: preparando una biblioteca de cADN a partir de células que expresan el polipéptido de la presente invención, y llevando a cabo una hibridación mediante el uso de una secuencia parcial del ADN de la presente invención (por ejemplo, SEQ ID NO: 24 ó 26) como sonda. Se puede preparar una biblioteca de cADN, por ejemplo, mediante el método descrito en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); de manera alternativa, se pueden usar bibliotecas de cADN disponibles comercialmente. También se puede preparar un biblioteca de cADN: extrayendo los ARNs de células que expresan el polipéptido de la presente invención, sintetizando oligo ADNs basados en la secuencia del ADN descrito en la presente memoria (por ejemplo, SEQ ID NO: 24 ó 26), llevando a cabo una PCR mediante el uso de los oligo ADNs como cebadores, y amplificando los cADNs que codifican la proteína de la presente invención.

Además, mediante la secuenciación de los nucleótidos del cADN obtenido, se puede determinar de manera rutinaria la región de traducción codificada por el cADN, y se puede obtener fácilmente la secuencia de aminoácidos del polipéptido descrito en la presente memoria. Además, cribando la biblioteca de ADN genómico mediante el uso del cADN obtenido o de partes del mismo como una sonda, se puede aislar el ADN genómico.

Más específicamente, primero se pueden preparar los mARNs a partir de una célula, tejido u órgano (p. ej., una célula de cáncer de mama y placenta, páncreas, estómago, tráquea, glándula mamaria y médula ósea humanas normales) en los que se expresa el polipéptido en cuestión de la invención. Se pueden usar métodos conocidos para aislar los mARNs; por ejemplo, se puede preparar el ARN total mediante ultracentrifugación con guanidina (Chirgwin *et al.*, Biochemistry 18:5294-9 (1979)) o el método AGPC (Chomczynski y Sacchi, Anal Biochem 162:156-9 (1987)). Además, se puede purificar el mRNA a partir del ARN total mediante el uso del mRNA Purification Kit (Pharmacia) y similares. De manera alternativa, se puede purificar directamente el mRNA mediante el QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia).

El mRNA obtenido se usa para sintetizar cADN mediante el uso de una transcriptasa inversa. Se puede sintetizar cADN mediante el uso de un equipo disponible comercialmente, tal como AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (Seikagaku Kogyo). De manera alternativa, se puede sintetizar cADN y amplificarlo siguiendo el método 5'-RACE (Frohman *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 85: 8998-9002 (1988); Belyavsky *et al.*, Nucleic Acids Res. 17: 2919-32 (1989)), que usa un cebador y, tal como se describe en la presente memoria, el equipo 5'-Ampli FINDER RACE (Clontech), y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se prepara un fragmento de ADN deseado a partir de los productos de PCR y se liga en un vector de ADN. Los vectores recombinantes se usan para transformar *E. coli* y similares, y se prepara un vector recombinante deseado a partir de una colonia seleccionada. La secuencia de nucleótidos del ADN deseado se puede verificar mediante métodos convencionales, tales como la terminación de cadenas con didesoxinucleótidos.

Se puede diseñar la secuencia nucleotídica de un polinucleótido descrito en la presente memoria para que se exprese de manera más eficaz teniendo en cuenta la frecuencia del uso de los codones en el hospedador a usar para la expresión (Grantham *et al.*, Nucleic Acids Res. 9: 43-74 (1981)). La secuencia del polinucleótido descrito en la presente memoria se puede alterar mediante un equipo disponible comercialmente o mediante un método convencional. Por ejemplo, la

ES 2 364 078 T3

secuencia se puede alterar mediante la digestión con enzimas de restricción, la inserción de un oligonucleótido sintético o un fragmento polinucleotídico adecuado, la adición de un espaciador, o la inserción del codón de iniciación (ATG) y/o el codón de parada (TAA, TGA o TAG).

5 De manera específica, el polinucleótido descrito en la presente memoria abarca el ADN que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26.

Además, también se describe en la presente memoria un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, y que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente a la proteína B7330N descrita anteriormente. Un experto en la técnica puede elegir de manera adecuada las condiciones rigurosas. Por ejemplo, se pueden usar condiciones de rigurosidad baja. Más preferiblemente, se pueden usar condiciones de rigurosidad elevada. Estas condiciones son las mismas que se describieron anteriormente. El ADN que hibrida mencionado anteriormente es preferiblemente un cADN o un ADN cromosómico.

15 También se describe en la presente memoria un polinucleótido que es complementario al polinucleótido que codifica la proteína B7330N humana (SEQ ID NO: 24 ó 26) o la cadena complementaria del mismo, y que comprende al menos 15 nucleótidos. El polinucleótido descrito en la presente memoria es preferiblemente un polinucleótido que hibrida de manera específica con el ADN que codifica el polipéptido B7330N descrito en la presente memoria. La expresión “hibrida de manera específica”, tal como se usa en la presente memoria, significa que no se da de manera significativa una hibridación cruzada con el ADN que codifica otras proteínas, en las condiciones de hibridación habituales, preferiblemente en condiciones de hibridación rigurosas. Tales polinucleótidos incluyen sondas, cebadores, nucleótidos y derivados de nucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido y ribozimas), que hibridan de manera específica con el ADN que codifica el polipéptido descrito en la presente memoria o su cadena complementaria. Además, se puede utilizar tal polinucleótido para la preparación de un chip de ADN.

25

Vectores y células hospedadoras

También se describe en la presente memoria un vector y una célula hospedadora en la que se introduce un polinucleótido de la invención. Un vector como se describe en la presente memoria es útil para mantener un polinucleótido, especialmente un ADN, como se describe en la presente memoria en la célula hospedadora, para expresar el polipéptido descrito en la presente memoria, o para administrar el polinucleótido descrito en la presente memoria para la terapia génica.

30 Cuando *E. coli* es la célula hospedadora y el vector se amplifica y se produce en gran cantidad en *E. coli* (p. ej., JM109, DH5 α , HB101 o XL1Blue), el vector debería tener un “ori” para ser amplificado en *E. coli* y un gen marcador para seleccionar las colonias de *E. coli* transformadas (p. ej., un gen de resistencia a fármacos seleccionado mediante un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol o similares). Por ejemplo, se pueden usar los vectores de la serie M13, los vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. Además, también se pueden usar pGEM-T, pDIRECT y pT7 para subclonar y extraer el cADN así como los vectores descritos anteriormente. Cuando se usa un vector para producir la proteína descrita en la presente memoria, es especialmente útil un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión a ser expresado en *E. coli* debería tener las características anteriores para ser amplificado en *E. coli*. Cuando se usa *E. coli*, tal como JM109, DH5 α , HB101 o XL1 Blue, como célula hospedadora, el vector debería tener un promotor, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward *et al.*, Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), promotor araB (Better *et al.*, Science 240: 1041-3 (1988)), promotor T7 o similares, que pueden expresar de manera eficaz el gen deseado en *E. coli*. A este respecto, se puede usar pGEX-5X-1 (Pharmacia), “QIAexpress system” (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el hospedador es preferiblemente BL21 que expresa la ARN polimerasa de T7), por ejemplo, en vez de los vectores anteriores. Además, el vector puede contener también una secuencia señal para la secreción del polipéptido. Una secuencia señal ejemplar que dirige el polipéptido a ser secretado al periplasma de *E. coli* es la secuencia señal pelB (Lei *et al.*, J Bacteriol. 169: 4379 (1987)). Los medios para introducir los vectores en las células hospedadoras seleccionadas como objetivo incluyen, por ejemplo, el método de cloruro cálcico y el método de electroporación.

45 Además de *E. coli*, por ejemplo, se pueden usar vectores de expresión derivados de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen) y pEF-BOS (Mizushinna S y Nagata S., Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insecto (por ejemplo, el “sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC” (GIBCO BRL), pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (p. ej., pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus animales (p. ej., pHSV, pMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (p. ej., pZIpeo), vectores de expresión derivados de levaduras (p. ej., “Pichia Expression Kit” (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (p. ej., pPL608, pKTH50) para producir el polipéptido descrito en la presente memoria.

50 Para expresar el vector en células animales, tales como células CHO, COS o NIH3T3, el vector debería tener un promotor necesario para la expresión en tales células, por ejemplo, el promotor de SV40 (Mulligan *et al.*, Nature 277: 108 (1979)), el promotor de MMLV-LTR, el promotor de EF1 α (Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990)), el promotor de CMV y similares, y preferiblemente un gen marcador para seleccionar los transformantes (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos seleccionado mediante un fármaco (p. ej., neomicina, G418)). Los ejemplos de vectores conocidos con estas características incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

Producción de polipéptidos

Además, se describen en la presente memoria los métodos para la producción de un polipéptido.

5 Los polipéptidos se pueden preparar cultivando una célula hospedadora que alberga un vector de expresión que comprende un gen que codifica el polipéptido. Según las necesidades, se pueden usar métodos para expresar un gen de manera estable y, al mismo tiempo, para amplificar el número de copias del gen en las células. Por ejemplo, se puede introducir un vector que comprende el gen DHFR complementario (p. ej., pCHO I) en células CHO en las que la ruta de síntesis de ácidos nucleicos está delecionada, y después se amplifica mediante metotrexato (MTX). Además, 10 en caso de expresión transitoria de un gen, se puede usar un método en el que un vector que comprende un origen de replicación de SV40 (pcD, etc.) se transforma en células COS que comprenden el gen que expresa el antígeno SV40T en el cromosoma.

15 Un polipéptido como se describe en la presente memoria obtenido como se describió anteriormente se puede aislar del interior o del exterior (tal como del medio) de las células hospedadoras y purificarlo en forma de un polipéptido sustancialmente homogéneo y puro. La expresión “sustancialmente puro”, tal como se usa en la presente memoria con respecto a un polipéptido dado, significa que el polipéptido está sustancialmente exento de otras macromoléculas biológicas. El polipéptido sustancialmente puro es al menos un 75% (p. ej., al menos un 80, 85, 95, o 99%) puro en peso seco. La pureza se puede medir mediante cualquier método habitual adecuado, por ejemplo mediante cromatografía 20 en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis mediante HPLC. El método para el aislamiento y la purificación del polipéptido no se limita a ningún método específico; de hecho, se puede usar cualquier método habitual.

25 Por ejemplo, se puede seleccionar y combinar de manera adecuada para aislar y purificar el polipéptido la cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, precipitación con sales, precipitación del disolvente, extracción del disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque, diálisis y recristalización.

30 Los ejemplos de cromatografía incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía en fase inversa, cromatografía de adsorción, y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Estas cromatografías se pueden llevar a cabo mediante cromatografía líquida, tal como HPLC y FPLC. Así, los métodos para la preparación de polipéptidos sumamente purificados se describieron anteriormente.

35 Un polipéptido descrito en la presente memoria se puede modificar o delecionar parcialmente de manera opcional tratándolo con una enzima de modificación de proteínas adecuada antes o después de la purificación. Las enzimas de modificación de proteínas útiles incluyen tripsina, quimotripsina, lisilendopeptidasa, proteína quinasa, glucosidasa, etc.

40

Anticuerpos

45 También se describe en la presente memoria un anticuerpo que se une al polipéptido de la invención. El anticuerpo descrito en la presente memoria se puede usar en cualquier forma, tal como los anticuerpos monoclonales o policlonales, y también incluye el antisero obtenido inmunizando a un animal tal como un conejo con el polipéptido de la invención, todas las clases de anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados producidos mediante recombinación genética.

50 Un polipéptido descrito en la presente memoria usado como antígeno para obtener un anticuerpo puede derivar de cualquier especie animal, pero preferiblemente deriva de un mamífero tal como un ser humano, ratón, o rata, más preferiblemente de un ser humano. Se puede obtener un polipéptido derivado de un ser humano a partir de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos descritas en la presente memoria.

55 El polipéptido descrito en la presente memoria para ser usado como antígeno de inmunización puede ser una proteína completa o un péptido parcial de la proteína. Un péptido parcial puede comprender, por ejemplo, el fragmento amino (N)-terminal o carboxi (C)-terminal de un polipéptido descrito en la presente memoria.

60 En la presente memoria, un anticuerpo se define como una proteína que reacciona con la longitud completa o un fragmento de un polipéptido descrito en la presente memoria.

65 Se puede insertar un gen que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria o su fragmento en un vector de expresión conocido, que después se usa para transformar la célula hospedadora como se describe en la presente memoria. El polipéptido deseado o sus fragmentos se pueden recuperar del exterior o del interior de las células hospedadoras mediante cualquier método habitual, y se puede usar posteriormente como antígeno. De manera alternativa, se pueden usar células completas que expresan el polipéptido o sus lisados o un polipéptido sintetizado químicamente como antígeno.

ES 2 364 078 T3

Se puede inmunizar cualquier animal mamífero con el antígeno, pero preferiblemente se tiene en cuenta la compatibilidad con las células originarias usadas para la fusión celular. En general, se usan animales de los órdenes Rodentia, Lagomorpha o Primates. Los animales del orden Rodentia incluyen, por ejemplo, ratón, rata y hámster. Los animales del orden Lagomorpha incluyen, por ejemplo, conejos. Los animales del orden Primates incluyen, por ejemplo, un mono del parvorden Catarrhini (mono del viejo mundo) tales como *Macaca fascicularis*, mono rhesus, babuino sagrado y chimpancés.

Los métodos para la inmunización de animales con antígenos se conocen en la técnica. La inyección intraperitoneal o la inyección subcutánea de antígenos es un método habitual para la inmunización de mamíferos. De manera más específica, se pueden diluir y suspender los antígenos en una cantidad adecuada de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, etc. Si se desea, la suspensión de antígeno se puede mezclar con una cantidad adecuada de un adyuvante habitual, tal como adyuvante completo de Freund, emulsionarla y después administrarla a los animales mamíferos. Preferiblemente, esto va seguido por varias administraciones del antígeno mezclado con una cantidad adecuada de adyuvante incompleto de Freund cada 4 a 21 días. También se puede usar un vehículo adecuado para la inmunización. Después de la inmunización como se mencionó anteriormente, se examina el suero mediante un método habitual en busca de un incremento en la cantidad de los anticuerpos deseados.

Se pueden preparar anticuerpos policlonales hacia los polipéptidos descritos en la presente memoria recogiendo sangre del mamífero inmunizado en el que se ha examinado el incremento de los anticuerpos deseados en el suero, y separando el suero de la sangre mediante cualquier método convencional. Los anticuerpos policlonales incluyen el suero que contiene los anticuerpos policlonales, y también se puede aislar la fracción que contiene los anticuerpos policlonales a partir del suero. Se puede preparar inmunoglobulina G o M a partir de una fracción que reconoce solamente el polipéptido descrito en la presente memoria mediante el uso, por ejemplo, de una columna de afinidad que tiene acoplado el polipéptido de la presente invención, y purificando esta fracción mediante el uso de una columna de proteína A o de proteína G.

Para preparar anticuerpos monoclonales, se recogen células inmunitarias del mamífero inmunizado con el antígeno y se comprueba el nivel incrementado de los anticuerpos deseados en el suero tal como se describió anteriormente, y se someten a una fusión celular. Las células inmunitarias usadas para la fusión celular se obtienen preferiblemente del bazo. Otras células originarias preferidas para fusionarse con el inmunocito anterior incluyen, por ejemplo, las células de mieloma de mamíferos, y más preferiblemente las células de mieloma que tienen una propiedad adquirida para la selección mediante fármacos de las células fusionadas.

Los inmunocitos y las células de mieloma anteriores se pueden fusionar según métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein *et al.* (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

Los hibridomas resultantes obtenidos mediante la fusión celular se pueden seleccionar cultivándolos en un medio de selección estándar, tal como medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo celular continúa generalmente en el medio HAT durante varios días a varias semanas, cuyo tiempo es suficiente para permitir que todas las demás células mueran, con la excepción del hibridoma deseado (células sin funcionar). Después, se lleva a cabo una dilución limitante estándar para cribar y clonar una célula de hibridoma que produce el anticuerpo deseado.

Además del método anterior, en el que se inmuniza a un animal no humano con un antígeno para preparar un hibridoma, se pueden inmunizar linfocitos humanos tales como los infectados por el virus EB con un polipéptido, las células que expresan el polipéptido o sus lisados *in vitro*. Después, los linfocitos inmunizados se fusionan con células de mieloma derivadas de humanos que son capaces de dividirse indefinidamente, tales como U266, para producir un hibridoma que produce un anticuerpo humano deseado que es capaz de unirse al polipéptido (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n° (JP-A) Sho 63-17688).

Los hibridomas obtenidos se trasplantan posteriormente a la cavidad abdominal de un ratón y se extrae el líquido ascítico. Los anticuerpos monoclonales obtenidos se pueden purificar, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato amónico, columna de proteína A o de proteína G, cromatografía de intercambio iónico con DEAE o una columna de afinidad a la que está acoplado el polipéptido de la presente invención. El anticuerpo descrito en la presente memoria se puede usar no solamente para la purificación y la detección del polipéptido descrito en la presente memoria, sino también como candidato a agonista y antagonista del polipéptido descrito en la presente memoria. Además, este anticuerpo se puede aplicar al tratamiento con anticuerpos para enfermedades relacionadas con el polipéptido descrito en la presente memoria. Cuando el anticuerpo obtenido se va a administrar al organismo humano (tratamiento con anticuerpos), es preferible un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para reducir la inmunogenicidad.

Por ejemplo, se pueden inmunizar animales transgénicos que tienen un repertorio de genes de anticuerpos humanos con un antígeno seleccionado de un polipéptido, células que expresan el polipéptido o sus lisados. Las células que producen anticuerpos se recogen después de los animales y se fusionan con células de mieloma para obtener un hibridoma, a partir del cual se pueden preparar anticuerpos humanos hacia el polipéptido (véanse los documentos WO92-03918, WO94-02602, WO94-25585, WO96-33735 y WO96-34096).

De manera alternativa, se puede inmortalizar una célula inmunitaria, tal como un linfocito inmunizado, que produce anticuerpos mediante un oncogén y usarlo para preparar anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales así obtenidos también se pueden preparar de manera recombinante mediante el uso de técnicas de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck y Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, se puede clonar un ADN que codifica un anticuerpo a partir de una célula inmunitaria, tal como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertarlo en un vector adecuado, e introducirlo en células hospedadoras para preparar un anticuerpo recombinante. La presente invención también proporciona anticuerpos recombinantes preparados como se describió anteriormente.

Además, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser un fragmento de un anticuerpo o un anticuerpo modificado, con tal de que se una a uno o más de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede ser Fab, F(ab')₂, Fv o un Fv de cadena simple (scFv), en los que los fragmentos Fv de las cadenas H y L están ligados mediante un ligador adecuado (Huston *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83 (1988)). Más específicamente, se puede generar un fragmento de anticuerpo tratando un anticuerpo con una enzima, tal como papaína o pepsina. De manera alternativa, se puede construir un gen que codifica el fragmento de anticuerpo, insertarlo en un vector de expresión y expresarlo en una célula hospedadora adecuada (véase, por ejemplo, Co *et al.*, *J Immunol* 152: 2968-76 (1994); Better y Horwitz, *Methods Enzymol* 178: 476-96 (1989); Pluckthun y Skerra, *Methods Enzymol* 178: 497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121: 652-63 (1986); Rousseaux *et al.*, *Methods Enzymol* 121: 663-9 (1986); Bird y Walker, *Trends Biotechnol* 9: 132-7 (1991)).

Se puede modificar un anticuerpo mediante la conjugación con una diversidad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). Tales anticuerpos modificados se describen también en la presente memoria. El anticuerpo modificado se puede obtener modificando químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en este campo.

De manera alternativa, se puede obtener un anticuerpo como el descrito en la presente memoria en forma de un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada de un anticuerpo humano, o en forma de un anticuerpo humanizado, que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un anticuerpo no humano, la región estructural (FR) y la región constante derivadas de un anticuerpo humano. Tales anticuerpos se pueden preparar según las técnicas conocidas. La humanización se puede llevar a cabo sustituyendo las CDRs o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (véase, p. ej., Verhoeven *et al.*, *Science* 239:1534-6 (1988)). Por lo tanto, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

También se pueden usar anticuerpos completamente humanos que comprenden regiones variables humanas además de regiones estructurales y constantes humanas. Tales anticuerpos se pueden producir mediante el uso de diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos *in vitro* implican el uso de bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpos humanos expresados en bacteriófagos (p. ej., Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1992)). De manera similar, se pueden producir anticuerpos humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que los genes endógenos de inmunoglobulinas se han inactivado parcialmente o completamente. Esta aproximación se describe, p. ej., en las patentes de EE.UU. n0s 6.150.584, 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

Los anticuerpos obtenidos como se mencionó anteriormente se pueden purificar hasta su homogeneidad. Por ejemplo, la separación y la purificación del anticuerpo se pueden llevar a cabo según los métodos de separación y de purificación usados para las proteínas en general. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y aislar mediante el uso seleccionado y combinado de manera adecuada de cromatografía en columna, tal como cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, desalación, diálisis, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida e isoelectroenfoque (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero sin limitación. Se puede usar una columna de proteína A y una columna de proteína G como columna de afinidad. Las columnas de proteína A ejemplares a usar incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Farmacia).

La cromatografía ejemplar, con excepción de la cromatografía de afinidad incluye, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía en fase inversa, cromatografía de adsorción y similares (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Los procedimientos cromatográficos se pueden llevar a cabo mediante cromatografía en fase líquida, tal como HPLC y FPLC.

Por ejemplo, se puede usar la medida de la absorbancia, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) y/o inmunofluorescencia para medir la actividad de unión al antígeno del anticuerpo descrito en la presente memoria. En el ELISA, el anticuerpo descrito en la presente memoria se inmoviliza en una placa, se aplica un polipéptido de la invención a la placa, y después se aplica una muestra que contiene un anticuerpo deseado, tal como el sobrenadante del cultivo de las células que producen el anticuerpo o los anticuerpos purificados. Después, se aplica un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario y que está marcado con una enzima, tal como fosfatasa alcalina, y la placa se incuba. A continuación, después de lavar, se añade un sustrato para la enzima, tal como fosfato de *p*-nitrofenilo, a la placa, y se mide la absorbancia para determinar la actividad de unión al antígeno de la muestra. Se puede usar un fragmento del polipéptido, tal como un fragmento C-terminal o N-terminal, como antígeno para determinar la actividad de unión del anticuerpo. Se puede usar BIAcore (Farmacia) para determinar la actividad del anticuerpo descrito en la presente memoria.

ES 2 364 078 T3

Los métodos anteriores posibilitan la detección o la medida del polipéptido de la invención exponiendo el anticuerpo de la invención a una muestra que se supone que contiene el polipéptido de la invención, y detectando o midiendo el complejo inmunitario formado por el anticuerpo y el polipéptido.

5 Debido a que el método de detección o de medida del polipéptido según la invención puede detectar o medir de manera específica un polipéptido, el método puede ser útil en una diversidad de experimentos en los que se usa el polipéptido.

10 *Polinucleótidos antisentido, ARNs pequeños de interferencia y ribozimas*

También se describe en la presente memoria un oligonucleótido antisentido que hibrida con cualquier lugar de la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26. Este oligonucleótido antisentido va dirigido preferiblemente contra al menos alrededor de 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26. Se prefiere aún más el oligonucleótido antisentido anteriormente mencionado que contiene un codón de iniciación en los al menos 15 nucleótidos consecutivos anteriormente mencionados.

También se pueden usar derivados o productos modificados de oligonucleótidos antisentido como oligonucleótidos antisentido. Los ejemplos de tales productos modificados incluyen las modificaciones de fosfonato de alquilo inferior, tales como de tipo fosfonato de metilo o de tipo fosfonato de etilo, modificaciones de fosforotioato y modificaciones de fosforoamidato.

La expresión “oligonucleótidos antisentido”, tal como se usa en la presente memoria, significa no solamente aquellos en los que los nucleótidos que corresponden a los que constituyen una región especificada de un ADN o mRNA son totalmente complementarios, sino también aquellos que tienen un emparejamiento incorrecto de uno o más nucleótidos, con tal de que el ADN o el mRNA y el oligonucleótido antisentido puedan hibridar de manera específica con la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26.

Tales polinucleótidos están incluidos en aquellos que tienen, en la “región de secuencia de al menos alrededor de 15 nucleótidos consecutivos”, una homología de al menos un 70% o más, preferiblemente un 80% o más, más preferiblemente alrededor de un 90% o más, aún más preferiblemente alrededor de un 95% o más. Se puede usar el algoritmo indicado en la presente memoria para determinar la homología. Se pueden usar los algoritmos conocidos en la técnica para determinar la homología. Además, también se pueden usar en la presente memoria derivados o productos modificados de los oligonucleótidos antisentido como oligonucleótidos antisentido. Los ejemplos de tales productos modificados incluyen modificaciones de fosfonato de alquilo inferior tales como de tipo fosfonato de metilo o de tipo fosfonato de etilo, modificaciones de fosforotioato y modificaciones de fosforoamido.

Tales polinucleótidos antisentido son útiles como sondas para el aislamiento o la detección de ADN que codifica el polipéptido de la invención o como un cebador usado para las amplificaciones.

Los derivados de los oligonucleótidos antisentido de la presente invención actúan en las células que producen el polipéptido de la invención uniéndose al ADN o al mRNA que codifica el polipéptido, inhibiendo su transcripción o su traducción, estimulando la degradación del mRNA e inhibiendo la expresión del polipéptido de la invención, por lo que se da como resultado la inhibición de la función del polipéptido.

También se describen en la presente memoria los ARNs pequeños de interferencia (siARN) que comprenden una combinación de un ácido nucleico de cadena con sentido y un ácido nucleico de cadena antisentido de la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26. De manera más específica, tales siARN para la inhibición de la expresión de B7330N incluyen aquellos que seleccionan como objetivo la secuencia nucleotídica de SEQ ID NOS: 18 ó 22.

El término “siARNs” se refiere a una molécula de ARN bicatenaria que impide la traducción de un mRNA seleccionado como objetivo. Se usan técnicas habituales para introducir siARN en las células, que incluyen aquellas en las que se usa ADN como molde para el ARN transcrito. El siARN comprende una secuencia de ácido nucleico con sentido y una secuencia de ácido nucleico antisentido del polinucleótido que codifica la proteína B7330N humana (SEQ ID NO: 24 ó 26). El siARN se construye de manera que un único transcrito (ARN bicatenario) tiene tanto la secuencia con sentido como la secuencia antisentido complementaria del gen seleccionado como objetivo, p. ej., una horquilla.

La unión del siARN a un transcrito que corresponde a B7330N en la célula objetivo da como resultado una reducción de la producción de la proteína en la célula. La longitud del oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, y puede ser tan larga como el transcrito que se da de manera natural. Preferiblemente, el oligonucleótido tiene una longitud menor de alrededor de 75, alrededor de 50, alrededor de 25 nucleótidos. Lo más preferiblemente, el oligonucleótido tiene una longitud de alrededor de 19 a alrededor de 25 nucleótidos. Los ejemplos de oligonucleótidos de siARN de B7330N que inhiben el crecimiento de las células cancerosas incluyen la secuencia objetivo que contiene SEQ ID NOS: 18 ó 22. Además, para incrementar la actividad de inhibición del siARN, se puede añadir el nucleótido “u” al extremo 3’ de la cadena antisentido de la secuencia objetivo. El número de “u”s a añadir es de al menos alrededor de 2, en general alrededor de 2 a alrededor de 10, preferiblemente alrededor de 2 a alrededor de 5. Los “u”s añadidos forman una cadena simple en el extremo 3’ de la cadena antisentido del siARN.

ES 2 364 078 T3

Un siARN de B7330N se introduce directamente en las células en una forma que es capaz de unirse a los transcritos de mRNA. En estas realizaciones, las moléculas de siARN descritas en la presente memoria se modifican en general como se describió anteriormente para las moléculas antisentido. También son posibles otras modificaciones, por ejemplo, los siARNs conjugados a colesterol han mostrado propiedades farmacológicas mejoradas (Song *et al.* Nature Med. 9:347-51 (2003)). De manera alternativa, el ADN que codifica el siARN de B7330N está en un vector.

Se producen vectores, por ejemplo, clonando una secuencia objetivo de B7330N en un vector de expresión unido de forma operable a secuencias reguladoras que flanquean la secuencia de B7330N de tal manera que se permite la expresión (mediante la transcripción de la molécula de ADN) de ambas cadenas (Lee, N.S. *et al.*, (2002) Nature Biotechnology 20 : 500-5.). Una molécula de ARN que es antisentido respecto del mRNA de B7330N es transcrita por un primer promotor (p. ej., una secuencia promotora en 3' del ADN clonado) y una molécula de ARN que es la cadena con sentido para el mRNA de B7330N es transcrita por un segundo promotor (p. ej., una secuencia promotora en 5' del ADN clonado). Las cadenas con sentido y antisentido hibridan *in vivo* para generar construcciones de siARN para silenciar el gen B7330N. De manera alternativa, se utilizan dos construcciones para crear las cadenas con sentido y antisentido de una construcción de siARN. La B7330N clonada puede codificar una construcción que tiene una estructura secundaria, p. ej., horquillas, en la que un único transcrito tiene tanto la secuencia con sentido como la secuencia antisentido complementaria del gen objetivo.

Además, una secuencia en bucle que consiste en una secuencia nucleotídica arbitraria puede estar localizada entre la secuencia con sentido y la secuencia antisentido para formar la estructura de bucle en horquilla. Así, la presente invención proporciona también siARN que tiene la fórmula general 5'-[A]-[B]-[A']-3', en la que [A] es una secuencia ribonucleotídica que corresponde a una secuencia que hibrida de manera específica a un mRNA o a un cADN de un gen de B7330N. En las realizaciones preferidas, [A] es una secuencia ribonucleotídica que corresponde a una secuencia de los nucleótidos 417-435 de SEQ ID NO: 24 ó 623-641 de SEQ ID NO: 26 (SEQ ID NO: 18) y 1366-1384 de SEQ ID NO: 24 ó 1572-1590 de SEQ ID NO: 26 (SEQ ID NO: 22),

[B] es una secuencia ribonucleotídica que consiste en alrededor de 3 a alrededor de 23 nucleótidos, y [A'] es una secuencia ribonucleotídica que consiste en la secuencia complementaria de [A]. La secuencia del bucle puede consistir en una secuencia arbitraria que tiene preferiblemente una longitud de 3 a 23 nucleótidos. La secuencia del bucle, por ejemplo, se puede seleccionar del grupo que consiste en las siguientes secuencias (http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html). En el siARN descrito en la presente memoria, se puede añadir el nucleótido "u" al extremo 3' de [A'] para aumentar la actividad de inhibición del siARN. El número de "u"s a añadir es de al menos alrededor de 2, en general alrededor de 2 a alrededor de 10, preferiblemente alrededor de 2 a alrededor de 5. Además, una secuencia en bucle que consiste en 23 nucleótidos también proporciona un siARN activo (Jacque, J. M., *et al.*, (2002) Nature 418: 435-8.).

CCC, CCACC o CCACACC: Jacque, J. M., *et al.*, Nature, Vol. 418: 435-8 (2002);

UNCG: Lee, N.S., *et al.*, (2002) Nature Biotechnology 20: 500-5.; Fruscoloni, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(4): 1639-44 (2003); y

UUCAAGAGA: Dykxhoorn, D. M., *et al.*, Nature Reviews Molecular Cell Biology 4: 457-67 (2003).

Por ejemplo, más adelante se muestran los siARNs preferibles descritos en la presente memoria que tienen una estructura de horquilla. En la siguiente estructura, la secuencia del bucle se puede seleccionar del grupo que consiste en CCC, UUCG, CCACC, CCACACC, y UUCAAGAGA. La secuencia del bucle preferible es UUCAAGAGA ("ttcaagaga" en el ADN).

gcacuguuucaaugccuuu-[B]-aaaggcauugaaacagugc (para la secuencia objetivo de SEQ ID NO: 18)

gagaaauccuucggugaca-[B]-ugucaccgaaggauuucuc (para la secuencia objetivo de SEQ ID NO: 22)

Las secuencias reguladoras que flanquean la secuencia de B7330N son idénticas o son diferentes, de forma que su expresión se puede modular de manera independiente, o de una manera temporal o espacial. Los siARNs se transcriben de manera intracelular clonando los moldes del gen B7330N en un vector que contiene, p. ej., una unidad de transcripción de la ARN polimerasa III del ARN nuclear pequeño (snRNA) U6 o del promotor de H1 RNA humano. Para la introducción del vector en la célula, se puede usar un agente potenciador de la transfección. FuGENE (Roche diagnostics), Lipofectamine 2000 (Invitrogen), Oligofectamine (Invitrogen), y Nucleo-efector (Wako pure Chemical) son útiles como agentes potenciadores de la transfección.

La secuencia nucleotídica de los siARNs se puede diseñar mediante el uso de un programa informático de diseño de siARN disponible en la página de internet de Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html). Las secuencias nucleotídicas para el siARN se seleccionan mediante el programa informático basado en el siguiente protocolo:

Selección de los Sitios Objetivo del siARN:

1. Comenzando con el codón de inicio AUG del transcrito en cuestión, se barre en dirección 3' en busca de secuencias de dinucleótidos AA. Se registra la existencia de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes en 3' como sitios objetivo potenciales del siARN. Tuschl, *et al.* Genes Dev 13(24): 3191-7 (1999), no recomienda diseñar siARN hacia las regiones sin traducir de 5' y 3' (UTRs) y hacia las regiones cercanas al codón de inicio (en 75 bases), ya que éstas pueden ser más ricas en sitios de unión para proteínas reguladoras. Las proteínas de unión a las UTR y/o los complejos de iniciación de la traducción pueden interferir con la unión del complejo siARN-endonucleasa.
2. Se comparan los sitios objetivo potenciales con la base de datos del genoma humano y se deja de considerar cualquier secuencia objetivo con una homología significativa a otras secuencias codificantes. La búsqueda de homología se puede llevar a cabo mediante el uso de BLAST (Altschul SF, *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997; 25(17):3389-402.; J Mol Biol. 1990; 215(3):403-10.), que se puede hallar en el servidor del NCBI en: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.
3. Se seleccionan las secuencias objetivo clasificadas para la síntesis. En Ambion, se pueden seleccionar preferiblemente varias secuencias objetivo a lo largo de la longitud del gen para su estudio.

Se ensayaron oligonucleótidos y oligonucleótidos complementarios a diversas porciones del mRNA de B7330N *in vitro* en función de su capacidad de disminuir la producción de B7330N en las células tumorales (p. ej., mediante el uso de las líneas celulares de cáncer de mama HBL-100, HCC1937, MCF-7, MDA-MB-435s, YMB1, SKBR3, T47D, BT-20, BT-474, BT-549, HCC1143, HCC1500, HCC1599, MDA-MB-157, MDA-MB453, OUCB-F, ZR-75-1) según métodos habituales. Se detecta una reducción del producto del gen B7330N en las células que se ponen en contacto con la composición de siARN candidata en comparación con las células cultivadas en ausencia de la composición candidata, mediante el uso de anticuerpos específicos hacia B7330N o de otras estrategias de detección. Las secuencias que disminuyen la producción de B7330N en ensayos basados en células o sin células *in vitro* se ensayan después en función de su efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. Las secuencias que inhiben el crecimiento celular en un ensayo basado en células *in vitro* se ensayan *in vivo* en ratas o ratones para confirmar la producción disminuida de B7330N y el crecimiento de células tumorales disminuido en animales con neoplasias malignas.

También se incluyen en la presente memoria las moléculas bicatenarias que incluyen la secuencia de ácidos nucleicos de secuencias objetivo, por ejemplo, los nucleótidos 417-435 de SEQ ID NO: 24 ó 623-641 de SEQ ID NO: 26 (SEQ ID NO: 18) y 1366-1384 de SEQ ID NO: 24 ó 1572-1590 de SEQ ID NO: 26 (SEQ ID NO: 22). La molécula bicatenaria descrita en la presente memoria comprende una cadena con sentido y una cadena antisentido, en la que la cadena con sentido comprende una secuencia ribonucleotídica que corresponde a SEQ ID NOS: 18, ó 22 y en la que la cadena antisentido comprende una secuencia ribonucleotídica que es complementaria respecto de dicha cadena con sentido, en la que dicha cadena con sentido y dicha cadena antisentido hibridan entre sí para formar dicha molécula bicatenaria, y en la que dicha molécula bicatenaria, cuando se introduce en una célula que expresa el gen B7330N, inhibe la expresión de dicho gen. En la presente invención, cuando el ácido nucleico aislado es ARN o derivados del mismo, la base "t" se debería sustituir por "u" en las secuencias nucleotídicas. Tal como se usa en la presente memoria, el término "complementario" se refiere al emparejamiento de bases de Watson-Crick o de Hoogsteen entre las unidades nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico, y el término "unión" significa la interacción física o química entre dos ácidos nucleicos o compuestos, o ácidos nucleicos o compuestos asociados, o las combinaciones de los mismos.

Las secuencias de ácidos nucleicos complementarias hibridan en condiciones adecuadas para formar moléculas dobles estables que contienen pocos emparejamientos incorrectos o ninguno. Además, la cadena con sentido y la cadena antisentido del nucleótido aislado descrito en la presente memoria pueden formar una estructura nucleotídica bicatenaria o de bucle en horquilla mediante la hibridación. En una realización preferida, tales moléculas dobles contienen no más de 1 emparejamiento incorrecto para cada 10 emparejamientos. En especial, cuando las cadenas de la molécula doble son completamente complementarias, tales moléculas dobles no contienen emparejamientos incorrectos. La molécula de ácido nucleico tiene una longitud menor de 4381 nucleótidos (para SEQ ID NO: 24) o 4556 nucleótidos (para SEQ ID NO: 26). Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico tiene una longitud menor de 500, 200, o 75 nucleótidos. También se incluye en la presente memoria un vector que contiene uno o más de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, y una célula que contiene los vectores. Los ácidos nucleicos aislados descritos en la presente memoria son útiles para el siARN contra B7330N o el ADN que codifica el siARN. Cuando los ácidos nucleicos se usan para el siARN o el ADN codificante del mismo, la cadena con sentido es preferiblemente más larga de alrededor de 19 nucleótidos, y más preferiblemente más larga de alrededor de 21 nucleótidos.

El oligonucleótido antisentido o siARN de la invención inhibe la expresión del polipéptido de la invención, y por lo tanto es útil para inhibir la actividad biológica del polipéptido de la invención. Además, los inhibidores de la expresión, que comprenden el oligonucleótido antisentido o siARN de la invención, son útiles ya que pueden inhibir la actividad biológica del polipéptido de la invención. Por lo tanto, una composición que comprende el oligonucleótido antisentido o siARN de la presente invención es útil en el tratamiento del cáncer de mama. Los ejemplos de oligonucleótidos de siARN de B7330N que inhiben la expresión en las células mamíferas incluyen la secuencia objetivo que contiene las SEQ ID NOS: 18 ó 22. Además, para incrementar la actividad de inhibición del siARN, se puede añadir el nucleótido "u" al extremo 3' de la cadena antisentido de la secuencia objetivo. El número de "u"s a añadir es de al menos alrededor

de 2, en general alrededor de 2 a alrededor de 10, preferiblemente alrededor de 2 a alrededor de 5. Los “u”s añadidos forman una cadena simple en el extremo 3’ de la cadena antisentido del siARN.

Además, los inhibidores de la expresión, que comprenden el oligonucleótido antisentido o siARN de la invención, son útiles ya que pueden inhibir la actividad biológica del polipéptido de la invención. Por lo tanto, una composición que comprende el oligonucleótido antisentido o siARN descrito en la presente memoria es útil en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular tal como el cáncer de mama.

Además, se describen en la presente memoria ribozimas que inhiben la expresión del polipéptido B7330N descrito en la presente memoria.

En general, las ribozimas se clasifican en ribozimas grandes y ribozimas pequeñas. Una ribozima grande se conoce como una enzima que escinde el enlace éster fosfato de los ácidos nucleicos. Tras la reacción con la ribozima grande, el sitio que ha reaccionado consiste en un 5’-fosfato y un grupo 3’-hidroxilo. Las ribozimas grandes se clasifican adicionalmente en (1) el grupo I de ARN intrónico que cataliza la transesterificación en el sitio de corte y empalme de 5’ mediante guanosina; (2) el grupo II de ARN intrónico que cataliza el auto-corte y empalme a través de una reacción en dos etapas por medio de una estructura lariat; y (3) el componente de ARN de la ribonucleasa P que escinde el precursor de tARN en el sitio 5’ por medio de hidrólisis. Por otra parte, las ribozimas pequeñas tienen un tamaño menor (alrededor de 40 pb) en comparación con las ribozimas grandes, escinden los ARNs para generar un grupo 5’-hidroxilo y un 2’-3’-fosfato cíclico. Las ribozimas de tipo cabeza de martillo (Koizumi *et al.*, FEBS Lett 228: 225 (1988)) y las ribozimas de tipo horquilla (Buzayan, Nature 323: 349 (1986); Kikuchi y Sasaki, Nucleic Acids Res 19: 6751 (1991)) están incluidas en las ribozimas pequeñas. Los métodos para el diseño y la construcción de ribozimas se conocen en la técnica (véase Koizumi *et al.*, FEBS Lett 228: 228 (1988); Koizumi *et al.*, Nucleic Acids Res. 17: 7059 (1989); Kikuchi y Sasaki, Nucleic Acids Res 19: 6751 (1991)). Así, las ribozimas que inhiben la expresión de los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden construir también basándose en la información de su secuencia (SEQ ID NO: 24 ó 26) y en estos métodos convencionales.

Las ribozimas contra el gen B7330N inhiben la expresión de la proteína B7330N sobreexpresada, y así son útiles para inhibir la actividad biológica de la proteína. Por lo tanto, las ribozimas son útiles en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama.

Diagnóstico del cáncer de mama

Además, se describe en la presente memoria un método para el diagnóstico de una enfermedad proliferativa celular tal como el cáncer de mama mediante el uso del nivel de expresión de los genes descritos en la presente memoria como marcador de diagnóstico. También se describe en la presente memoria un método para la determinación de la predisposición al cáncer de mama en un sujeto determinando el nivel de expresión de los genes de la invención en una muestra biológica procedente de un paciente, tal como una muestra de tejido. Una alteración, p. ej., un incremento en el nivel de expresión de un gen en comparación con un nivel de control normal del gen, indica que el sujeto puede padecer o que corre el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Cuando se usa en la presente memoria en este contexto, la expresión “predisposición al cáncer de mama” abarca un estado de un sujeto que está predispuesto, que tiene tendencia, prevalencia, inclinación o susceptibilidad al cáncer de mama. Además, dicha expresión también abarca el hecho de que un sujeto corra el riesgo de padecer cáncer de mama.

Este método de diagnóstico comprende las etapas de: (a) detectar el nivel de expresión del gen *B7330N* de la presente invención; y (b) relacionar una elevación del nivel de expresión con el cáncer de mama. De forma similar, en el método para la determinación de la predisposición al cáncer de mama se aplican las mismas etapas que se han mencionado anteriormente.

El nivel de expresión del gen *B7330N* en una muestra biológica se puede estimar cuantificando el mARN que corresponde a, o la proteína codificada por, el gen *B7330N*. Los métodos de cuantificación de mARN son conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede estimar el nivel de los mARNs que corresponden al gen *B7330N* mediante transferencia de Northern o RT-PCR. Debido a que las secuencias nucleotídicas de tamaño completo de los genes *B7330N* se muestran en SEQ ID NO: 24 ó 26, cualquier experto en la técnica puede diseñar secuencias nucleotídicas para sondas o cebadores para cuantificar el gen *B7330N*.

Además, se puede analizar el nivel de expresión del gen *B7330N* basándose en la actividad o la cantidad de proteína codificada por el gen. Se muestra un método para la determinación de la cantidad de la proteína B7330N más adelante. Por ejemplo, los métodos mediante inmunoensayos son útiles para la determinación de las proteínas en materiales biológicos. Se puede usar cualquier material biológico como muestra biológica para la determinación de la proteína o de su actividad, con tal de que el gen marcador (gen *B7330N*) se exprese en la muestra de un paciente de cáncer de mama. Por ejemplo, se puede mencionar el epitelio ductal de mama como tal muestra biológica. No obstante, también se pueden analizar los fluidos corporales tales como sangre y orina. Por otra parte, se puede seleccionar un método adecuado para la determinación de la actividad de una proteína codificada por el gen *B7330N* según la actividad de la proteína a analizar.

El nivel de expresión del gen *B7330N* en una muestra biológica se estima y se compara con el de una muestra normal (p. ej., una muestra procedente de un sujeto sano). Cuando tal comparación demuestra que el nivel de expresión del gen objetivo es mayor que en la muestra normal, se considera que el sujeto padece cáncer de mama. El nivel de expresión de un gen *B7330N* en la(s) muestra(s) biológica(s) de un sujeto normal y de un sujeto a diagnosticar se puede terminar al mismo tiempo. De manera alternativa, se pueden determinar los intervalos normales de los niveles de expresión mediante un método estadístico basado en los resultados obtenidos analizando el nivel de expresión del gen en muestras recogidas previamente de un grupo de control. Se compara un resultado obtenido mediante la comparación de la muestra de un sujeto con el intervalo normal; cuando el resultado no se halla dentro del intervalo normal, se considera que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

También se describe en la presente memoria un agente de diagnóstico para diagnosticar una enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer de mama. El agente de diagnóstico descrito en la presente memoria comprende un compuesto que se une a un polinucleótido o a un polipéptido descrito en la presente memoria. Preferiblemente, se puede usar un oligonucleótido que hibrida con el polinucleótido descrito en la presente memoria o un anticuerpo que se une al polipéptido descrito en la presente memoria como tal compuesto. De manera alternativa, se puede usar un aptámero tal como ARN, ADN o aptámeros peptídicos.

El presente método de diagnóstico de cáncer de mama se puede aplicar para determinar la eficacia del tratamiento del cáncer de mama en un sujeto. Según el método, se obtiene una muestra biológica, tal como una población celular a analizar, de un sujeto sometido a tratamiento de cáncer de mama. El método para la determinación se puede llevar a cabo según métodos convencionales de diagnóstico de cáncer de mama.

Si se desea, se obtienen muestras biológicas del sujeto en diversos momentos antes, durante o después del tratamiento. Después se determina el nivel de expresión del gen *B7330N* en la muestra biológica y se compara con un nivel de control procedente, por ejemplo, de una población celular de referencia que incluye células de las que se conoce el estado con respecto al cáncer de mama (es decir, células cancerosas o células no cancerosas). El nivel de control se determina en una muestra biológica que no se ha expuesto al tratamiento.

Si el nivel de control procede de una muestra biológica que no contiene células cancerosas, una similitud entre el nivel de expresión de la muestra biológica procedente del sujeto y el nivel de control indica que el tratamiento es eficaz. Una diferencia entre el nivel de expresión del gen *B7330N* en la muestra biológica procedente del sujeto y el nivel de control indica un resultado clínico o pronóstico menos favorable.

El término “eficaz” se refiere a que el tratamiento conduce a una reducción de la expresión de un gen activado patológicamente (gen *B7330N*) o una disminución del tamaño, la prevalencia o la capacidad de proliferación de las células de cáncer de mama en un sujeto. Cuando un tratamiento se aplica de manera profiláctica, “eficaz” indica que el tratamiento retrasa o previene la aparición del cáncer de mama. La determinación del cáncer de mama se puede realizar mediante el uso de los protocolos clínicos habituales. Además, la eficacia de un tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para el diagnóstico o el tratamiento del cáncer de mama.

Además, el presente método de diagnóstico del cáncer de mama se puede aplicar también para la determinación del pronóstico de un sujeto con cáncer de mama comparando el nivel de expresión del gen *B7330N* en una muestra biológica procedente del paciente; tal como analizando una población celular respecto de un nivel de control. De manera alternativa, el nivel de expresión del gen *B7330N* en una muestra biológica procedente de pacientes se puede medir a lo largo de un espectro de etapas de la enfermedad para determinar el pronóstico del paciente.

Un incremento en el nivel de expresión del gen *B7330N* en comparación con un nivel de control normal indica un pronóstico menos favorable. Una similitud en el nivel de expresión del gen *B7330N* en comparación con el nivel de control normal indica un pronóstico más favorable para el paciente.

Cribado de compuestos

Mediante el uso del gen *B7330N*, las proteínas codificadas por el gen o la región reguladora transcripcional del gen, se pueden cribar compuestos que alteran la expresión del gen o la actividad biológica de un polipéptido codificado por el gen. Tales compuestos se usan como productos farmacéuticos para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama.

Por lo tanto, también se describe un método para cribar en busca de un compuesto para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama mediante el uso del polipéptido descrito en la presente memoria.

Este método de cribado comprende las etapas de: (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido descrito en la presente memoria; (b) detectar la actividad de unión entre el polipéptido descrito en la presente memoria y el compuesto de ensayo; y (c) seleccionar el compuesto que se une al polipéptido descrito en la presente memoria. Todas las realizaciones descritas en la presente memoria con respecto al polipéptido, al polinucleótido, los vectores y/o las células hospedadoras descritas en la presente memoria también están relacionadas con los métodos de cribado descritos en la presente memoria, *mutatis mutandis*, lo cual se aplica a dicho polipéptido, polinucleótido, vectores y/o células hospedadoras.

El polipéptido descrito en la presente memoria a usar para el cribado puede ser un polipéptido recombinante o una proteína derivada de la naturaleza o un péptido parcial de los mismos. El polipéptido descrito en la presente memoria para ser puesto en contacto con un compuesto de ensayo puede ser, por ejemplo, un polipéptido purificado, una proteína soluble, una forma asociada a un vehículo o una proteína de fusión fusionada con otros polipéptidos.

5 Como método de cribado de proteínas, por ejemplo, que se unen al polipéptido de la presente invención mediante el uso del polipéptido de la presente invención, se pueden usar muchos métodos muy conocidos para un experto en la técnica. Tal cribado se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un método de inmunoprecipitación, específicamente, de la siguiente manera. El gen que codifica el polipéptido descrito en la presente memoria se expresa en las células
10 hospedadoras (p. ej., animales), etc., insertando el gen en un vector de expresión para genes exógenos, tales como pSV2neo, pcDNA I, pcDNA3.1, pCAGGS y pCD8. El promotor a usar para la expresión puede ser cualquier promotor que se puede usar habitualmente e incluye, por ejemplo, el promotor temprano de SV40 (Rigby en Williamson (ed.), Genetic Engineering, vol. 3. Academic Press, Londres, 83-141 (1982)), el promotor de EF- α (Kim *et al.*, Gene 91: 217-23 (1990)), el promotor de CAG (Niwa *et al.*, Gene 108: 193 (1991)), el promotor de LTR de RSV (Cullen, Methods
15 in Enzymology 152: 684-704 (1987)), el promotor de SR α (Takebe *et al.*, Mol Cell Biol 8: 466 (1988)), el promotor temprano inmediato de CMV (Seed y Aruffo, Proc Natl Acad Sci USA 84: 3365-9 (1987)), el promotor tardío de SV40 (Gheysen y Fiers, J Mol Appl Genet 1: 385-94 (1982)), el promotor tardío de adenovirus (Kaufman *et al.*, Mol Cell Biol 9: 946 (1989)), el promotor de TK de HSV, etc. La introducción del gen en las células hospedadoras para expresar un gen exógeno se puede llevar a cabo según cualquier método, por ejemplo, el método de electroporación (Chu *et al.*, Nucleic Acids Res 15: 1311-26 (1987)), el método de fosfato cálcico (Chen y Okayama, Mol Cell Biol 7: 2745-52 (1987)), el método de DEAE-dextrano (Lopata *et al.*, Nucleic Acids Res 12: 5707-17 (1984); Sussman y Milman, Mol Cell Biol 4: 1641-3 (1984)), el método de Lipofectina (Derijard B, Cell 76: 1025-37 (1994); Lamb *et al.*, Nature Genetics 5: 22-30 (1993); Rabindran *et al.*, Science 259: 230-4 (1993)), etc. El polipéptido descrito en la presente memoria se puede expresar en forma de una proteína de fusión que comprende un sitio de reconocimiento (epítipo)
25 de un anticuerpo monoclonal introduciendo el epítipo del anticuerpo monoclonal, cuya especificidad se ha revelado, en el extremo N- o C-terminal del polipéptido descrito en la presente memoria. Se puede usar un sistema epítipo-anticuerpo disponible comercialmente (Experimental Medicine 13: 85-90 (1995)). Hay disponibles comercialmente vectores que pueden expresar una proteína de fusión, por ejemplo, con, β -galactosidasa, proteína de unión a maltosa, glutatión S-transferasa, proteína fluorescente verde (GFP), etc., mediante el uso de sus múltiples sitios de clonación.

30 También se informa de una proteína de fusión preparada introduciendo solamente epítipos pequeños que consisten desde varios hasta una docena de aminoácidos, de manera que no se cambia la propiedad del polipéptido descrito en la presente memoria mediante la fusión. Se pueden usar epítipos, tales como polihistidina (marcador de His), agregado de la gripe HA, c-myc humana, FLAG, glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-GP), proteína del gen 10 de T7 (marcador de T7), glicoproteína del virus herpes simplex humano (marcador de HSV), marcador de E (un epítipo en fago monoclonal) y similares, y anticuerpos monoclonales que los reconocen, como sistema epítipo-anticuerpo para el cribado de proteínas que se unen al polipéptido descrito en la presente memoria (Experimental Medicine 13: 85-90 (1995)).

40 En la inmunoprecipitación, se forma un inmunocomplejo añadiendo estos anticuerpos a un lisado celular preparado mediante el uso de un detergente adecuado. El inmunocomplejo consiste en el polipéptido de la presente invención, un polipéptido que comprende la capacidad de unirse con el polipéptido, y un anticuerpo. La inmunoprecipitación se puede llevar a cabo también mediante el uso de anticuerpos hacia el polipéptido de la presente invención, además de usar anticuerpos hacia los epítipos anteriores, y dichos polipéptidos se pueden preparar como se describió anteriormente.

45 Se puede precipitar un inmunocomplejo, por ejemplo, con Sepharose-proteína A o Sepharose-proteína G cuando el anticuerpo es un anticuerpo IgG de ratón. Si el polipéptido de la presente invención se prepara en forma de una proteína de fusión con un epítipo, tal como GST, se puede formar un inmunocomplejo de la misma manera que con el uso del anticuerpo hacia el polipéptido de la presente invención, mediante el uso de una sustancia que se une de manera específica a estos epítipos, tal como glutatión-Sepharose 4B.

La inmunoprecipitación se puede llevar a cabo siguiendo o según, por ejemplo, los métodos de la bibliografía (Harlow y Lane, Antibodies, 511 -52, Cold Spring Harbor Laboratory publications, Nueva York (1988)).

55 Se usa la SDS-PAGE normalmente para el análisis de las proteínas inmunoprecipitadas, y la proteína unida se puede analizar mediante el peso molecular de la proteína con el uso de geles con una concentración adecuada. Debido a que la proteína unida al polipéptido descrito en la presente memoria es difícil de detectar mediante un método de tinción habitual, tal como la tinción de Coomassie o la tinción de plata, la sensibilidad de la detección para la proteína se puede mejorar cultivando las células en un medio de cultivo que contiene un isótopo radiactivo, ³⁵S-metionina o ³⁵S-cisteína,
60 marcando las proteínas en las células, y detectando las proteínas. La proteína objetivo se puede purificar directamente del gel de SDS-poliacrilamida y se puede determinar su secuencia, cuando se ha revelado el peso molecular de la proteína.

65 Como método para cribar proteínas que se unen al polipéptido descrito en la presente memoria mediante el uso del polipéptido, se puede usar, por ejemplo, el análisis de transferencia de West-Western (Skolnik *et al.*, Cell 65: 83-90 (1991)). De manera específica, se puede obtener una proteína que se une al polipéptido descrito en la presente memoria preparando una biblioteca de cADN a partir de células, tejidos, órganos (por ejemplo, tejidos tales como líneas celulares de cáncer de mama y placenta, páncreas, estómago, tráquea, glándula mamaria y médula ósea humanas

normales), o células cultivadas (p. ej., HBC4, HBC5, MCF-7, MDA-MB-231, YMB1, SKBR3, T47D) que se supone que expresan una proteína de unión al polipéptido de la presente invención mediante el uso de un vector de fagos (p. ej., ZAP), expresando la proteína en LB-agarosa, fijando la proteína expresada en un filtro, haciendo reaccionar el polipéptido purificado y marcado descrito en la presente memoria con el filtro anterior, y detectando las placas que expresan las proteínas asociadas al polipéptido descrito en la presente memoria según el marcador. El polipéptido descrito en la presente memoria se puede marcar mediante la utilización de la unión entre biotina y avidina, o utilizando un anticuerpo que se une de manera específica al polipéptido descrito en la presente memoria, o un péptido o polipéptido (por ejemplo, GST) que está fusionado al polipéptido descrito en la presente memoria. También se pueden usar métodos que utilizan radioisótopos o fluorescencia y similares.

De manera alternativa, en otra realización del método de cribado descrito en la presente memoria, se puede usar un sistema de doble híbrido mediante la utilización de células (“MATCHMAKER Two-Hybrid system”, “Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit”, “MATCHMAKER one-Hybrid system” (Clontech); “HybriZAP Two-Hybrid Vector System” (Stratagene); las referencias “Dalton y Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)”, “Fields y Sternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)”).

En el sistema de doble híbrido, el polipéptido descrito en la presente memoria se fusiona a la región de unión de SRF o la región de unión de GAL4 y se expresa en células de levadura. Se prepara una biblioteca de cADN a partir de células que se supone que expresan una proteína de unión al polipéptido de la invención, de manera que la biblioteca, cuando se expresa, está fusionada a la región de activación transcripcional de VP16 o GAL4. La biblioteca de cADN se introduce después en las células de levadura anteriores y el cADN derivado de la biblioteca se aísla a partir de los clones positivos detectados (cuando una proteína que se une al polipéptido de la invención se expresa en las células de levadura, la unión de las dos activa un gen indicador, que hace que los clones positivos sean detectables). Se puede preparar una proteína codificada por el cADN introduciendo el cADN aislado anteriormente en *E. coli* y expresando la proteína.

Como gen indicador, por ejemplo, se puede usar el gen Ade2, gen lacZ, gen CAT, el gen de luciferasa y similares, además del gen HIS3.

También se puede cribar un compuesto que se une al polipéptido descrito en la presente memoria mediante el uso de cromatografía de afinidad. Por ejemplo, el polipéptido de la invención se puede inmovilizar en un vehículo de una columna de afinidad, y se aplica a la columna un compuesto de ensayo que contiene una proteína capaz de unirse al polipéptido de la invención. Un compuesto de ensayo en la presente memoria puede ser, por ejemplo, extractos celulares, lisados celulares, etc. Después de cargar el compuesto de ensayo, la columna se lava, y se pueden preparar los compuestos unidos al polipéptido descrito en la presente memoria.

Cuando el compuesto de ensayo es una proteína, se analiza la secuencia de aminoácidos de la proteína obtenida, se sintetiza un oligo ADN basado en la secuencia, y se criban las bibliotecas de cADN mediante el uso del oligo ADN como sonda para obtener un ADN que codifica la proteína.

Se puede usar un biosensor que utiliza el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales como medio para la detección o la cuantificación del compuesto unido descrito en la presente memoria. Cuando se usa el biosensor, la interacción entre el polipéptido de la invención y un compuesto de ensayo se puede observar en tiempo real como una señal de resonancia de plasmones superficiales, mediante el uso solamente de una cantidad mínima de polipéptido y sin marcaje (por ejemplo, BIAcore, Pharmacia). Por lo tanto, es posible determinar la unión entre el polipéptido de la invención y un compuesto de ensayo mediante el uso de un biosensor tal como BIAcore.

Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de cribado en busca de moléculas que se unen cuando el polipéptido inmovilizado de la presente invención se expone a compuestos químicos sintéticos, o bancos de sustancias naturales o una biblioteca aleatoria de expresión de péptidos en fagos, y los métodos de cribado de alto rendimiento basados en técnicas de química combinatoria (Wrighton *et al.*, Science 273: 458-64 (1996); Verdine, Nature 384: 11-13 (1996), Hogan, Nature 384: 17-9 (1996)) para aislar no solamente proteínas sino también compuestos químicos que se unen a la proteína de la presente invención (lo que incluye los agonistas y antagonistas).

De manera alternativa, un método de cribado en busca de un compuesto para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama mediante el uso del polipéptido descrito en la presente memoria comprende las etapas siguientes:

- (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con el polipéptido descrito en la presente memoria
- (b) detectar la actividad biológica del polipéptido de la etapa (a); y
- (c) seleccionar un compuesto que inhibe la actividad biológica del polipéptido en comparación con la actividad biológica detectada en ausencia del compuesto de ensayo.

Debido a que la proteína B7330N de la presente invención tiene la actividad de estimular la proliferación de las células de cáncer de mama, se puede cribar un compuesto que inhiba esta actividad de esta proteína de la presente invención mediante el uso de esta actividad como índice.

Se puede usar cualquier polipéptido para el cribado, con tal de que comprenda la actividad biológica de la proteína B7330N. Tal actividad biológica incluye la actividad de proliferación celular de la proteína B7330N humana. Por ejemplo, se puede usar una proteína B7330N humana, y se pueden usar también los polipéptidos funcionalmente equivalentes a estas proteínas. Tales polipéptidos pueden ser expresados de manera endógena o exógena por las células.

5 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una glicosilación nueva de la proteína B7330N, que está implicada en la proliferación de las células cancerosas, tal como se detalla más adelante. B7330N desempeña un papel en la regulación autocrina del crecimiento celular por medio de la activación de la transducción de señales para la proliferación celular (Fig. 5a, 5b). En el mutante N476A en el que se sustituyó 476N (asparagina) con A
10 (alanina), no se observó glicosilación (Fig. 3b). La B7330N de tipo natural exógena se secretó en el medio de cultivo, mientras la proteína N476A no se detectó en el medio de cultivo, lo que sugiere que la glicosilación en Asn-476 de la proteína B7330N es necesaria para la secreción (Fig. 3c). Además, las células que expresaban el tipo natural de B7330N crecieron mucho más rápido que las células transfectadas con N476A (Fig. 8b). Por lo tanto, el crecimiento celular del cáncer de mama se puede inhibir mediante la inhibición de la glicosilación de B7330N.

15 Así, también se describe en la presente memoria un método de cribado en busca de un compuesto para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama que module el nivel de glicosilación de B7330N, que comprende las etapas siguientes:

- 20 (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una célula que expresa el polipéptido B7330N o un equivalente funcional del mismo;
- (b) detectar el nivel de glicosilación del polipéptido; y
- 25 (c) seleccionar un compuesto que inhibe el nivel de glicosilación del polipéptido en comparación con el nivel de glicosilación detectado en ausencia del compuesto de ensayo.

30 De manera alternativa, un método de cribado en busca de un compuesto para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama mediante el uso del polipéptido descrito en la presente memoria comprende las etapas siguientes:

- (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con el polipéptido B7330N o un polipéptido parcial que comprende el sitio de glicosilación del polipéptido B7330N, en unas condiciones capaces de posibilitar la glicosilación del polipéptido;
- 35 (b) detectar el nivel de glicosilación del polipéptido; y
- (c) seleccionar un compuesto que inhibe el nivel de glicosilación del polipéptido en comparación con el nivel de glicosilación detectado en ausencia del compuesto de ensayo.
- 40

En un aspecto preferido de los métodos anteriormente mencionados de cribado en busca de un compuesto para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama que comprende, entre otros, la detección del nivel de glicosilación del polipéptido de la presente invención, dicho nivel de glicosilación es el de la asparagina 476 del polipéptido de la presente invención, en particular es el nivel de glicosilación de la asparagina 476 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una porción homóloga de la misma. Como se describió anteriormente, el experto puede determinar fácilmente en un polipéptido de la presente invención la posición que corresponde a la posición 476 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

50 Estos métodos se ponen en práctica poniendo en contacto una célula que expresa el polipéptido B7330N o un equivalente funcional del mismo que tiene un sitio de glicosilación, o el propio polipéptido con uno o más compuestos candidatos, y detectando el nivel de glicosilación del B7330N puesto en contacto o del equivalente funcional del mismo.

55 Así se identifica un compuesto que modula el nivel de glicosilación de B7330N o del equivalente funcional.

La expresión “funcionalmente equivalente” también significa en la presente memoria que la proteína en cuestión tiene el mismo nivel o sustancialmente el mismo nivel de glicosilación que B7330N. En particular, la glicosilación se cataliza en la proteína o en un aminoácido parcial de la proteína que incluye el sitio de glicosilación. Se puede determinar en la presente memoria si una proteína en cuestión tiene la actividad seleccionada como objetivo. Concretamente, se puede detectar el nivel de glicosilación de la proteína B7330N poniendo en contacto un polipéptido con un compuesto de ensayo en condiciones adecuadas para la glicosilación de la proteína.

65 El nivel de glicosilación de un polipéptido B7330N se puede determinar en la presente memoria mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la glicosilación del polipéptido se puede detectar comparando el peso molecular. El peso molecular de una proteína glicosilada es mayor que el tamaño predicho calculado a partir de la secuencia de aminoácidos del polipéptido por la adición de la cadena de glicósido. Además, cuando el peso molecular de la proteína glicosilada se puede reducir mediante un tratamiento con glicosidasa, se confirma que la diferencia del peso molecular

ES 2 364 078 T3

está provocada por la adición de la cadena de glicósido. Los métodos para la estimación del peso molecular de una proteína son muy conocidos.

De manera alternativa, se puede usar un donante radiomarcado de glicosilación para la detección de la adición de una cadena de glicósido al polipéptido. La transferencia del radiomarcador a la proteína B7330N se puede detectar, por ejemplo, mediante electroforesis SDS-PAGE y fluorografía. De manera alternativa, tras la reacción los péptidos B7330N se pueden separar del donante de glicosilación mediante filtración, y la cantidad de radiomarcador retenida en el filtro se cuantifica mediante recuento de centelleo. Se conocen en la técnica otros marcadores adecuados que se pueden unir al donante de glicosilación, tales como los marcadores cromogénicos y fluorescentes, y los métodos para detectar la transferencia de estos marcadores a la proteína B7330N. De manera alternativa, se puede determinar el nivel de glicosilación de B7330N mediante reactivos que reconocen de manera selectiva el nivel glicosilado del polipéptido. Por ejemplo, tras la incubación del polipéptido B7330N y del compuesto candidato, en condiciones que posibilitan la glicosilación del polipéptido, se puede detectar el nivel de glicosilación del polipéptido mediante un método inmunológico. Se puede usar para la detección cualquier técnica inmunológica que utilice un anticuerpo que reconozca un polipéptido glicosilado. Por ejemplo, está disponible comercialmente un anticuerpo hacia un polipéptido glicosilado. Se puede usar un ELISA o una inmunotransferencia con anticuerpos que reconocen un polipéptido glicosilado para la presente invención.

En vez de usar anticuerpos, se puede detectar la proteína glicosilada mediante el uso de reactivos que se unen de manera selectiva a la cadena de glicósido con una afinidad elevada. Tales reactivos se conocen en la técnica o se pueden determinar mediante ensayos de cribado conocidos en la técnica. Por ejemplo, se conocen bien las lectinas como sondas específicas de las cadenas de glicósido. También están disponibles comercialmente los reactivos de lectina conjugados con un marcador detectable, tal como fosfatasa alcalina.

El nivel de glicosilación de un polipéptido en una célula se puede estimar mediante la separación del lisado celular. Por ejemplo, se puede usar un gel de SDS-poliacrilamida como medio de separación del polipéptido. El polipéptido separado en los geles se transfiere a membranas de nitrocelulosa para el análisis mediante inmunotransferencia.

El compuesto aislado mediante este cribado es un candidato para los agonistas o antagonistas del polipéptido descrito en la presente memoria. El término “agonista” se refiere a las moléculas que activan la función del polipéptido de la presente invención uniéndose a él. De forma similar, el término “antagonista” se refiere a las moléculas que inhiben la función del polipéptido descrito en la presente memoria uniéndose a él. Además, un compuesto aislado mediante este cribado es un candidato para los compuestos que inhiben la interacción *in vivo* del polipéptido de la presente invención con otras moléculas (que incluyen los ADNs y las proteínas).

Cuando la actividad biológica a detectar en el presente método es la proliferación celular, se puede detectar, por ejemplo, preparando células que expresan el polipéptido de la presente invención, cultivando las células en presencia de un compuesto de ensayo, y determinando la velocidad de la proliferación celular, midiendo el ciclo celular y similares, así como midiendo la actividad de formación de colonias tal como se describe en los Ejemplos.

Se describen en la presente memoria métodos adicionales para el cribado de compuestos para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama. Tal como se discutió con detalle anteriormente, controlando los niveles de expresión de B7330N se puede controlar el inicio y la progresión del cáncer de mama. Así, los compuestos que se pueden usar en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama se pueden identificar por medio de cribados que usan como índice los niveles de expresión de B7330N. En el contexto descrito en la presente memoria, el cribado puede comprender, por ejemplo, las siguientes etapas:

- a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una célula que expresa B7330N; y
- b) seleccionar un compuesto que reduce el nivel de expresión de B7330N en comparación con el nivel de expresión detectado en ausencia del compuesto de ensayo.

Las células que expresan al menos uno de B7330N incluyen, por ejemplo, las líneas celulares establecidas a partir de cánceres de mama; tales células se pueden usar para el cribado anteriormente mencionado de la presente invención (p. ej., HBC4, HBC5, MCF-7, MDA-MB-231, YMB1, SKBR3, T47D, BT-20, HCC1500 o MDA-MB-453, etc.). El nivel de expresión se puede estimar mediante métodos muy conocidos para un experto en la técnica. En el método de cribado, se puede seleccionar un compuesto que reduce el nivel de expresión de B7330N como agente candidato a ser usado para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama.

De manera alternativa, el método de cribado descrito en la presente memoria puede comprender las etapas siguientes:

- a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una célula en la que se ha introducido un vector que comprende la región reguladora transcripcional de un gen marcador y un gen indicador que se expresa bajo el control de la región reguladora transcripcional, en el que el gen marcador es B7330N,
- b) medir el nivel de expresión o actividad de dicho gen indicador; y

- c) seleccionar un compuesto que reduce el nivel de expresión o actividad de dicho gen indicador en comparación con un nivel de control detectado en ausencia del compuesto de ensayo.

5 Los genes indicadores adecuados y las células hospedadoras se conocen bien en la técnica. La construcción indicadora necesaria para el cribado se puede preparar mediante el uso de la región reguladora transcripcional de un gen marcador. Cuando la región reguladora transcripcional de un gen marcador es conocida para los expertos en la técnica, se puede preparar una construcción indicadora mediante el uso de la información de la secuencia previa. Cuando la
10 región reguladora transcripcional de un gen marcador permanece sin identificar, se puede aislar un segmento nucleotídico que contiene la región reguladora transcripcional a partir de una biblioteca genómica basándose en la información de la secuencia nucleotídica del gen marcador.

Los ejemplos de soportes que se pueden usar para unir proteínas incluyen polisacáridos insolubles, tales como agarosa, celulosa y dextrano; y resinas sintéticas, tales como poliacrilamida, poliestireno y silicona; se pueden usar
15 preferiblemente esferas y placas disponibles comercialmente (p. ej., placas multi-pocillo, chip biosensor, etc.) preparadas a partir de los materiales anteriores. Cuando se usan esferas, se pueden rellenar en una columna.

La unión de una proteína a un soporte se puede llevar a cabo según métodos rutinarios, tales como la unión química y la adsorción física. De manera alternativa, una proteína se puede unir a un soporte por medio de anticuerpos que reconocen específicamente la proteína. Además, la unión de una proteína a un soporte también se puede llevar a cabo
20 por medio de avidina y biotina.

La unión entre proteínas se lleva a cabo en un tampón, por ejemplo, pero sin limitación, tampón fosfato y tampón Tris, con tal de que el tampón no inhiba la unión entre las proteínas.
25

Se puede usar un biosensor que usa el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales como medio para detectar o cuantificar la proteína unida descrita en la presente memoria. Cuando se usa tal biosensor, la interacción entre las proteínas se puede observar en tiempo real como una señal de resonancia de plasmones superficiales, mediante el uso solamente de una cantidad muy pequeña de polipéptido y sin marcaje (por ejemplo, BIAcore, Pharmacia).
30

De manera alternativa, se puede marcar el polipéptido B7330N, y el marcador de la proteína unida se puede usar para detectar o medir la proteína unida. De manera específica, después de pre-marcar una de las proteínas, la proteína marcada se pone en contacto con la otra proteína en presencia de un compuesto de ensayo, y después las proteínas unidas se detectan o se miden según el marcador después de lavar.
35

Se pueden usar sustancias de marcaje tales como radioisótopos (p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I), enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, β -glucosidasa), sustancias fluorescentes (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FTTC), rodamina) y biotina/avidina, para el marcaje de una proteína en el presente método. Cuando la proteína se marca con un radioisótopo, la detección o la medida se puede llevar a cabo mediante centelleo líquido.
40 De manera alternativa, las proteínas marcadas con enzimas se pueden detectar o medir añadiendo un sustrato de la enzima para detectar el cambio enzimático del sustrato, tal como la generación de color, con un colorímetro. Además, en caso de que se use una sustancia fluorescente como marcador, la proteína unida se puede detectar o medir mediante el uso de un fluorímetro.

En caso de usar un anticuerpo en el presente cribado, el anticuerpo se marca preferiblemente con una de las sustancias de marcaje mencionadas anteriormente, y se detecta o se mide basándose en la sustancia marcadora. De manera alternativa, se puede usar el anticuerpo hacia el polipéptido B7330N o actina como anticuerpo primario, a ser detectado con un anticuerpo secundario que está marcado con una sustancia marcadora. Además, el anticuerpo unido a la proteína en el cribado de la presente invención se puede detectar o medir mediante el uso de una columna de proteína G o de proteína A.
50

Se puede usar cualquier compuesto de ensayo, por ejemplo, extractos celulares, sobrenadantes de cultivos celulares, productos de fermentación de microorganismos, extractos de organismos marinos, extractos de plantas, proteínas purificadas o en bruto, péptidos, compuestos no peptídicos, compuestos micromoleculares sintéticos y compuestos naturales, en los métodos de cribado de la presente invención. El compuesto de ensayo descrito en la presente memoria se puede obtener también mediante el uso de cualquiera de las numerosas aproximaciones de métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen (1) bibliotecas biológicas, (2) bibliotecas en fase sólida o fase de disolución paralelas direccionables espacialmente, (3) métodos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución, (4) el método de biblioteca de "una-esfera-un-compuesto" y (5) métodos de bibliotecas sintéticas que usan una selección mediante cromatografía de afinidad. Los métodos de bibliotecas biológicas que usan la selección mediante cromatografía de afinidad se limita a las bibliotecas peptídicas, mientras las otras cuatro aproximaciones son aplicables a bibliotecas de compuestos peptídicos, oligómeros no peptídicos o de moléculas pequeñas (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145). Los ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden hallar en la técnica (DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261: 1303; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233). Las bibliotecas de compuestos se pueden presentar en disolución (véase Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13: 412) o en esferas (Lam (1991) *Nature* 354: 82), chips (Fodor (1993) *Nature* 364: 555), bacterias
55
60
65

(pat. de EE.UU. no 5.223.409), esporas (pat. de EE.UU. no 5.571.698;5.403.484, y 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865) o fagos (Scott y Smith (1990) Science 249: 386; Devlin (1990) Science 249: 404; Cwirla *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222: 301; solicitud de pat. de EE.UU. 2002103360).

Un compuesto aislado mediante los métodos de cribado descritos en la presente memoria es un candidato para los fármacos que inhiben la actividad del polipéptido descrito en la presente memoria, para el uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades atribuidas, por ejemplo, a enfermedades proliferativas celulares, tales como el cáncer de mama. Un compuesto en el que una parte de la estructura del compuesto obtenido mediante los presentes métodos de cribado descritos en la presente memoria se convierte mediante adición, delección y/o sustitución, está incluido en los compuestos obtenidos mediante los métodos de cribado descritos en la presente memoria.

Composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama

También se describen composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, que comprenden cualquiera de los compuestos seleccionados mediante los métodos de cribado descritos anteriormente.

Quando se administra un compuesto aislado mediante los métodos de cribado descritos en la presente memoria en forma de una composición farmacéutica para seres humanos u otros mamíferos, tales como ratones, ratas, conejillos de indias, conejos, gatos, perros, ovejas, cerdos, ganado bovino, monos, babuinos, chimpancés, para el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular (p. ej., cáncer de mama), el compuesto aislado se puede administrar directamente o se puede formular en una forma farmacéutica mediante el uso de métodos de preparación conocidos de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, según sea necesario, los fármacos se pueden tomar oralmente, en forma de comprimidos revestidos con carbohidratos, cápsulas, elixires y microcápsulas; o de manera no oral, en forma de inyecciones de soluciones o suspensiones estériles con agua o cualquier otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los compuestos se pueden mezclar con vehículos o medios farmacológicamente aceptables, específicamente agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionantes, agentes de suspensión, tensoactivos, estabilizantes, agentes aromatizantes, excipientes, vehículos, conservantes, aglutinantes y similares, en una forma de dosis unitaria necesaria para la aplicación de fármacos aceptada en general. La cantidad de ingredientes activos en estas preparaciones constituye una dosis adecuada dentro del intervalo indicado obtenido.

Los ejemplos de aditivos que se pueden mezclar para producir comprimidos y cápsulas son los aglutinantes tales como gelatina, almidón de maíz, goma de tragacanto y goma arábiga; excipientes tales como celulosa cristalina; agentes dilatadores tales como almidón de maíz, gelatina y ácido algínico; lubricantes tales como estearato magnésico; edulcorantes tales como sacarosa, lactosa o sacarina; agentes aromatizantes tales como menta, aceite de *Gaultheria adenothrix* y cereza. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, también se puede incluir un vehículo líquido, tal como un aceite, en los ingredientes anteriores. Los compuestos estériles para inyecciones se pueden formular siguiendo las aplicaciones con fármacos normales mediante el uso de vehículos tales como agua destilada usada para las inyecciones.

Se puede usar solución salina fisiológica, glucosa y otros líquidos isotónicos que incluyen adyuvantes, tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico, como soluciones acuosas para las inyecciones. Estos se pueden usar junto con solubilizantes adecuados, tales como alcohol, específicamente etanol, polialcoholes tales como propileno glicol y polietileno glicol, tensoactivos no iónicos, tales como Polisorbato 80 (TM) y HCO-50.

Se puede usar aceite de sésamo o aceite de soja como líquido oleaginoso, y se puede usar junto con benzoato de bencilo o alcohol bencilico como solubilizantes, y se puede formular con un tampón, tal como tampón de fosfato y tampón de acetato sódico; un analgésico, tal como hidrocloreuro de procaína; un estabilizante, tal como alcohol bencilico, fenol; y un antioxidante. La inyección preparada se puede rellenar en una ampolla adecuada.

Se pueden usar métodos muy conocidos para un experto en la técnica para administrar el compuesto farmacéutico inventivo a los pacientes, por ejemplo en forma de inyecciones intraarteriales, intravenosas, percutáneas y también en forma de administraciones intranasales, intramusculares u orales. La dosis y el método de administración varían según el peso corporal y la edad del paciente, y según el método de administración; no obstante, un experto en la técnica puede seleccionarlos de manera rutinaria. Si dicho compuesto es codificable mediante un ADN, se puede insertar el ADN en un vector para terapia génica, y se administra el vector para llevar a cabo la terapia. La dosis y el método de administración varían según el peso corporal, la edad, y los síntomas del paciente, pero un experto en la técnica puede seleccionarlos de manera rutinaria.

Por ejemplo, aunque existen algunas diferencias dependiendo de los síntomas, la dosis de un compuesto que se une al polipéptido de la presente invención y que regula su actividad es de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 100 mg por día, preferiblemente alrededor de 1,0 mg a alrededor de 50 mg por día, y más preferiblemente alrededor de 1,0 mg a alrededor de 20 mg por día, al administrarlo de manera oral a un adulto normal (60 kg de peso).

Quando se administra de manera parenteral, en forma de una inyección a un adulto normal (60 kg de peso), aunque existen algunas diferencias dependiendo del paciente, el órgano seleccionado como objetivo, los síntomas y el método

de administración, es conveniente inyectar de manera intravenosa una dosis de alrededor de 0,01 mg a alrededor de 30 mg por día, preferiblemente alrededor de 0,1 a alrededor de 20 mg por día, y más preferiblemente alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mg por día. Además, en el caso de otros animales, también es posible administrar una cantidad convertida respecto de 60 kg de peso corporal.

Además, se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama que comprenden ingredientes activos que inhiben la expresión del gen *B7330N*. Tales ingredientes activos incluyen los polinucleótidos antisentido, siARNs o ribozimas hacia el gen *B7330N* o los derivados, tales como los vectores de expresión, de los polinucleótidos antisentido, siARNs o ribozimas.

Estos ingredientes activos se pueden incorporar en una preparación externa, tal como un linimento o un emplasto, mezclándolos con un material base adecuado que es inactivo respecto de los derivados. Además, según sea necesario, se pueden formular en comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, cápsulas de liposomas, inyecciones, disoluciones, gotas nasales y agentes liofilizados mediante la adición de excipientes, agentes isotónicos, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, analgésicos y similares. Estos se pueden preparar según los métodos convencionales.

El ingrediente activo se proporciona al paciente aplicándolo directamente en el sitio enfermo o inyectándolo en un vaso sanguíneo de manera que alcance el sitio enfermo. También se puede usar un medio de montaje para incrementar la duración y la permeabilidad a las membranas. Los ejemplos de medios de montaje incluyen los liposomas, poli-L-lisina, lípidos, colesterol, lipofectina o los derivados de los mismos.

Las dosis de tales composiciones de la presente invención se pueden ajustar de manera adecuada según el estado del paciente, y se pueden usar en las cantidades deseadas. Por ejemplo, se puede administrar un intervalo de dosis de 0,1 a 100 mg/kg, preferiblemente 0,1 a 50 mg/kg.

También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama que comprende un anticuerpo hacia un polipéptido codificado por el gen *B7330N* o fragmentos del anticuerpo que se unen al polipéptido.

Aunque existen algunas diferencias dependiendo de los síntomas, la dosis de un anticuerpo o de los fragmentos del mismo para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama es de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 100 mg por día, preferiblemente alrededor de 1,0 mg a alrededor de 50 mg por día, y más preferiblemente alrededor de 1,0 mg a alrededor de 20 mg por día, cuando se administra de manera oral a un adulto normal (60 kg de peso).

Cuando se administra de manera parenteral, en forma de una inyección a un adulto normal (60 kg de peso), aunque existen algunas diferencias dependiendo del estado del paciente, los síntomas de la enfermedad y el método de administración, es conveniente inyectar de manera intravenosa una dosis de alrededor de 0,01 mg a alrededor de 30 mg por día, preferiblemente alrededor de 0,1 a alrededor de 20 mg por día, y más preferiblemente alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mg por día. Además, en el caso de otros animales, también es posible administrar una cantidad convertida respecto de 60 kg de peso corporal.

Métodos para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama

También se describen en la presente memoria los compuestos terapéuticos para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama en un sujeto. Los compuestos terapéuticos se administran de manera profiláctica o terapéutica a un sujeto que padece o que corre el riesgo de (o que es susceptible a) desarrollar cáncer de mama. Tales sujetos se identifican mediante el uso de métodos clínicos habituales o detectando un nivel de expresión o actividad anormal de *B7330N*. La administración profiláctica se da antes de la aparición de síntomas clínicos manifiestos de la enfermedad, de forma que se previene o, de manera alternativa, se retrasa la progresión de una enfermedad o trastorno.

El método terapéutico incluye la disminución de la expresión o la función del gen *B7330N*. En estos métodos, el sujeto se trata con una cantidad eficaz de un compuesto, que disminuye el gen sobreexpresado (gen *B7330N*) en el sujeto. La administración puede ser sistémica o local. Los compuestos terapéuticos incluyen los compuestos que disminuyen el nivel de expresión de tal gen que existe de manera endógena en las células cancerosas de mama (es decir, los compuestos que inhiben la expresión del gen sobreexpresado). La administración de tales compuestos terapéuticos contrarresta el efecto del gen anormalmente sobreexpresado en las células del sujeto, y se supone que mejora el estado clínico del sujeto. Tales compuestos se pueden obtener mediante el método de cribado descrito anteriormente.

La expresión del gen *B7330N* se puede inhibir también de cualquiera de varias maneras conocidas en la técnica, que incluyen la administración al sujeto de un ácido nucleico que inhibe o antagoniza la expresión del gen. Se pueden usar oligonucleótidos antisentido, siARN o ribozimas que interrumpen la expresión del gen para inhibir la expresión del gen. Los oligonucleótidos antisentido, siARN o ribozimas que se pueden usar para inhibir la expresión del gen *B7330N* se describieron anteriormente en la presente memoria.

Como se indicó anteriormente, se pueden usar oligonucleótidos antisentido que corresponden a la secuencia nucleotídica del gen *B7330N* para reducir el nivel de expresión del gen *B7330N*. De manera específica, los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente memoria pueden actuar uniéndose a cualquiera de los polipéptidos codificados

ES 2 364 078 T3

por el gen *B7330N*, o a los mARNs correspondientes, por lo que inhiben la transcripción o la traducción del gen, favorecen la degradación de los mARNs, y/o inhiben la expresión de las proteínas codificadas por el gen, y finalmente inhiben la función de las proteínas *B7330N*.

5 Los oligonucleótidos antisentido y los derivados de los mismos se pueden incorporar en una preparación externa, tal como un linimento o un emplasto, mezclándolos con un material base adecuado que es inactivo respecto del derivado, y usarlos en el método para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama descrito en la presente memoria.

10 Los ácidos nucleicos que inhiben un producto génico del gen sobreexpresado también incluyen los ARNs pequeños de interferencia (siARN), que comprenden una combinación de una cadena con sentido de ácido nucleico y una cadena antisentido de ácido nucleico de la secuencia nucleotídica codificada por el gen *B7330N*. Se pueden usar técnicas habituales de introducción de siARN en células en el tratamiento o la prevención de la presente invención, lo que incluye aquellas en las que el ADN es un molde a partir del cual se transcribe el ARN. El siARN se construye de manera que un único transcrito tiene tanto las secuencias con sentido como las secuencias antisentido complementarias del gen seleccionado como objetivo, por ejemplo, una horquilla, para inhibir la expresión del gen en una célula con una expresión activada del gen *B7330N*. La unión del siARN al transcrito del gen *B7330N* en la célula seleccionada como objetivo da como resultado una reducción de la producción de la proteína *B7330N* en la célula.

20 Los ácidos nucleicos que inhiben un producto génico del gen sobreexpresado incluyen también las ribozimas hacia el gen sobreexpresado (gen *B7330N*).

Además, se describe en la presente memoria un anticuerpo hacia el polipéptido descrito en la presente memoria para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad proliferativa celular, tal como el cáncer de mama, en el que se administra una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo hacia el polipéptido descrito en la presente memoria. Debido a que la expresión de la proteína *B7330N* está activada en las células de cáncer de mama y la inhibición de la expresión de estas proteínas conduce a una disminución de la actividad de proliferación celular, se espera que las enfermedades proliferativas celulares se puedan tratar o prevenir mediante la unión del anticuerpo a estas proteínas.

30 Así, se administra un anticuerpo hacia el polipéptido descrito en la presente memoria a una dosis suficiente para reducir la actividad de la proteína descrita en la presente memoria que está en el intervalo de 0,1 a alrededor de 250 mg/kg por día. El intervalo de dosis para seres humanos adultos es generalmente de alrededor de 5 mg a alrededor de 17,5 g/día, preferiblemente de alrededor de 5 mg a alrededor de 10 g/día, y lo más preferiblemente de alrededor de 100 mg a alrededor de 3 g/día.

40 De manera alternativa, se puede usar un anticuerpo que se une a un marcador de la superficie celular específico de las células tumorales como herramienta para la administración de fármacos. Por ejemplo, se administra el anticuerpo conjugado a un agente citotóxico a una dosis suficiente para lesionar las células tumorales.

Otro aspecto descrito en la presente memoria comprende el agente que inhibe la glicosilación de la asparagina 476 de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido descrito en la presente memoria, en particular la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de SEQ ID NO: 25 para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama. También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende la proteína *B7330N* o un fragmento inmunológicamente activo de la misma, o un polinucleótido que codifica la proteína o un fragmento de la misma para el uso en la inducción de inmunidad antitumoral. La proteína *B7330N* o los fragmentos inmunológicamente activos de la misma son útiles como vacunas contra enfermedades proliferativas celulares tales como el cáncer de mama. En algunos casos, las proteínas o los fragmentos de las mismas se pueden administrar en una forma asociada al receptor de células T (TCR) o se pueden presentar mediante una célula presentadora de antígenos (APC), tal como macrófagos, células dendríticas (DC), o células B. Debido a la intensa capacidad de presentación de antígenos de las DC, es más preferible el uso de DC entre las APCs.

50 La vacuna contra una enfermedad proliferativa celular descrita en la presente memoria se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir una actividad antitumoral tras la inoculación en animales. En general, la inmunidad antitumoral incluye respuestas inmunitarias tales como las siguientes:

- inducción de linfocitos citotóxicos contra tumores,
- inducción de anticuerpos que reconocen tumores, y
- inducción de la producción de citocinas antitumorales.

60 Por lo tanto, cuando cierta proteína induce cualquiera de estas respuestas inmunitarias tras la inoculación en un animal, se decide que la proteína tiene un efecto inductor de inmunidad antitumoral. La inducción de la inmunidad antitumoral mediante una proteína se puede detectar observando *in vivo* o *in vitro* la respuesta del sistema inmunitario en el hospedador contra la proteína.

ES 2 364 078 T3

Por ejemplo, se conoce bien un método para la detección de la inducción de linfocitos T citotóxicos. Una sustancia exógena que entra en un organismo vivo se presenta a las células T y a las células B mediante la acción de las células presentadoras de antígenos (APCs). Las células T que responden al antígeno presentado por las APC de una manera específica del antígeno se diferencian en células T citotóxicas (o linfocitos T citotóxicos; CTLs) debido a la estimulación por el antígeno, y después proliferan (esto se denomina activación de las células T). Por lo tanto, la inducción de los CTL mediante un péptido dado se puede estudiar presentando el péptido a las células T mediante APC, y detectando la inducción de CTL. Además, las APC tienen el efecto de activar las células T CD4+, células T CD8+, macrófagos, eosinófilos, y células NK. Debido a que las células T CD4+ y las células T CD8+ son importantes también en la inmunogenicidad antitumoral, la acción de inducción de la inmunidad antitumoral del péptido se puede estudiar mediante el uso del efecto de activación de estas células como indicador.

Se conoce bien en la técnica un método para el estudio de la acción de inducción de CTL mediante el uso de células dendríticas (DCs) como APC. DC es una APC representativa que tiene la acción de inducción de CTL más intensa entre las APCs. En este método, el polipéptido de ensayo se pone en contacto inicialmente con DC, y después estas DC se ponen en contacto con las células T. La detección de las células T que tienen efectos citotóxicos contra las células de interés tras el contacto con DC demuestra que el polipéptido de ensayo tiene una actividad de inducción de las células T citotóxicas. La actividad de CTL contra los tumores se puede detectar, por ejemplo, mediante el uso de la lisis de células tumorales marcadas con ⁵¹Cr como indicador. De manera alternativa, también se conoce bien el método de determinación del grado de daño en las células tumorales mediante el uso de la actividad de captación de ³H-timidina o de liberación de LDH (lactosa deshidrogenasa) como indicador.

Aparte de las DC, también se pueden usar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) como APC. Se ha informado de que la inducción de los CTL se puede incrementar cultivando PBMC en presencia de GM-CSF e IL-4. De manera similar, se ha demostrado que los CTL se inducen cultivando PBMC en presencia de hemocianina de lapa californiana (KLH) e IL-7.

Los polipéptidos de ensayo que se confirma que poseen actividad de inducción de CTL mediante estos métodos son polipéptidos que tienen un efecto de activación de DC y una actividad inductora de CTL posterior. Por lo tanto, los polipéptidos que inducen CTL contra las células tumorales son útiles como vacunas contra los tumores. Además, las APC que adquieren la capacidad de inducir CTL contra los tumores al entrar en contacto con los polipéptidos son útiles como vacunas contra los tumores. Además, los CTL que adquieren citotoxicidad debido a la presentación de los antígenos polipeptídicos por las APC también se pueden usar como vacunas contra los tumores. Tales métodos terapéuticos para tumores mediante el uso de la inmunidad antitumoral debida a APC y CTL se denomina inmunoterapia celular.

En general, cuando se usa un polipéptido para la inmunoterapia celular, se sabe que la eficacia de la inducción de CTL se incrementa combinando una diversidad de polipéptidos que tienen estructuras diferentes y poniéndolos en contacto con DC. Por lo tanto, cuando se estimulan DC con fragmentos de proteínas, es ventajoso usar una mezcla de múltiples tipos de fragmentos.

De manera alternativa, la inducción de la inmunidad antitumoral mediante un polipéptido se puede confirmar observando la inducción de la producción de anticuerpos hacia los tumores. Por ejemplo, cuando se inducen anticuerpos hacia un polipéptido en un animal de laboratorio inmunizado con el polipéptido y cuando se inhibe el crecimiento de las células tumorales mediante estos anticuerpos, se puede determinar que el polipéptido tiene la capacidad de inducir inmunidad antitumoral.

La inmunidad antitumoral se induce mediante la administración de la vacuna de esta invención, y la inducción de la inmunidad antitumoral posibilita el tratamiento y la prevención de enfermedades proliferativas celulares, tales como el cáncer de mama. La terapia contra el cáncer o la prevención del inicio del cáncer incluye cualquier etapa, tal como la inhibición del crecimiento de las células cancerosas, la involución del cáncer y la eliminación de la aparición del cáncer. También están incluidos como efecto de la terapia o la prevención del cáncer la disminución de la mortalidad de los individuos que tienen cáncer, la disminución de los marcadores tumorales en la sangre, el alivio de los síntomas detectables asociados al cáncer y similares. Tales efectos terapéuticos y preventivos son preferiblemente significativos estadísticamente. Por ejemplo, en observación, a un nivel de significación del 5% o menos, en el que el efecto terapéutico o preventivo de una vacuna contra una enfermedad proliferativa celular se compara con un control sin administración de la vacuna. Por ejemplo, se puede usar la prueba t de Student, la prueba U de Mann-Whitney o ANOVA para el análisis estadístico.

La proteína anteriormente mencionada que tiene actividad inmunológica o un vector que codifica la proteína se pueden combinar con un adyuvante. Un adyuvante se refiere a un compuesto que aumenta la respuesta inmunitaria contra la proteína cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Los ejemplos de adyuvantes incluyen la toxina del cólera, la toxina de salmonella, alumbre y similares, pero no se limitan a estos. Además, la vacuna de esta invención se puede combinar de manera apropiada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales vehículos son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón de fosfato, líquido de cultivo y similares. Además, la vacuna puede contener, según sea necesario, estabilizantes, agentes de suspensión, conservantes, tensoactivos y similares. La vacuna se administra de manera sistémica o local. La administración de la vacuna se puede llevar a cabo mediante una única administración o se puede reforzar mediante administraciones múltiples.

Cuando se usan APC o CTL como la vacuna descrita en la presente memoria, los tumores se pueden tratar o prevenir, por ejemplo, mediante el método *ex vivo*. Más específicamente, se recogen PBMCs de un sujeto que recibe tratamiento o terapia preventiva, las células se ponen en contacto con el polipéptido *ex vivo*, y tras la inducción de APC o CTL, las células se pueden administrar al sujeto. También se pueden inducir las APC introduciendo un vector que codifica el polipéptido en PBMCs *ex vivo*. Las APC o CTL inducidas *in vitro* se pueden clonar antes de la administración. Mediante la clonación y el cultivo de las células que tienen una actividad elevada para dañar las células seleccionadas como objetivo, se puede llevar a cabo la inmunoterapia celular de una manera más eficaz. Además, las APC y CTL aisladas de esta manera se pueden usar para la inmunoterapia celular no solamente en los individuos de los que procedían las células, sino también contra tipos similares de tumores de otros individuos.

Además, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer de mama, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido B7330N. La composición farmacéutica se puede usar para generar inmunidad antitumoral. La expresión normal de B7330N se limita a la placenta, páncreas, estómago, traquea, glándula mamaria y médula ósea. Por lo tanto, la inhibición de este gen no puede afectar de manera adversa a otros órganos. Así, los polipéptidos B7330N son preferibles para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas celulares, especialmente el cáncer de mama. Además, debido a que se reveló que los fragmentos peptídicos de las proteínas expresadas específicamente en las células cancerosas inducen una respuesta inmunitaria contra el cáncer, también se pueden usar los fragmentos peptídicos de B7330N en una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades proliferativas celulares tales como el cáncer de mama. El polipéptido o el fragmento del mismo descrito en la presente memoria se administra a una dosis suficiente para inducir inmunidad antitumoral, que está en el intervalo de 0,1 mg a 10 mg, preferiblemente 0,3 mg a 5 mg, más preferiblemente 0,8 mg a 1,5 mg. Las administraciones se repiten. Por ejemplo, se puede administrar 1 mg del péptido o del fragmento del mismo 4 veces cada dos semanas para inducir la inmunidad antitumoral.

Además, se pueden usar polinucleótidos que codifican B7330N o fragmentos del mismo para generar la inmunidad antitumoral. Tales polinucleótidos se pueden incorporar en un vector de expresión para expresar B7330N o los fragmentos del mismo en un sujeto a tratar. Así, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende los polinucleótidos que codifican B7330N o los fragmentos del mismo para el uso en la inducción de inmunidad antitumoral, en la que dicha composición farmacéutica se administra a un sujeto que padece o que corre el riesgo de desarrollar enfermedades proliferativas celulares tales como cáncer de mama.

Por supuesto, las realizaciones descritas en la presente memoria para los métodos de tratamiento o prevención del cáncer de mama o los métodos para la inducción de inmunidad antitumoral, en particular inmunidad antitumoral de mama se aplican, *mutatis mutandis*, al uso de cualquiera de los compuestos que se aplican en dichos métodos de tratamiento o prevención del cáncer de mama o en dichos métodos de inducción de inmunidad antitumoral tal como se describen en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama o para la inducción de inmunidad antitumoral, en particular inmunidad antitumoral de mama en un sujeto.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención, y para ayudar a alguien de experiencia habitual a hacer y usar los mismos.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comprende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Cualquier patente, solicitud de patente y publicación citada en la presente memoria se incorpora como referencia. Nada en esta memoria debe ser interpretado como una admisión de que la invención no tiene derecho a ser un precedente de tal descripción en virtud de la invención anterior.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se ilustra con detalle mediante los siguientes Ejemplos.

Materiales y Métodos

Líneas celulares de cáncer de mama y muestras tumorales

Las líneas celulares de cáncer de mama humanas HBL-100, HCC1937, MCF-7, MDA-MB-435s, YMB1, SKB-BR3, T47D, BT-20, BT-474, BT-549, HCC1143, HCC1500, HCC1599, MDA-MB-157, MDA-MB4S3, OUCB-F, ZR-75-1 y COS-7 se adquieren de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivan con las recomendaciones respectivas de su depositante. Las líneas celulares HBC4, HBC5 y MDA-MB-231 fueron amablemente donadas por el Dr. Yamori de Farmacología Molecular, Centro de Quimioterapia del Cáncer de la Fundación Japonesa para la Investigación del Cáncer. Todas las células se cultivaron en medios adecuados; es decir, RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO) para HBC4, HBC5, T47D, YMB1, OUCB-F, ZR-75-1, BT-549, HCC1143, HCC1500, HCC1599 y HCC1937

(con L-glutamina 2 mM); Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, CA) para BT474, HBL100, COS7; EMEM (Sigma) con aminoácidos esenciales 0,1 mM (Roche), piruvato sódico 1 mM (Roche), 0,01 mg/ml de Insulina (Sigma) para BT-20 y MCF-7; McCoy (Sigma) para SKBR3 (con L-glutamina 1,5 mM); L-15 (Roche) para MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB453 y MDA-MB-43Ss. Cada medio se complementó con un 10% de suero bovino fetal (Cansera) y un 1% de disolución de antibiótico/antimicótico (Sigma). Las células MDA-MB-231 y MDA-MB-435s se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de aire humidificado sin CO₂. Las otras líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de aire humidificado con un 5% de CO₂. Las muestras clínicas (cáncer de mama y conducto mamario normal) se obtuvieron de muestras quirúrgicas, con respecto a las cuales todos los pacientes habían dado un consentimiento informado.

Aislamiento de un gen humano nuevo representado por un punto de B7330N en una micromatriz de cADN

La fabricación de portaobjetos de micromatrices de cADN se ha descrito en otra parte (Ono K, *et al.*, (2000) Cancer Res., 60, 5007-11). Para cada análisis de los perfiles de expresión se prepararon grupos duplicados de placas que contenían 27.648 puntos de cADN, para reducir la fluctuación experimental. Brevemente, se purificó el ARN total de cada muestra de células microdisecionadas con láser, y se llevó a cabo una amplificación de ARN basada en T7 para obtener cantidades adecuadas de ARN para los experimentos con las micromatrices. Las alícuotas del ADN amplificado a partir de las células de cáncer de mama y de las células ductales de mama normales se marcaron mediante transcripción inversa con Cy5-dCTP y Cy3-dCTP, respectivamente (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, R.U.). La hibridación, el lavado y la detección se llevaron a cabo como se describió previamente (Ono K, *et al.*, (2000) Cancer Res., 60, 5007-11). Para detectar los genes que estaban activados normalmente en el cáncer de mama, se cribaron los patrones de expresión globales de los 27.648 genes de la micromatriz para seleccionar aquellos con tasas de expresión >3,0 que los presentes en >50% de i) los 77 casos de cáncer de mama premenopáusicos, ii) 69 carcinomas ductales invasivos, iii) 31 lesiones bien, iv) 14 moderadamente, o v) 24 escasamente diferenciadas, respectivamente. Del total de 493 genes que parecieron estar activados en las células tumorales, se concentró la atención en uno con un número de identificación interno, B7330N, debido a que su tasa de expresión fue mayor de 3,0 en más del 30% de los casos de cáncer de mama informativos.

Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa

Se extrajo el ARN total de cada población de células capturadas con láser y después se llevó a cabo una amplificación basada en T7 y transcripción inversa como se describió previamente (Kitahara O, *et al.*, (2001) Cancer Res., 61, 3544-9). Se prepararon diluciones adecuadas de cada cADN monocatenario para la PCR posterior monitorizando la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como control interno cuantitativo. Las secuencias del cebador de PCR fueron 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3' (SEQ ID NO; 1) y 5'-GGTTGAGCACAGGGTACTTTATT-3' (SEQ ID NO; 2) para *GAPDH*; y 5'-GAGTCCAGGTAAGTGAATCTGTCC-3' (SEQ ID NO; 3) y 5'-ATTTCCACC GAGACCTCTCATC-3' (SEQ ID NO; 4) para B7330N.

Análisis de transferencia de Northern

El ARN total se extrajo de todas las líneas celulares de cáncer de mama mediante el uso del equipo RNeasy (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras el tratamiento con DNasa I (Nippon Gene, Osaka, Japón), se aisló el mARN con un equipo de purificación de mARN (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se separó una alícuota de 1 mg de cada mARN, junto con ARNs poli A(+) aislados de mama (BioChain), pulmón, corazón, hígado, riñón, médula ósea de humanos adultos normales (BD, Clontech, Palo Alto, CA), en geles de agarosa desnaturalizante al 1% y se transfirieron a membranas de nailon (transferencias de Northern de cáncer de mama). Las transferencias de Northern de cáncer de mama y de múltiples tejidos humanos (Clontech, Palo Alto, CA) se hibridaron con los productos de PCR marcados con [α -³²P]-dCTP de B7330N preparados mediante RT-PCR (véase más adelante). La pre-hibridación, la hibridación y los lavados se llevaron a cabo según las recomendaciones del proveedor. Las transferencias se autorradiografiaron con filtros intensificadores a -80°C durante 14 días. Se prepararon sondas específicas para B7330N (502 pb) mediante RT-PCR con el uso del siguiente grupo de cebadores; 5'-GAGTC CAGGTAAGTGAATCTGTCC-3' (SEQ ID NO; 3) y 5'-ATTTCCACCGAGACCTCTCATC-3' (SEQ ID NO; 4) y se marcaron radiactivamente con el sistema de marcaje de ADN Megaprime (Amersham Bioscience).

Construcción de vectores de expresión de B7330N

Para la construcción de vectores de expresión de B7330N, se amplificó la secuencia codificante completa del cADN B7330N mediante PCR con el uso de la ADN polimerasa KOD-Plus (Toyobo, Osaka, Japón) y los siguientes cebadores; directo, 5'-CGGAATTCATGAGGCTCCTCCGCAG-3' (SEQ ID NO; 5), (el subrayado indica el sitio EcoRI), inverso, 5'-CCGCTCGAGGACAAAGAGCCACAACCTGATG-3'. (SEQ ID NO; 6) (el subrayado indica el sitio XhoI). Los productos de la PCR se insertaron en los sitios EcoRI y XhoI del vector de expresión pCAGGS-HA. Para hacer las construcciones de los mutantes de B7330N, se sustituyeron dos residuos de asparagina (Asn-476 y Asn-611) que se había predicho que eran sitios potenciales de N-glicosilación en la proteína B7330N con residuos de alanina mediante el uso de un equipo de mutagénesis dirigida por PCR (Invitrogen) y los siguientes cebadores;

ES 2 364 078 T3

N476A-F, 5'-ACAACCTGCACTGTCACGCCTTTTCCTGGTACCTGC-3' (SEQ ID NO;7) y N476A-R, 5'-GCAGG TACCAGGAAAAGGCGTGACAGTGCAGTTGT-3' (SEQ ID NO; 8); N611A-F, 5'-CATGGCCCCCTGCGCACC CAGTGACCCCC-3' (SEQ ID NO; 9) y N611A-R, 5'-GGGGGTCAGTGGGTGCGCAGGGGGCCATG-3' (SEQ ID NO; 10). Estas construcciones (pCAGGS-B7330N-HA, pCAGGS-N476A-HA y pCAGGS-N611A-HA) se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Para hacer una construcción para los experimentos de dimerización, se clonó la secuencia codificante completa del vector pcDNA3.1-myc-his (Invitrogen).

Tinción inmunocitoquímica

Para examinar inicialmente la localización subcelular de B7330N exógena, se sembraron células COS7 a 1×10^5 por pocillo para la expresión exógena. Después de 72 horas, se transfectó transitoriamente 1 mg de pCAGGS-B7330N-HA en las células COS7 mediante el uso del reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche) según las instrucciones del fabricante, respectivamente. Después, las células se fijaron con PBS que contenía un 4% de paraformaldehído durante 15 min, y se permeabilizaron con PBS que contenía un 0,1% de Triton X-100 durante 2,5 min a 4°C. Posteriormente, las células se cubrieron con un 3% de BSA en PBS durante 12 horas a 4°C para bloquear la hibridación inespecífica. A continuación, las células COS7 transfectadas con B7330N-HA se incubaron con un anticuerpo anti-HA de rata (Roche) a una dilución 1:1000. Después de lavar con PBS(-), las células transfectadas se tiñeron con un anticuerpo secundario anti-rata conjugado a Alexa488 (Molecular Probe) a una dilución 1:1000. Se realizó una tinción de contraste de los núcleos con dihidrocloruro de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se obtuvieron imágenes fluorescentes en un microscopio TCS SP2 AOBS (Leica, Tokio, Japón).

Generación de anticuerpos policlonales específicos anti-B7330N

Se prepararon plásmidos diseñados para expresar dos fragmentos de B7336N (35-239 aa.) con un epítipo marcado con His en su extremo N-terminal y C-terminal mediante el uso del vector pET28 (Novagen, Madison, WI). El péptido recombinante se expresó en *Escherichia coli*, cepa BL21 Codon-plus (Stratagene, La Jolla, CA), y se purificó mediante el uso de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen) según los protocolos del proveedor. La proteína recombinante purificada se sometió a inmunización en ratones. Los sueros inmunes se purificaron en columnas de afinidad mediante el uso de una proteína recombinante (35-239 aa.) según la metodología habitual. Se usaron anticuerpos anti-B7330N purificados por afinidad para las transferencias de Western, inmunocitotinción y tinción inmunohistoquímica como se describe más adelante.

Expresión de B7330N endógena en líneas celulares de cáncer de mama

Para detectar la proteína B7330N endógena en líneas celulares de cáncer de mama (HBC5, MDA-MB-231, SK-BR3, y T47D) y HMEC (célula epitelial de glándula mamaria humana), las células se lisaron en tampón de lisis como se describió anteriormente. La cantidad de proteína total se estimó mediante un equipo de ensayo de proteínas (Bio-Rad, Hercules, CA) y después se mezcló con tampón de muestras-SDS y se llevó a ebullición antes de cargarlo en un gel de SDS-PAGE del 10% como se describió anteriormente. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare). Las membranas que incluían las proteínas se bloquearon mediante una disolución de bloqueo y se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-B7330N para la detección de la proteína B7330N endógena. Finalmente, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a HRP y las bandas de proteína se visualizaron mediante reactivos de detección por ECL (GE Healthcare). Se examinó la β -actina para que sirviese como control de carga.

Para examinar adicionalmente la localización subcelular de la proteína B7330N endógena en la línea celular de cáncer de mama, T47D, se sembraron las células a 1×10^5 células por pocillo (portaobjetos con cámara Lab-Tek H, Nalgen Nunc International, Naperville, IL). Después de una incubación de 24 horas, las células se fijaron con PBS(-) que contenía un 4% de paraformaldehído durante 15 min, y se permeabilizaron con PBS (-) que contenía un 0,1% de Triton X-100 a 4°C durante 2,5 min. Posteriormente, las células se cubrieron con un 3% de BSA en PBS (-) a 4°C durante 12 horas para bloquear la hibridación inespecífica, seguido por una incubación con un anticuerpo policlonal anti-B7330N de conejo diluido 1:1000. Después de lavar con PBS (-), las células se tiñeron mediante un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa488 (Molecular Probe, Eugene, OR) diluido 1:1000. Se realizó una tinción de contraste de los núcleos con dihidrocloruro de 4',6'-diamidina-2'-fenilindol (DAPI). Se obtuvieron imágenes fluorescentes en un microscopio TCS SP2 AOBS (Leica, Tokio, Japón).

Tinción inmunohistoquímica

Se investigaron los patrones de expresión de la proteína B7330N en el cáncer de mama y en tejidos normales como se describió previamente (Kitahara O, *et al.* Cancer Res 61, 3544-3549 (2001)) mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-B7330N purificado por afinidad. Para la investigación de los órganos normales, se adquirieron cortes de tejidos disponibles comercialmente de corazón, pulmón, hígado, riñón y páncreas (Biochain). Brevemente, las muestras incrustadas en parafina se trataron con xileno y etanol, y se bloquearon mediante un reactivo bloqueante de proteínas (Dako Cytomation, Carpinteria, CA). Se añadió el anticuerpo anti-B7330N en una disolución diluida

ES 2 364 078 T3

de anticuerpo (1:50) y después se tiñó con sustrato-cromógeno (DAKO liquid DAB chromogen, DakoCytomation). Finalmente, se tiñeron las muestras de tejido con hematoxilina para distinguir el núcleo del citoplasma.

5 Construcción de un vector de expresión de siARN específico de B7330N mediante el uso de psiU6BX3.0

Se estableció un sistema de ARNi basado en vector mediante el uso del vector de expresión de siARN psiU6BX3.0 según un informe previo (documento WO2004076623). Se preparó un vector de expresión de siARN contra B7330N (psiU6BX-B7330N) mediante la clonación de los oligonucleótidos bicatenarios de la Tabla 1 en el sitio *Bbs*I del vector psiU6BX3.0. Se prepararon plásmidos de control psiU6BX-Mock mediante los sitios *Bsi*I y *Hind*III del sitio de clonación múltiple del vector psiU6BX3.0, respectivamente.

15 TABLA 1

Secuencias de oligonucleótidos bicatenarios insertadas en el vector de expresión de siARN

<i>psi-U6BX-Mock (control)</i>	SEQ ID NO
5'ACCGTGTCTTCAAGCTTGAAGACTA-3'	14
5'-AAAATAGTCTTCAAGCTTGAAGACAC-3'	15
<i>psi-U6BX si-1</i>	
5'-CACC GC ACTGTTTCAATGCCTTTTCAAGAG AAAAGGCATTGAAACAGTGC-3'	16
5'-AAAAGCACTGTTTCAATGCCTTTTCTCTTGAA AAAGGCATTGAAACAGTGC-3'	17
<i>psi-U6BX-si-2</i>	
5'-CACC GAG AAATCCTTCGGTGACATTCAAGAG ATGTCACCGAAGGATTTCTC-3'	20
5'-AAAAGAGAAATCCTTCGGTGACATCTCTTGA ATGTCACCGAAGGATTTCTC-3'	21

Los subrayados indican las secuencias de siARN específicas de B7330N.

40 Efecto de silenciamiento de genes del siARN específico de B7330N

Las líneas celulares de cáncer de mama humano, T47D o BT-20, se colocaron en placas de 15 cm (4x10⁶ células/placa) y se transfectaron con 16 µg de cada psiU6BX-Mock como control negativo y psiU6BX-B7330N mediante el uso del reactivo FuGENE6 según las recomendaciones del proveedor (Roche). 24 horas tras la transfección, las células se volvieron a sembrar de nuevo para el ensayo de formación de colonias (2x10⁶ células/placa de 10 cm), RT-PCR (2x10⁶ células/placa de 10 cm) y el ensayo de MTT (2x10⁶ células/pocillo). Se seleccionaron las células que producían B7330N con medio que contenía 0,7 mg/ml o 0,6 mg/ml de neomicina (Geneticin, Invitrogen) en las células T47D o BT-20, respectivamente. Después, se cambió el medio cada dos días durante 3 semanas. Para estudiar el funcionamiento de los siARN, se extrajo el ARN total de las células a los 7 días tras la selección con neomicina, y después se confirmó el efecto de inhibición de los siARNs mediante una RT-PCR semicuantitativa con el uso de grupos de cebadores específicos para B7330N y *GAPDH*; 5'-ATGGAAATCCCATCACCATCT-3' (SEQ ID NO; 11) y 5'-GGTTGAGCACAGGTACTTTATT-3' (SEQ ID NO; 2) para *GAPDH* como control interno, y 5'-GGATGAAACATACCCCATCA-3' (SEQ ID NO;12) y 5'-ATGACACTAGTGCCCTTGG-3' (SEQ ID NO; 13) para B7330N. Además, los transfectantes que expresaban los siARNs mediante el uso de las líneas celulares T47D o BT-20 se cultivaron durante 28 días en medios selectivos que contenían neomicina, respectivamente. Tras la fijación con un 4% de paraformaldehído, las células transfectadas se tiñeron con disolución de Giemsa para determinar la formación de colonias. Se llevaron a cabo ensayos de MTT para cuantificar la viabilidad celular. Después de 10 días de cultivo en el medio que contenía neomicina, se añadió una disolución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Sigma) a una concentración de 0,5 mg/ml. Tras la incubación a 37°C durante 2,5 horas, se añadió ácido-SDS (HCl 0,01 N/10% de SDS); la suspensión se mezcló enérgicamente y después se incubó durante la noche a 37°C para disolver los cristales de color azul oscuro. Se midió la absorbancia a 570 nm con un lector de microplacas 550 (BioRad). Para estudiar el funcionamiento del siARN, se extrajo el ARN total de las células 7 días tras la selección, y se llevó a cabo el ensayo de MTT 10 días tras la selección mediante el uso del equipo Cell Counting Kit-8 (Dojindo) según el protocolo del fabricante. La absorbancia se mide a una longitud de onda de 570 nm con un lector de microplacas 550 (BioRad). Para el ensayo de formación de colonias, las células se fijan con un 4% de paraformaldehído durante 15 min antes de tñirlas con una disolución de Giemsa (Merck). Cada experimento se realiza por triplicado.

ES 2 364 078 T3

Establecimiento de células NIH3T3 que expresan B7330N de manera estable

Los vectores de expresión de B7330N de tamaño completo y del mutante N476A se transfectaron en células NIH3T3 mediante el uso de FLTGENE6 como se describió anteriormente. Las células transfectadas se incubaron en el medio de cultivo que contenía 0,9 mg/ml de geneticina (G418) (Invitrogen). Las células NIH3T3 clonales se subclonaron mediante dilución limitante. Se determinó la expresión y la localización subcelular de B7330N marcada con HA mediante análisis de transferencia de Western e inmunocitoquímica mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-HA, respectivamente. Finalmente, se establecieron varios clones y se denominaron WT-B7330N y N476A-B7330N. Para investigar el efecto estimulador del crecimiento de B7330N de tipo natural o de N476A-B7330N, se sembraron 5000 células de dos células WT-B7330N-NIH3T3 independientes (WT-1, y -2), dos células independientes N476A-B7330N-NIH3T3 (N476A-1 y -2) y dos células independientes MOCK-NIH3T3 (Mock-1 y -2), y se contó el número de células mediante el ensayo de MTT cada día durante 6 días. Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Análisis de transferencia de Western de B7330N exógena

Se examinó la expresión de la proteína B7330N exógena en células COS7, mediante el uso de células COS7 transfectadas con pCAGGS-B7330N-HA, pCAGGS-N476A-HA o pCAGGS-N611A-HA y Mock como control negativo, respectivamente. Las células se lisaron en un 0,1 % de tampón de lisis NP-40 que contenía 50 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,0), 150 mmol/L de NaCl, y 0,1% de mezcla de inhibidores de proteasas III (Calbiochem, San Diego, CA). Los lisados celulares se separaron en geles de un 8% de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y después se incubaron con pAb anti-HA de rata como anticuerpo primario. Tras la incubación con IgG-HRP anti-rata de cabra como anticuerpo secundario (Amersham Biosciences), se visualizaron las señales con un equipo de ECL (Amersham Biosciences). Para detectar la proteína B7330N secretada, se mantuvieron las células COS7 transfectadas con B7330N, N476A, o N611A en un medio exento de suero durante 48 horas tras la transfección y después se cultivaron durante 4 días. También se detectó la proteína B7330N en los lisados celulares y en los medios de cultivo condensados mediante pAb anti-HA de rata e IgG-HRP anti-rata. El pAb de β -actina (dilución 1:2000) sirvió como control de carga para las proteínas (clon AC-15, Sigma-Aldrich, MO). Para confirmar la glicosilación de la proteína B7330N, también se prepararon inicialmente lisados celulares como se describió anteriormente sin incluir la mezcla de inhibidores de proteasas III. Cada 10 ml de lisado celular se mezcló con 10 ml de tampón de lisis y 1 U de N-glicosidasa F (Calbiochem, San Diego, CA), y después se incubó durante 1 hora a 37°C. La reacción se llevó a ebullición con el tampón de muestras de SDS.

Ensayo autocrino

Las células COS7 transfectadas con B7330N se mantuvieron en medio exento de FCS durante dos días, y después se cultivaron las células COS7 originarias con o sin B7330N en el medio para confirmar la estimulación autocrina del crecimiento celular durante 4 días. El efecto de B7330N sobre el crecimiento celular se monitorizó contando las células con un hemocitómetro y un ensayo de MTT como se describió anteriormente. Las células (5×10^3 células/pocillo) se cultivaron en DMEM que contenía un 0,1% de FCS.

Efecto neutralizante mediante un anticuerpo anti-B7330N

El efecto del anticuerpo anti-B7330N sobre el crecimiento celular se monitorizó contando las células con un hemocitómetro. Las líneas celulares de cáncer de mama, T47D y HBL-100, se sembraron en microplacas de 12 pocillos (5×10^4 células/pocillo) y se cultivaron durante 5 días en medio de McCoy 5A que contenía un 1% de FBS complementado con 10,2 μ g/mL de pAb anti-B7330N purificado por afinidad, o con PBS(-) como control negativo. El número de células se determinó como se describió anteriormente.

Resultados

Identificación de B7330N denominada UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 6, como gen activado en las células de cáncer de mama

Cuando se analizaron los perfiles de expresión de genes de células cancerosas de 77 pacientes de cáncer de mama premenopáusico mediante el uso de una micromatriz de cADN que representaba 27.648 genes humanos, se identificaron 493 genes que estaban activados normalmente en las células de cáncer de mama. Entre ellos, se centró la atención en B7330N, denominado UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 6, *GALNT6*, que está localizado en el cromosoma 12q13 con un transcrito de mRNA de una longitud de 4381 ó 4556 bases que consiste en 11 exones. La expresión de B7330N estaba elevada en 27 de 77 (35%) casos de cáncer de mama de los que se pudieron obtener datos sobre la expresión. Para confirmar el patrón de expresión de este gen en el cáncer de mama, se llevó a cabo un análisis mediante RT-PCR semicuantitativa mediante el uso de líneas celulares de cáncer de mama y tejidos humanos normales que incluyen células mamarias normales. Como resultado, se descubrió que B7330N, cuya expresión se demostró que estaba elevada en 7 de 12 muestras clínicas de cáncer de mama (lesiones

escasamente diferenciadas) en comparación con las células ductales de mama normales y otros tejidos normales (Fig. 1a), se sobreexpresaba en 7 de 20 líneas celulares de cáncer de mama (Fig. 1b). Para examinar adicionalmente el perfil de expresión de este gen, se llevaron a cabo análisis de transferencia de Northern con múltiples tejidos humanos y líneas celulares de cáncer de mama mediante el uso de un fragmento de cADN de B7330N como sonda. Como resultado, se observó que un transcrito de aproximadamente 5 kb se expresaba exclusivamente en la placenta, páncreas, estómago y traquea humanos normales (Fig. 1c). Cuando se examinó adicionalmente el patrón de expresión de estos transcritos con una transferencia de Northern de cáncer de mama, se descubrió que este transcrito estaba sobreexpresado específicamente en las líneas celulares de cáncer de mama, en comparación con los tejidos humanos normales que incluían glándula mamaria y médula ósea (Fig. 1d).

El gen *GALNT6* codifica una proteína de 622 aminoácidos que es capaz de glicosilar el péptido de fibronectina *in vitro* y que se expresa en una línea celular de fibroblastos, lo que indica que puede estar implicado en la síntesis de la fibronectina oncofetal. La predicción informática mediante SMART y PFAM demuestra que *GALNT6* contiene un péptido señal, el motivo Glycos_transf_2 en los residuos 180 a 370, y el motivo RICIN en los residuos 496 a 622.

Expresión de B7330N exógena

Para examinar la caracterización de B7330N, se investigó la localización subcelular de los productos del gen en las células mamíferas. En primer lugar, se transfectaron de manera transitoria plásmidos que expresaban la proteína B7330N (pCAGGS-B7330N-HA) en células COS7, y el análisis inmunocitoquímico con anticuerpo anti-marcador de HA revela que la proteína B7330N exógena apareció en forma de un patrón granuloso en las vesículas de secreción de todas las células COS7 transfectadas durante 72 horas tras la transfección (Fig. 2a). Después, para examinar la secreción extracelular de B7330N, se llevó a cabo un análisis de transferencia de Western con el uso de lisados celulares y medio de cultivo de las células COS7 que se habían transfectado de manera transitoria con un plásmido diseñado para expresar B7330N (véase la sección Materiales y Métodos), y un anticuerpo hacia el marcador de HA C-terminal detectó la secreción de la proteína en el medio de cultivo (Fig. 2b).

Se descubrió que el peso molecular de los productos de B7330N estimado mediante análisis de transferencia de Western era mayor que el tamaño predicho calculado a partir de las secuencias de cADN (Fig. 2b). Debido a que la secuencia de aminoácidos primaria de B7330N contiene dos secuencias consenso predichas de glicosilación asociada a N, para confirmar si estos dos productos de B7330N mayores estaban glicosilados, se trató inicialmente la proteína con una N-glicosilasa. Como resultado, la proteína B7330N más grande desapareció del lisado celular, lo que indica que esta proteína estaba glicosilada en las células mamíferas (Fig. 3a). Posteriormente, para determinar el sitio de glicosilación asociado a N, se establecieron construcciones mutantes de sitios potenciales de N-glicosilación de la proteína B7330N (véase la sección Materiales y Métodos). Después se transfectaron estos plásmidos, de tipo natural, N476A o N611A a células COS-7, respectivamente, y se inmunotransfrieron con un anticuerpo anti-marcador de HA. De manera interesante, se observó que la banda mayor de las células transfectadas con N476A desapareció, pero con la proteína de tipo natural y N611A no hubo cambio en los lisados celulares, lo que indica que Asn-476 es un sitio de glicosilación supuesto (Fig. 3b). Además, para determinar si la glicosilación era necesaria para la secreción de B7330N, se examinó si se secretada al medio de cultivo la proteína N476A exógena y B7330N de tipo natural en las células COS7. De manera interesante, la B7330N de tipo natural exógena se secretó en el medio de cultivo, mientras la proteína N476A no se detectó en el medio de cultivo, lo que sugiere que la glicosilación en Asn-476 de la proteína B7330N es necesaria para la secreción (Fig. 3c).

Expresión de B7330N endógena en células de cáncer de mama

Se desarrolló un anticuerpo policlonal hacia B7330N, y después se investigó la expresión endógena de la proteína B7330N en los lisados celulares de las líneas celulares de cáncer de mama, SKBR3, T47D y HMEC (célula epitelial mamaria humana) como control de los experimentos mediante análisis de transferencia de Western (Fig. 7a). Ambas líneas celulares de cáncer de mama mostraron niveles elevados de expresión de B7330N, mientras la línea de células epiteliales mamarias normales, HMEC no mostraron expresión. El análisis inmunocitoquímico posterior de las líneas celulares de cáncer de mama, T47D, mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-B7330N indicó que la localización de la proteína B7330N endógena apareció en forma de un patrón granuloso en las vesículas de secreción en las células de cáncer de mama, al igual que el de la proteína B7330N expresada de manera exógena (Fig. 7b). Para investigar adicionalmente la expresión de B7330N en cortes de cáncer de mama y de tejidos normales, también se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-B7330N. Se identificó una tinción intensa en el citoplasma de dos subtipos histológicos diferentes de cáncer de mama, el carcinoma papilo-tubular (571T) y el carcinoma intraductal (164T), pero su expresión fue difícilmente detectable en los tejidos mamarios normales (425N) (Fig. 7c). Además, de acuerdo con los resultados del análisis de transferencia de Northern, no se observó expresión en corazón, pulmón, hígado, riñón y páncreas (Fig. 7d).

Efecto inhibitor del crecimiento del ARN pequeño de interferencia (siARN) diseñado para reducir la expresión de B7330N

Para determinar el papel estimulador del crecimiento de B7330N, se eliminó la expresión de B7330N endógena en las líneas de cáncer de mama T47D y BT-20 (Fig. 4), que han mostrado sobreexpresión de B7330N, por medio de la técnica de ARN de interferencia (ARNi) basada en vector de mamífero (véase la sección de Materiales y Métodos). Se examinó el nivel de expresión de B7330N mediante experimentos de RT-PCR semicuantitativa. Tal como se muestra en la Fig. 4a, entre las dos construcciones de siARN del gen examinado, los siARNs específicos de B7330N (si1 y si2) inhibieron la expresión, en comparación con las construcciones de siARN de control (psiU6BX-Mock). Para confirmar la inhibición del crecimiento celular con los siARNs específicos de B7330N, se llevaron a cabo ensayos de MTT y ensayos de formación de colonias, respectivamente (Fig. 4b, c). Como resultado, la introducción de las construcciones de siARN de B7330N inhibió el crecimiento de estas células de cáncer de mama, de forma coherente con el resultado de la expresión reducida anterior de este gen. Cada resultado se verificó mediante tres experimentos independientes. Así, estos hallazgos indican que B7330N tiene una función significativa en el crecimiento celular del cáncer de mama.

Para confirmar adicionalmente el efecto estimulador del crecimiento de B7330N, se establecieron células derivadas de NIH3T3 que expresaron de manera estable B7330N exógena (células NIH3T3-WT-B7330N-1, -2 y NIH3T3-N476A-B7330N-1, -2). El análisis de transferencia de Western indicó un nivel elevado de proteína WT-B7330N y N476A-B7330N exógena en dos clones derivados, respectivamente (Fig. 8a). Los ensayos de MTT posteriores demostraron que tres líneas celulares derivadas, NIH3T3-B7330N-1 y -2, crecieron mucho más rápido que las células transfectadas con un plásmido simulado (células NTH3T3-Mock-1, -2 y -3), mientras las células con proteína N476A-B7330N crecieron de manera moderada en comparación con WT-B7330N-1, -2 (Fig. 8b), lo que indica que fue probable que la expresión de B7330N aumentase el crecimiento celular con dependencia de la expresión.

Además, se observó la forma N-glicosilada en las células WT-B7330N, mientras no se observó en las células N476A-B7330N (Fig. 8a). Estos resultados confirmaron que la banda mayor desapareció tras el tratamiento del ensayo de N-glicosidasa descrito anteriormente (datos no mostrados).

Naturaleza autocrina del aumento del crecimiento por B7330N

Se preparó un medio de cultivo que contenía proteína B7330N, derivada del medio usado para cultivar las células COS7 que sobreexpresaban B7330N (Fig. 5a), y se cultivaron células COS7 originarias en este medio. Este experimento que usaba B7330N nativa reveló un crecimiento aumentado de las células COS7 (Fig. 5a). Este resultado apoya firmemente la conclusión de que B7330N, una molécula secretora, funciona como un factor de crecimiento autocrino que es esencial para la proliferación de las células de cáncer de mama. Además, cuando se añadió pAb anti-B7330N a los medios de cultivo que daban soporte a las células de la línea celular T47D de cáncer de mama, el crecimiento de esta línea celular se inhibió de manera significativa en comparación con el tratamiento con PBS(-) (Fig. 5b; panel izquierdo), aunque las células HBL-100, que no expresan B7330N, no se vieron influidas por este tratamiento con este pAb (Fig. 5b; panel derecho).

Dimerización de B7330N

Debido a que se informó de que algunas de las glicosiltransferasas formaban un dímero en las células (El-Battari A, *et al.*, *Glycobiology*. 2003;13(12):941-53), se examinó si B7330N también es capaz de oligomerizar con inmunoprecipitación.

Cuando se inmunoprecipitó la proteína pCAGGS-B7330N-HA exógena con un anticuerpo anti-HA, un análisis de transferencia de Western con el uso de un anticuerpo anti-HA reveló la proteína B7330N exógena en forma de una banda que correspondía al doble de la masa molecular predicha.

Para investigar esa hipótesis, se diseñaron dos tipos de construcciones de B7330N marcadas para examinar la homo-oligomerización. Se co-transfectaron pCAGGS-B7330N-HA y pcDNA3.1-B7330N-myc en células COS-7 y se co-inmunoprecipitaron mediante el uso de un anticuerpo anti-HA o anti-myc, respectivamente. Tal como se muestra en la Fig. 6, mediante el uso de un anticuerpo anti-myc para captar pcDNA3.1-B7330N-myc se dio como resultado la co-inmunoprecipitación de pCAGGS-B7330N-HA, y mediante el uso de un anticuerpo anti-HA para captar pCAGGS-B7330N-HA se dio como resultado la co-inmunoprecipitación de pcDNA3.1-B7330N-myc. Estos hallazgos indicaron que B7330N es capaz de constituir un complejo homo-oligomérico únicamente en las células vivas.

En esta invención, a través de los perfiles de expresión precisos del cáncer de mama por medio de una micromatriz de cADN de todo el genoma, se aislaron genes nuevos, B7330N, que se sobreexpresaban de manera significativa en las células de cáncer de mama, en comparación con los tejidos humanos normales.

B7330N, denominada UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 6, *GALNT6*, se selecciona para el estudio debido a su expresión significativamente elevada en el cáncer de mama. Se identificó que los transcritos de aproximadamente 5 kb mostraban una expresión específica del cáncer. Se demostró que el tratamiento de las células de cáncer de mama con siARN inhibió de manera eficaz la expresión de B7330N e in-

hibió de manera significativa el crecimiento celular/tumoral del cáncer de mama. Estos hallazgos indican que B7330N podría desempeñar un papel clave en la proliferación y el crecimiento de las células tumorales, y podría ser un objetivo prometedor para el desarrollo de fármacos antineoplásicos.

5

Discusión

En este informe, a través de los perfiles de expresión precisos del cáncer de mama por medio de una micromatriz de cADN de todo el genoma, se aislaron genes nuevos, B7330N, que se sobreexpresaban de manera significativa en las células de cáncer de mama, en comparación con los tejidos humanos normales. Además, se demostró que el tratamiento de las células de cáncer de mama con siARN inhibió de manera eficaz la expresión del gen objetivo, B7330N, e inhibió de manera significativa el crecimiento celular/tumoral del cáncer de mama. Estos hallazgos indican que B7330N podría desempeñar un papel clave en la proliferación y el crecimiento de las células tumorales, y podría ser un objetivo prometedor para el desarrollo de fármacos antineoplásicos.

15

B7330N, denominado UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 6, GALNT6, se selecciona para el estudio debido a su expresión significativamente elevada en el cáncer de mama. Se identificó que los transcritos de aproximadamente 5 kb mostraban una expresión específica del cáncer. Se demostró que el tratamiento de las células de cáncer de mama con siARN inhibió de manera eficaz la expresión de B7330N e inhibió de manera significativa el crecimiento celular/tumoral del cáncer de mama. Estos hallazgos indican que B7330N podría desempeñar un papel clave en la proliferación y el crecimiento de las células tumorales, y podría ser un objetivo prometedor para el desarrollo de fármacos antineoplásicos.

Aplicabilidad industrial

La expresión del gen humano *B7330N* está elevada de manera notable en el cáncer de mama en comparación con el epitelio ductal de mama no canceroso. Por lo tanto, este gen es útil como marcador de diagnóstico del cáncer de mama, y las proteínas codificadas son útiles por tanto en ensayos de diagnóstico del cáncer de mama.

30

También se ha demostrado que la expresión de la proteína nueva B7330N estimula el crecimiento celular, a la vez que el crecimiento celular se inhibe mediante ARNs pequeños de interferencia que corresponden al gen *B7330N*. Estos hallazgos demuestran que la proteína B7330N estimula la actividad oncogénica. Así, cada una de estas nuevas oncoproteínas es un objetivo útil para el desarrollo de productos farmacéuticos antineoplásicos. Por ejemplo, los agentes que bloquean la expresión de B7330N, o que impiden su actividad, tienen utilidad terapéutica como agentes antineoplásicos, en particular agentes antineoplásicos para el tratamiento de los cánceres de mama. Los ejemplos de tales agentes incluyen los oligonucleótidos antisentido, los ARNs pequeños de interferencia, y las ribozimas contra el gen *B7330N*, y los anticuerpos que reconocen B7330N.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método *in vitro* de cribado en busca de un compuesto para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, y dicho método comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - 10 (1) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
 - (2) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos una homología del 80% respecto de SEQ ID NO: 25; y
 - 15 (3) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
- (b) detectar la actividad de unión entre el polipéptido y el compuesto de ensayo; y
- 20 (c) seleccionar un compuesto que se une al polipéptido.

25 2. Un método *in vitro* de cribado en busca de un compuesto para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, y dicho método comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - 30 (1) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
 - (2) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos una homología del 80% respecto de SEQ ID NO: 25; y
 - 35 (3) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
- (b) detectar la actividad biológica del polipéptido de la etapa (a); y
- 40 (c) seleccionar un compuesto que inhibe la actividad biológica del polipéptido en comparación con la actividad biológica detectada en ausencia del compuesto de ensayo.

45 3 El método de la reivindicación 2, en el que la actividad biológica es una actividad de proliferación celular.

4. Un método *in vitro* de cribado en busca de un compuesto para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, y dicho método comprende las etapas de:

- 50 (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - (1) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
 - 55 (2) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos una homología del 80% respecto de SEQ ID NO: 25;
 - (3) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y
 - 60 (4) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos parcial de SEQ ID NO: 25 que incluye el sitio de glicosilación de cualquier polipéptido de (1) a (3);
- (b) detectar el nivel de glicosilación del polipéptido; y
- 65 (c) seleccionar un compuesto que inhibe el nivel de glicosilación del polipéptido en comparación con el nivel de glicosilación detectado en ausencia del compuesto de ensayo.

ES 2 364 078 T3

5. El método de la reivindicación 4, en el que el nivel de glicosilación es el de la asparagina 476 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una posición homóloga a la misma.

6. Un método *in vitro* de cribado en busca de un compuesto para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, y dicho método comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una célula que expresa un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

(1) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;

(2) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos una homología del 80% respecto de SEQ ID NO: 25;

(3) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y

(4) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos parcial de SEQ ID NO: 25 que incluye el sitio de glicosilación de cualquier polipéptido de (1) a (3); y

(b) seleccionar un compuesto que inhibe el nivel de glicosilación del polipéptido en comparación con el nivel de glicosilación detectado en ausencia del compuesto de ensayo.

7. El método de la reivindicación 6, en el que el nivel de glicosilación es el de la asparagina 476 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una posición homóloga a la misma.

8. Un método *in vitro* de cribado en busca de un compuesto para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, y dicho método comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una célula que expresa un polinucleótido que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26; y

(b) seleccionar un compuesto que reduce el nivel de expresión de un polinucleótido que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26 en comparación con el nivel de expresión detectado en ausencia del compuesto de ensayo.

9. El método de la reivindicación 8, en el que la célula es una célula de cáncer de mama.

10. Un método *in vitro* de cribado en busca de un compuesto para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, y dicho método comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una célula en la que se ha introducido un vector que comprende la región reguladora transcripcional de un gen marcador y un gen indicador que se expresa bajo el control de la región reguladora transcripcional, en el que el gen marcador comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26,

(b) medir el nivel de expresión o actividad de dicho gen indicador; y

(c) seleccionar un compuesto que reduce el nivel de expresión o actividad de dicho gen indicador en comparación con el nivel de expresión o actividad de dicho gen indicador detectado en ausencia del compuesto de ensayo.

11. Una composición para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, y dicha composición comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polinucleótido antisentido o un ARN pequeño de interferencia contra un polinucleótido y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;

(b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos, y que tiene una actividad biológica equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y

ES 2 364 078 T3

- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

5

12. La composición de la reivindicación 11, en la que dicho ARN pequeño de interferencia comprende la secuencia nucleotídica que corresponde a la secuencia nucleotídica de SEQ ID NOs: 18 ó 22 como secuencia objetivo.

10 13. La composición de la reivindicación 12, en la que dicho siARN tiene la fórmula general 5'-[A]-[B]-[A']-3', en la que [A] es una secuencia ribonucleotídica que corresponde a la secuencia nucleotídica de SEQ ID NOs: 18 ó 22,

[B] es una secuencia ribonucleotídica que consiste en 3 a 23 nucleótidos, y

15 [A'] es una secuencia ribonucleotídica que consiste en la secuencia complementaria de [A].

14. La composición de la reivindicación 11, en la que dicha composición comprende un agente potenciador de la transfección.

20

15. Una composición para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, y dicha composición comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo hacia un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

25 (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;

(b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos, y que tiene una actividad biológica equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y

30

(c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

35

16. El uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polinucleótido antisentido, o ARN pequeño de interferencia contra un polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

40 (1) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;

(2) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos, y que tiene una actividad biológica equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y

45

(3) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama.

50

17. El uso de la reivindicación 16, en el que dicho siARN comprende la secuencia nucleotídica que corresponde a la secuencia nucleotídica de SEQ ID NOs: 18 ó 22 como secuencia objetivo.

55

18. El uso de la reivindicación 17, en el que dicho siARN tiene la fórmula general 5'-[A]-[B]-[A']-3', en la que [A] es una secuencia ribonucleotídica que corresponde a la secuencia nucleotídica de SEQ ID NOs: 18 ó 22,

[B] es una secuencia ribonucleotídica que consiste en 3 a 23 nucleótidos, y

60

[A'] es una secuencia ribonucleotídica que consiste en la secuencia complementaria de [A].

19. El uso de la reivindicación 16, en el que dicha composición comprende un agente potenciador de la transfección.

65

ES 2 364 078 T3

20. El uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo hacia un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
- (b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos, y que tiene una actividad biológica equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y
- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama.

21. El uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en (a)-(c), o un polinucleótido que codifica el polipéptido:

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o un fragmento de la misma;
- (b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos, y que tiene una actividad biológica equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos, y que tiene una actividad biológica equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o un fragmento de la misma para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama.

22. El uso de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o un fragmento de la misma, un polinucleótido que codifica el polipéptido o un vector que comprende el polinucleótido para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, en el que el polipéptido induce inmunidad anti-tumoral.

23. El uso de una célula presentadora de antígenos, que presenta un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o un fragmento de la misma para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, en el que el polipéptido induce inmunidad anti-tumoral.

24. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama, y dicha composición comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido seleccionado del grupo de (a)-(c), o un polinucleótido que codifica el polipéptido:

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o un fragmento de la misma;
- (b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos, y que tiene una actividad biológica equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 24 ó 26, en el que el polipéptido tiene una actividad biológica equivalente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o un fragmento de la misma.

25. La composición farmacéutica de la reivindicación 24, en la que el polinucleótido se incorpora en un vector de expresión.

26. Una molécula bicatenaria que comprende una cadena con sentido y una cadena antisentido, en la que la cadena antisentido comprende una secuencia ribonucleotídica que es complementaria respecto de dicha cadena con sentido, en la que dicha cadena con sentido y dicha cadena antisentido hibridan entre sí para formar dicha molécula bicatenaria, y en la que dicha molécula bicatenaria, cuando se introduce en una célula que expresa el polinucleótido que comprende

ES 2 364 078 T3

la secuencia nucleotídica de SEQ ID NOs: 24 ó 26, inhibe la expresión de dicho gen, en la que la secuencia objetivo de la cadena con sentido consiste en SEQ ID NO: 18 ó 22.

5 27. La molécula bicatenaria de la reivindicación 26, en la que un único transcrito ribonucleotídico comprende la cadena con sentido y la cadena antisentido, y dicha molécula bicatenaria comprende además una secuencia ribonucleotídica monocatenaria que une dicha cadena con sentido y dicha cadena antisentido.

28. Un vector que codifica la molécula bicatenaria de la reivindicación 26.

10 29. El vector de la reivindicación 28, en el que el vector codifica un transcrito que tiene una estructura secundaria, en el que el transcrito comprende la cadena con sentido y la cadena antisentido.

15 30. El vector de la reivindicación 28, en el que el transcrito comprende además una secuencia ribonucleotídica monocatenaria que une dicha cadena con sentido y dicha cadena antisentido.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

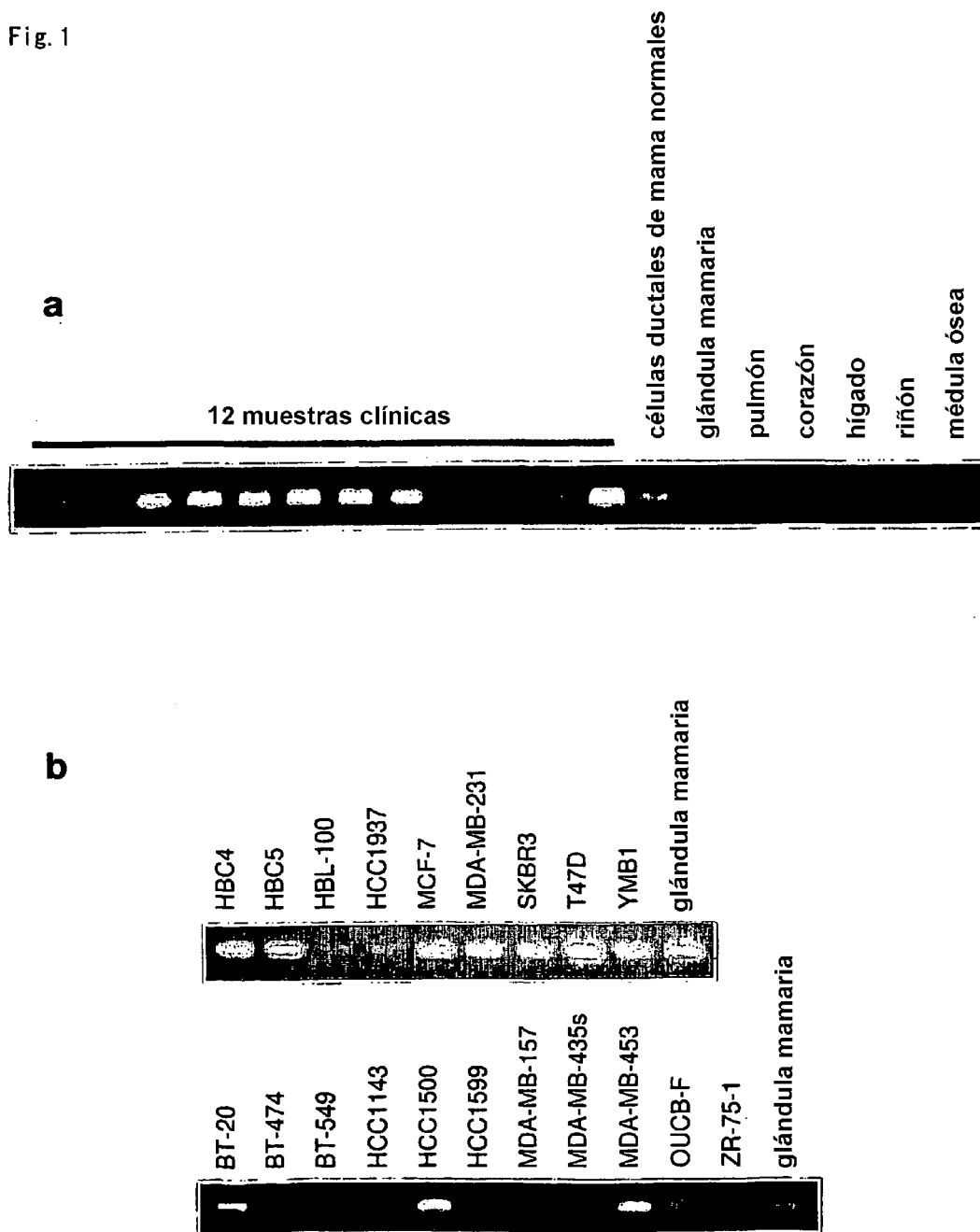
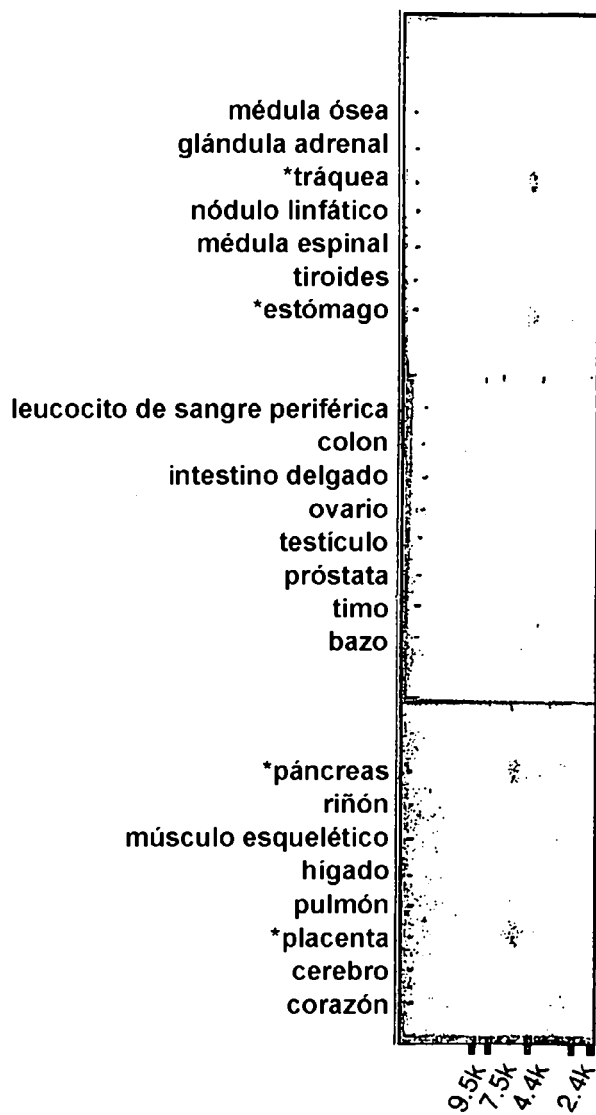
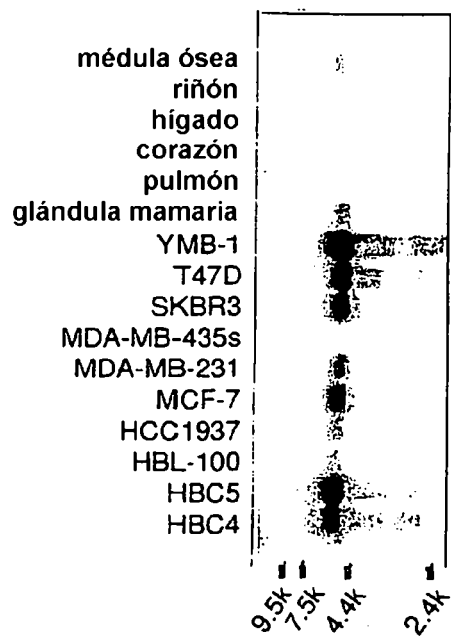


Fig. 1



c



d

Fig. 2

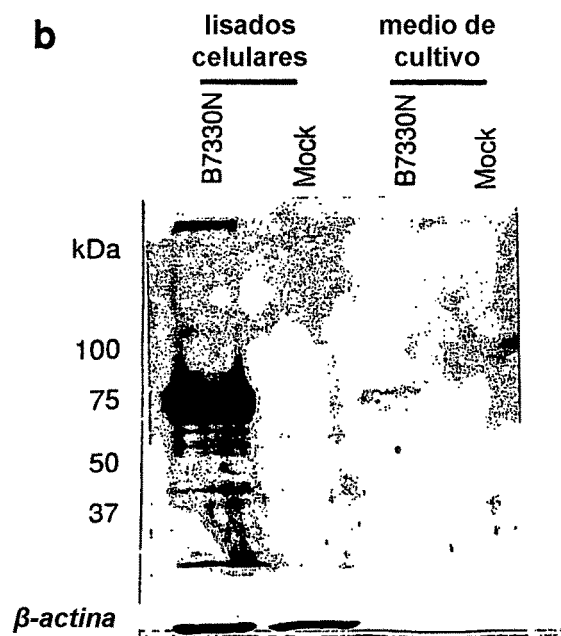
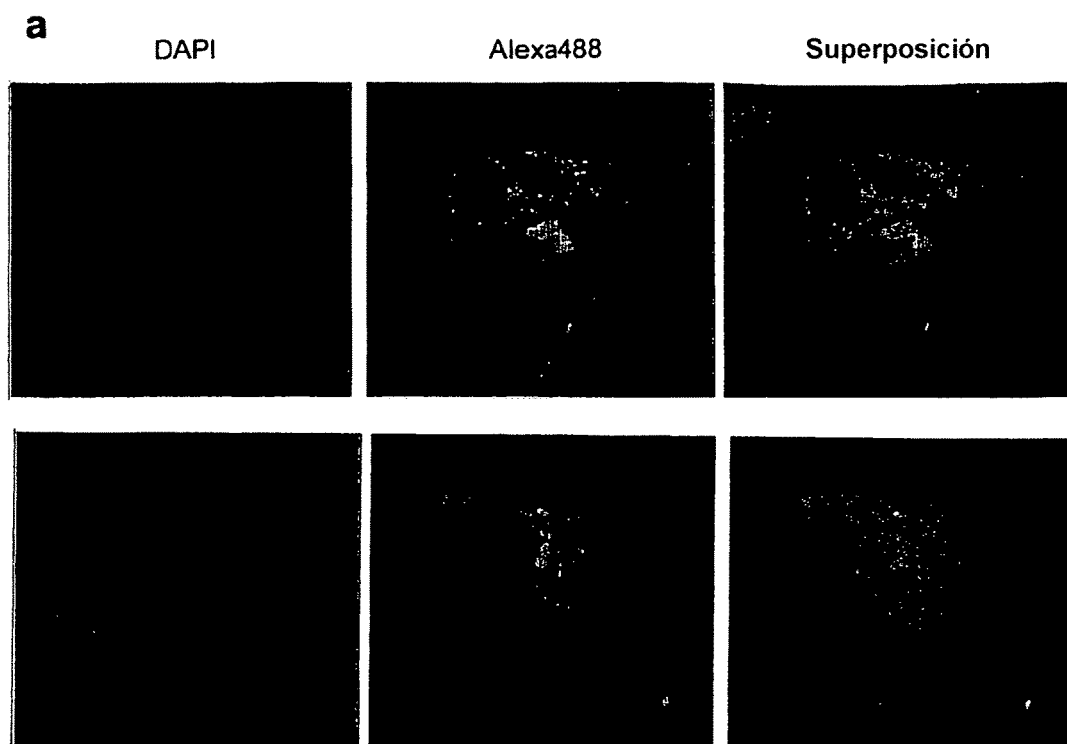
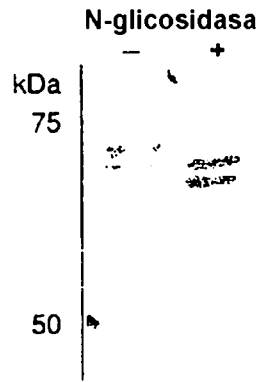
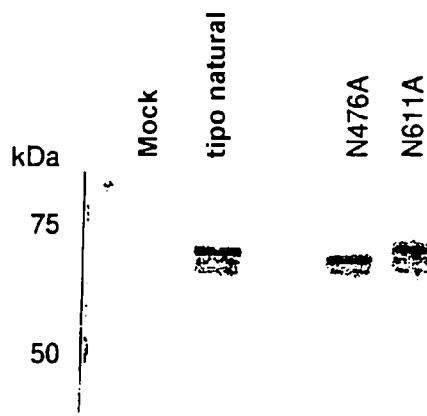


Fig. 3

a



b



c

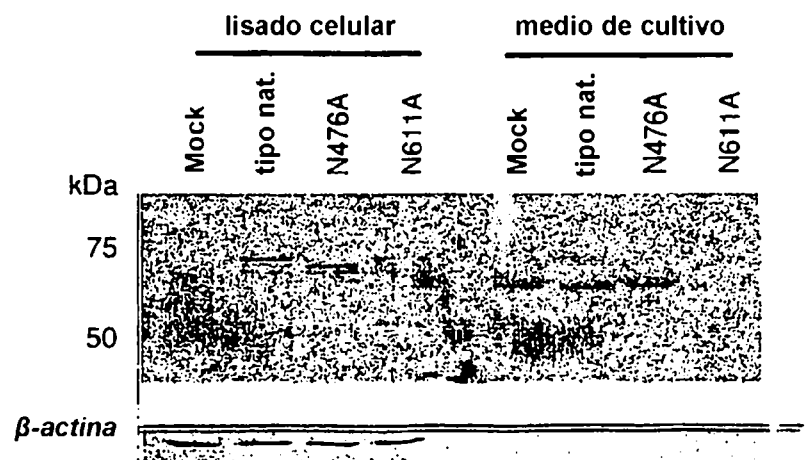


Fig. 4

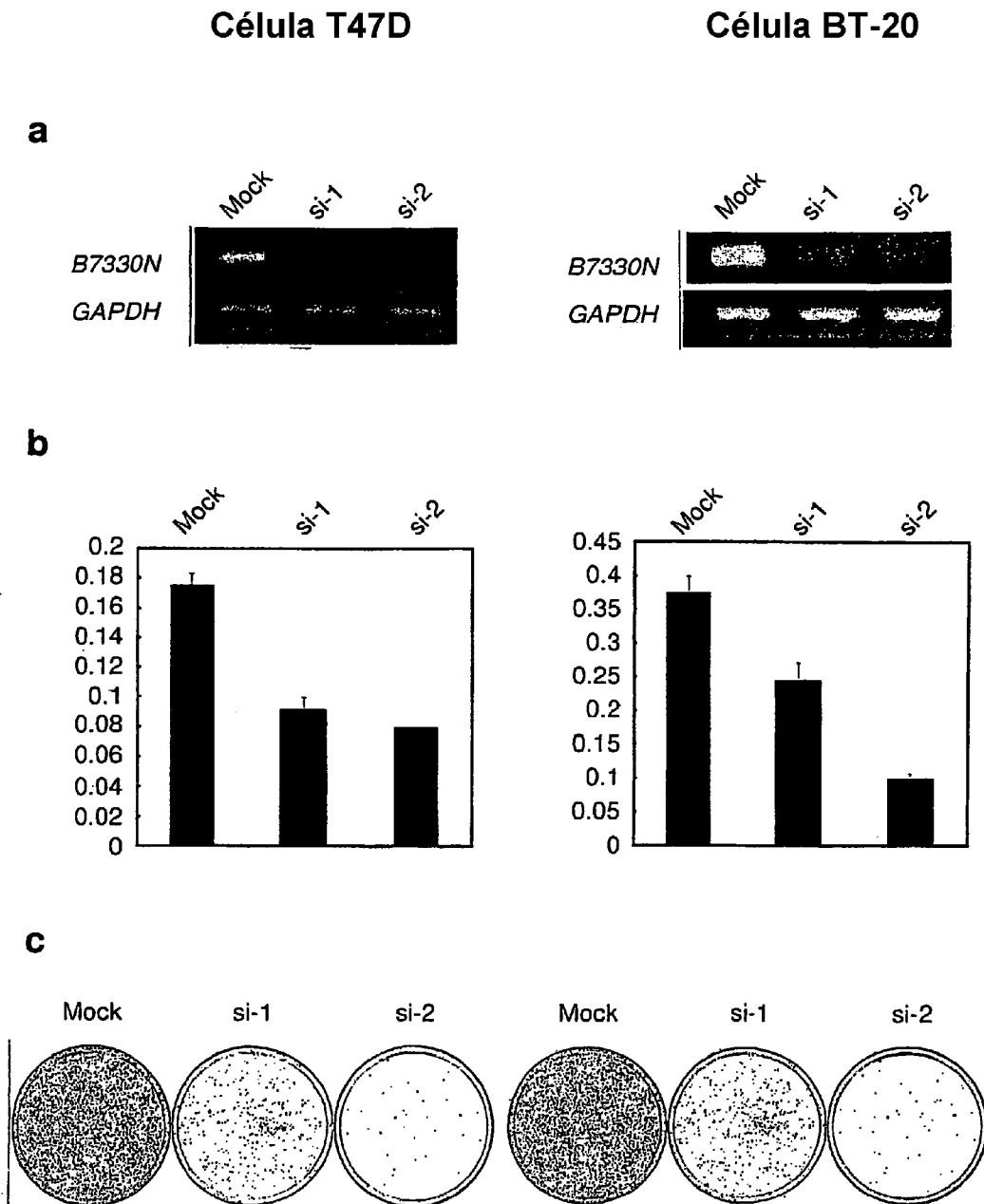
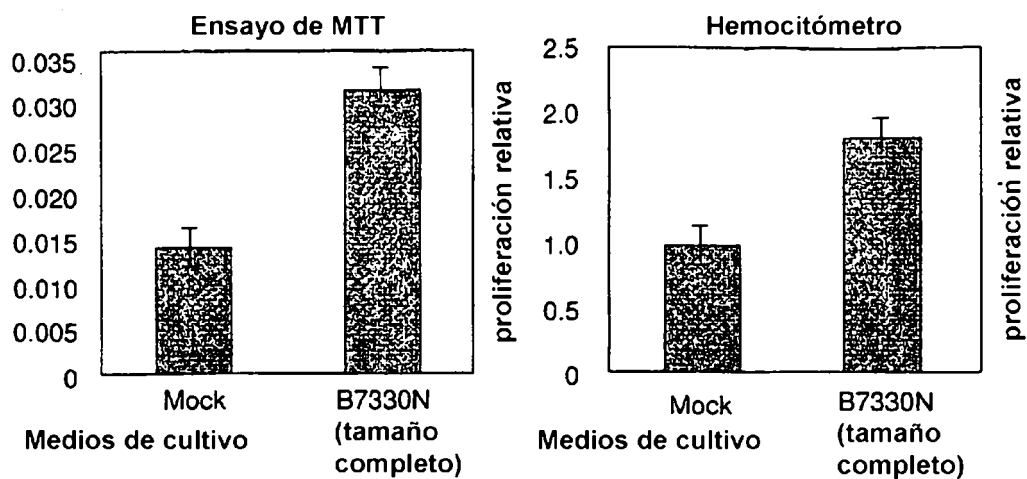


Fig. 5

a



b

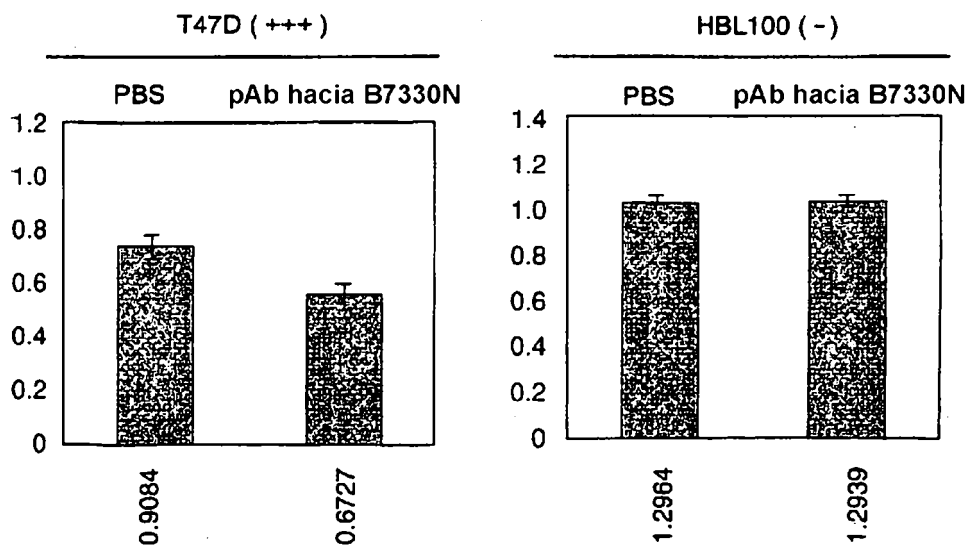


Fig. 6

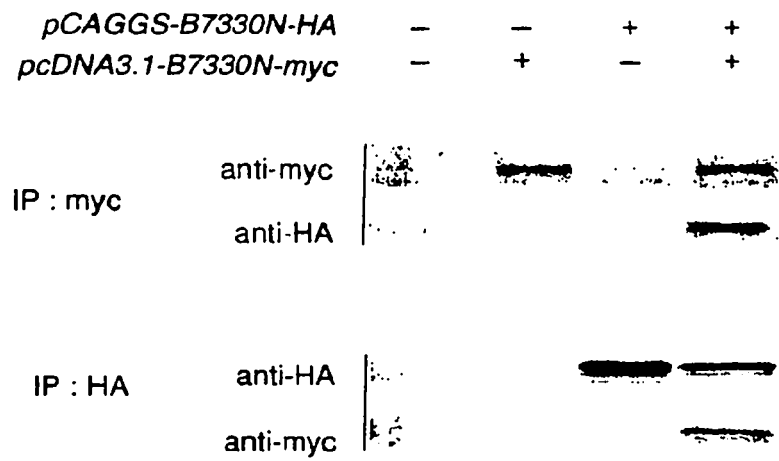


Fig. 7

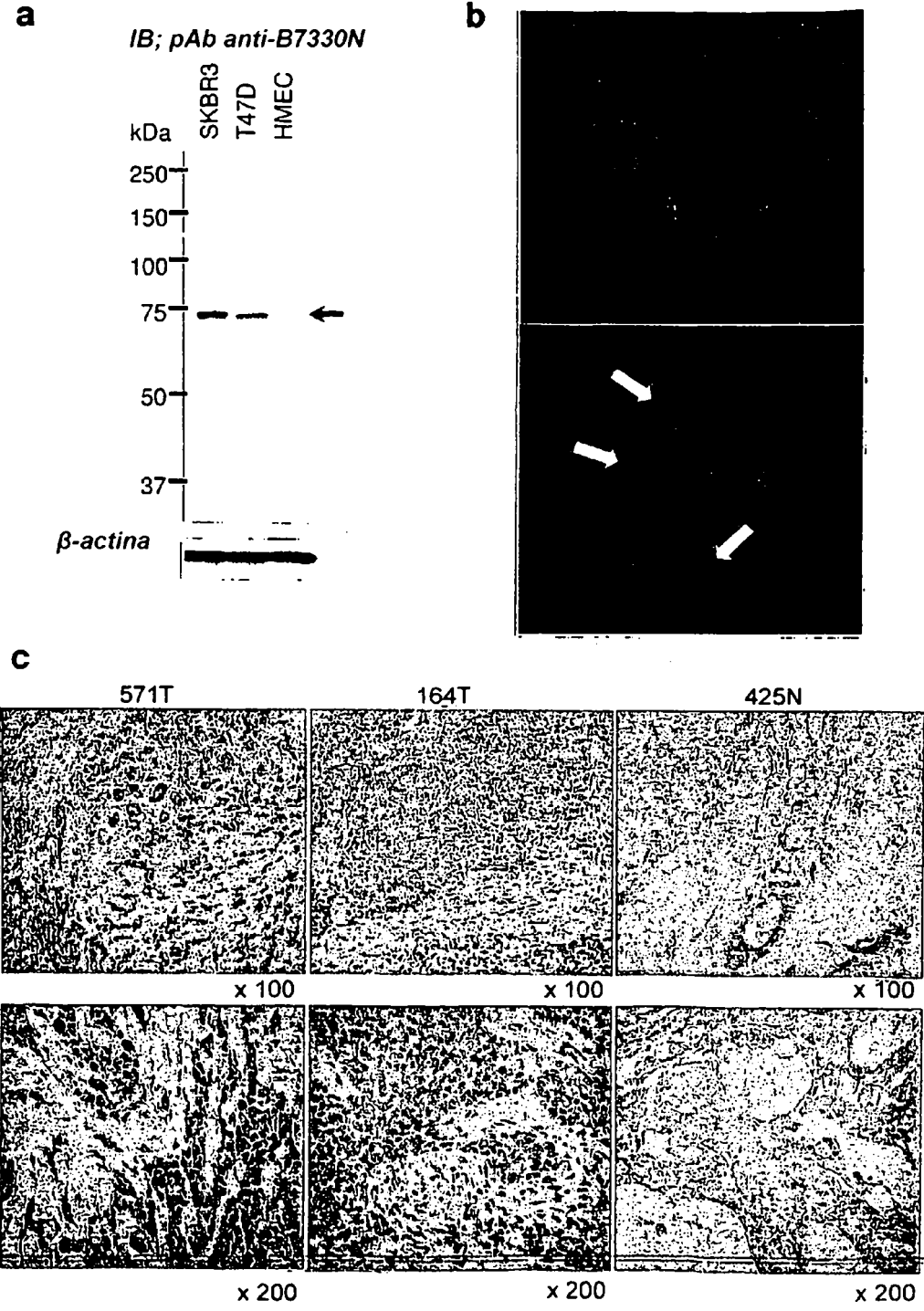


Fig. 7

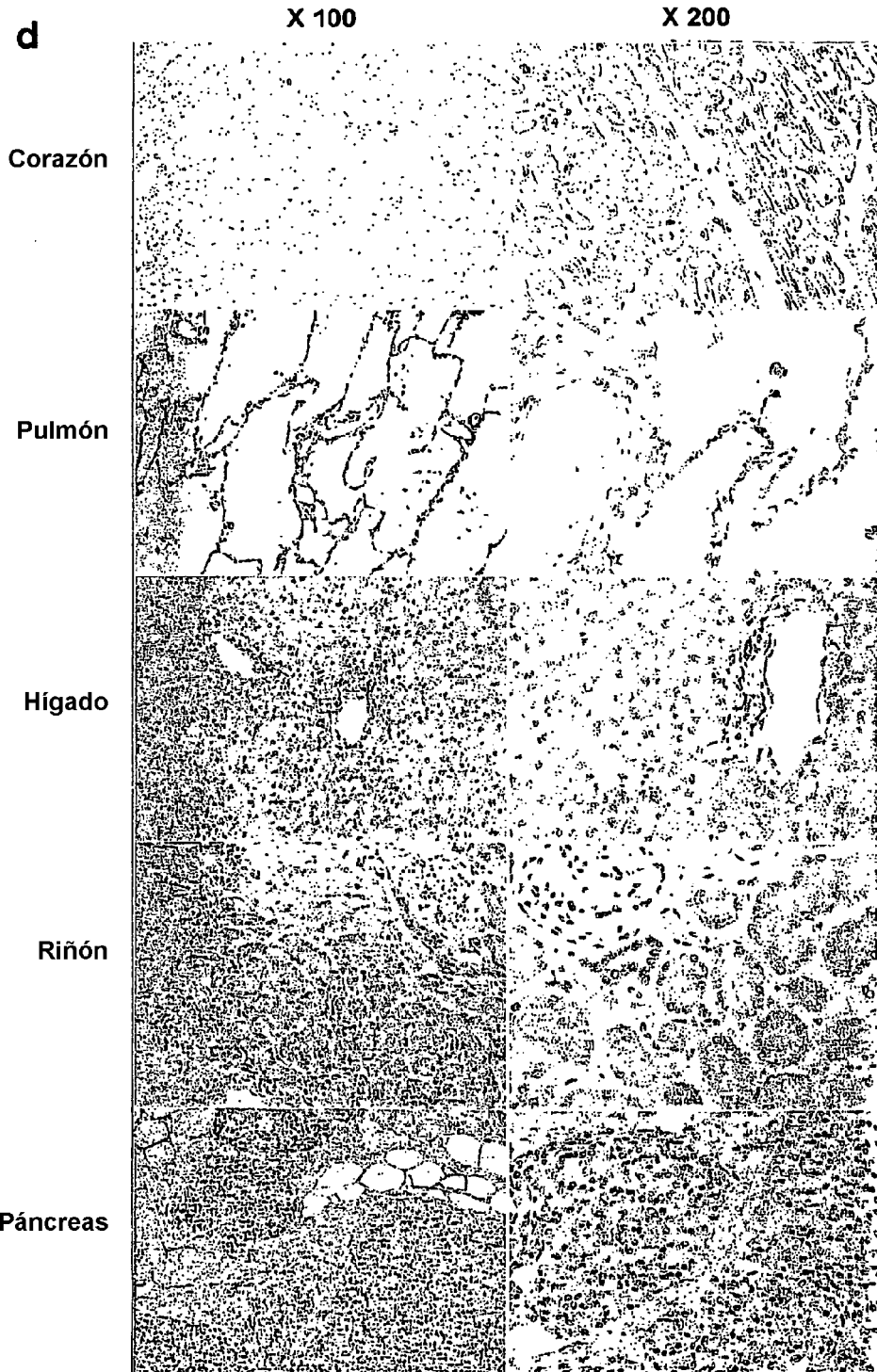
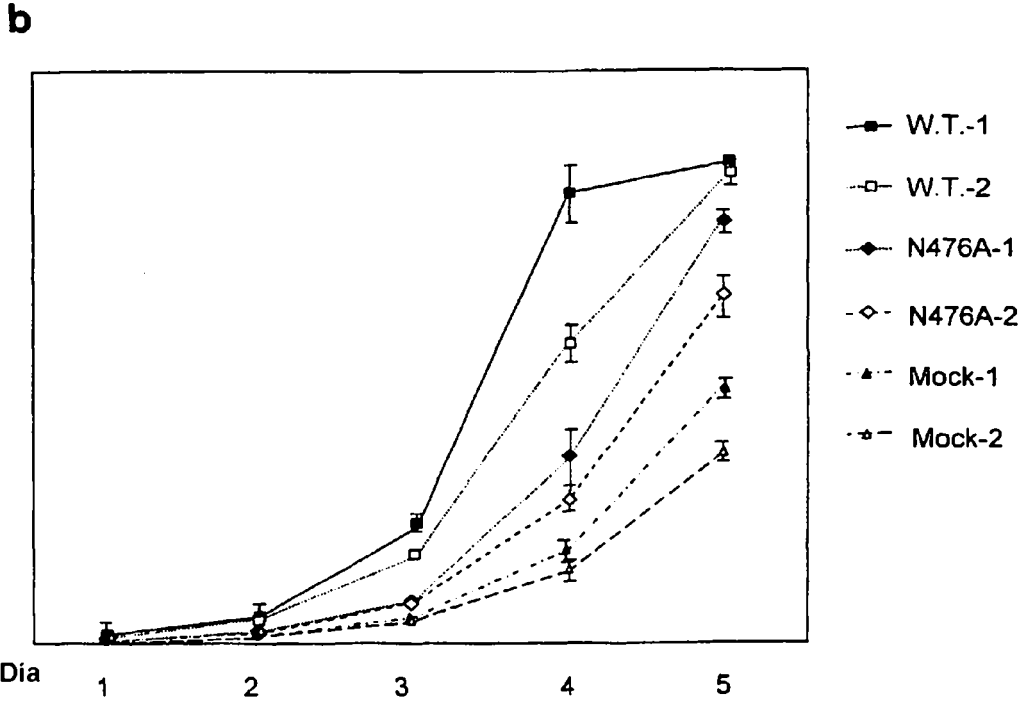
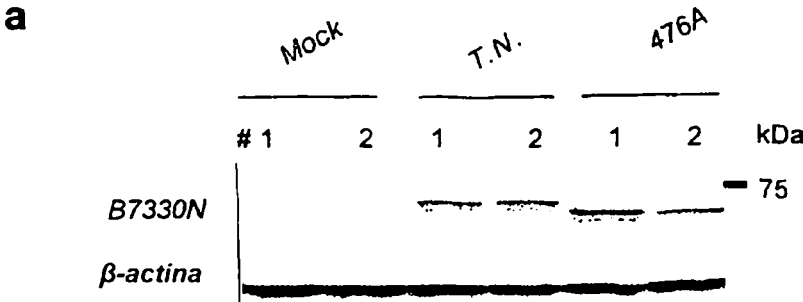


Fig. 8



ES 2 364 078 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. UNIVERSIDAD DE TOKIO

5 <120> GEN Y POLIPÉPTIDO RELACIONADOS CON EL CÁNCER DE MAMA

<130> ONC-A0514P

10 <150> 60/703.658

<151> 29-07-2005

15 <160> 27

<170> PatentIn version 3.3

20 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para RT-PCR

30 <400> 1

cgaccacttt gtcaagctca

20

35 <210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para RT-PCR

45 <400> 2

ggttgagcac aggtacttt att

23

50 <210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

55 <220>

<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para RT-PCR

60 <400> 3

gagtccaggt aagtgaatct gtcc

24

65 <210> 4

<211> 22

<212> ADN

ES 2 364 078 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para RT-PCR	
	<400> 4	
10	atttcaccg agacctctca tc	22
	<210> 5	
	<211> 25	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para RT-PCR	
	<400> 5	
25	cggaattcat gaggctcctc cgcag	25
	<210> 6	
	<211> 30	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para RT-PCR	
	<400> 6	
40	ccgctcgagg acaaagagcc acaactgatg	30
	<210> 7	
	<211> 35	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para PCR	
	<400> 7	
55	acaactgcac tgtcacgcct tttcctggta cctgc	35
	<210> 8	
	<211> 35	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para PCR	

ES 2 364 078 T3

	<400> 8	
	gcaggtacca ggaaaaggcg tgacagtgca gttgt	35
5	<210> 9	
	<211> 29	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para PCR	
15	<400> 9	
	catggccccc tgcgcaccca gtgaccccc	29
20	<210> 10	
	<211> 29	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para PCR	
30	<400> 10	
	gggggtcact gggcgcgag ggggccatg	29
35	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para RT-PCR	
45	<400> 11	
	atggaatcc catcaccatc t	21
50	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para RT-PCR	
60	<400> 12	
	ggatgaaca taccccatca	20
65	<210> 13	
	<211> 19	

ES 2 364 078 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente para RT-PCR	
	<400> 13	
10	atgacactag tgccttgg	19
	<210> 14	
15	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la construcción de un vector de expresión de siARN	
	<400> 14	
25	caccgtgtct tcaagctga agacta	26
	<210> 15	
30	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la construcción de un vector de expresión de siARN	
	<400> 15	
40	aaaatagtct tcaagctga agacac	26
	<210> 16	
45	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la construcción de un vector de expresión de siARN	
	<400> 16	
55	caccgcactg ttccaatgcc ttttcaaga gaaaaggcat tgaacagtg c	51
	<210> 17	
60	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> Un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la construcción de un vector de expresión de siARN	

ES 2 364 078 T3

	<400> 17	
	aaaagcactg ttcaatgcc tttctcttg aaaaaggcat tgaacactg c	51
5	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia objetivo para siARN	
15	<400> 18	
	gcactgttc aatgcctt	19
20	<210> 19	
	<211> 47	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> diseño de horquilla de siARN	
30	<400> 19	
	gcactgttc aatgccttt tcaagagaaa aggcattgaa acagtgc	47
35	<210> 20	
	<211> 51	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> Un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la construcción de un vector de expresión de siARN	
	<400> 20	
	caccgagaaa tcctcggcg acattcaaga gatgcaccg aaggatttct c	51
50	<210> 21	
	<211> 51	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Un oligonucleótido sintetizado artificialmente para la construcción de un vector de expresión de siARN	
	<400> 21	
	aaaagagaaa tcctcggcg acatctcttg aatgcaccg aaggatttct c	51
65	<210> 22	
	<211> 19	

ES 2 364 078 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> secuencia objetivo para siARN	
	<400> 22	
10	gagaaatcct tcggtgaca	19
	<210> 23	
15	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> diseño de horquilla de siARN	
	<400> 23	
25	gagaaatcct tcggtgacat tcaagagatg tcaccgaagg atttctc	47
	<210>	
30	<211> 4381	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(1866)	
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 364 078 T3

<400> 24

5	atg agg ctc ctc cgc aga cgc cac atg ccc ctg cgc ctg gcc atg gtg	48
	Met Arg Leu Leu Arg Arg Arg His Met Pro Leu Arg Leu Ala Met Val	
	1 5 10 15	
10	ggc tgc gcc ttt gtg ctc ttc ctc ttc ctc ctg cat agg gat gtg agc	96
	Gly Cys Ala Phe Val Leu Phe Leu Phe Leu Leu His Arg Asp Val Ser	
15	20 25 30	
20	agc aga gag gag gcc aca gag aag cgg tgg ctg aag tcc ctg gtg agc	144
	Ser Arg Glu Glu Ala Thr Glu Lys Pro Trp Leu Lys Ser Leu Val Ser	
25	35 40 45	
30	cgg aag gat cac gtc ctg gac ctc atg ctg gag gcc atg aac aac ctt	192
	Arg Lys Asp His Val Leu Asp Leu Met Leu Glu Ala Met Asn Asn Leu	
	50 55 60	
35	aga gat tca atg ccc aag ctc caa atc agg gct cca gaa gcc cag cag	240
	Arg Asp Ser Met Pro Lys Leu Gln Ile Arg Ala Pro Glu Ala Gln Gln	
40	65 70 75 80	
45	act ctg ttc tcc ata aac cag tcc tgc ctc cct ggg ttc tat acc cca	288
	Thr Leu Phe Ser Ile Asn Gln Ser Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Thr Pro	
50	85 90 95	
55	gct gaa ctg aag ccc ttc tgg gaa cgg cca cca cag gac ccc aat gcc	336
	Ala Glu Leu Lys Pro Phe Trp Glu Arg Pro Pro Gln Asp Pro Asn Ala	
	100 105 110	
60	cct ggg gca gat gga aaa gca ttt cag aag agc aag tgg acc ccc ctg	384
65		

ES 2 364 078 T3

Pro Gly Ala Asp Gly Lys Ala Phe Gln Lys Ser Lys Trp Thr Pro Leu
 5 115 120 125

gag acc cag gaa aag gaa gaa ggc tat aag aag cac tgt ttc aat gcc 432
 10 Glu Thr Gln Glu Lys Glu Glu Gly Tyr Lys Lys His Cys Phe Asn Ala
 130 135 140

ttt gcc agc gac cgg atc tcc ctg cag agg tcc ctg ggg cca gac acc 480
 20 Phe Ala Ser Asp Arg Ile Ser Leu Gln Arg Ser Leu Gly Pro Asp Thr
 145 150 155 160

cga cca cct gag tgt gtg gac cag aag ttc cgg cgc tgc ccc cca ctg 528
 25 Arg Pro Pro Glu Cys Val Asp Gln Lys Phe Arg Arg Cys Pro Pro Leu
 165 170 175

gcc acc acc agc gtg atc att gtg ttc cac aac gaa gcc tgg tcc aca 576
 35 Ala Thr Thr Ser Val Ile Ile Val Phe His Asn Glu Ala Trp Ser Thr
 180 185 190

ctg ctg cga aca gtg tac agc gtc cta cac acc acc cct gcc atc ttg 624
 40 Leu Leu Arg Thr Val Tyr Ser Val Leu His Thr Thr Pro Ala Ile Leu
 195 200 205

ctc aag gag atc ata ctg gtg gat gat gcc agc aca gag gag cac cta 672
 50 Leu Lys Glu Ile Ile Leu Val Asp Asp Ala Ser Thr Glu Glu His Leu
 210 215 220

55

60

65

ES 2 364 078 T3

aag gag aag ctg gag cag tac gtg aag cag ctg cag gtg gtg agg gtg 720
 5 Lys Glu Lys Leu Glu Gln Tyr Val Lys Gln Leu Gln Val Val Arg Val
 225 230 235 240

gtg cgg cag gag gag cgg aag ggg ctg atc acc gcc cgg ctg ctg ggg 768
 10 Val Arg Gln Glu Glu Arg Lys Gly Leu Ile Thr Ala Arg Leu Leu Gly
 15 245 250 255

gcc agc gtg gca cag gcg gag gtg ctc acg ttc ctg gat gcc cac tgt 816
 20 Ala Ser Val Ala Gln Ala Glu Val Leu Thr Phe Leu Asp Ala His Cys
 25 260 265 270

gag tgc ttc cac ggc tgg ctg gag ccc ctc ctg gct cga atc gct gag 864
 30 Glu Cys Phe His Gly Trp Leu Glu Pro Leu Leu Ala Arg Ile Ala Glu
 275 280 285

gac aag aca gtg gtg gtg agc cca gac atc gtc acc atc gac ctt aat 912
 35 Asp Lys Thr Val Val Val Ser Pro Asp Ile Val Thr Ile Asp Leu Asn
 40 290 295 300

act ttt gag ttc gcc aag ccc gtc cag agg ggc aga gtc cat agc cga 960
 45 Thr Phe Glu Phe Ala Lys Pro Val Gln Arg Gly Arg Val His Ser Arg
 305 310 315 320

ggc aac ttt gac tgg agc ctg acc ttc ggc tgg gaa aca ctt cct cca 1008
 50
 55
 60
 65

ES 2 364 078 T3

Gly Asn Phe Asp Trp Ser Leu Thr Phe Gly Trp Glu Thr Leu Pro Pro
 5 325 330 335

cat gag aag cag agg cgc aag gat gaa acc tac ccc atc aaa tcc ccg 1056
 10 His Glu Lys Gln Arg Arg Lys Asp Glu Thr Tyr Pro Ile Lys Ser Pro
 340 345 350

acg ttt gct ggt ggc ctc ttc tcc atc tcc aag tcc tac ttt gag cac 1104
 15 Thr Phe Ala Gly Gly Leu Phe Ser Ile Ser Lys Ser Tyr Phe Glu His
 20 355 360 365

atc ggt acc tat gat aat cag atg gag atc tgg gga ggg gag aac gtg 1152
 25 Ile Gly Thr Tyr Asp Asn Gln Met Glu Ile Trp Gly Gly Glu Asn Val
 30 370 375 380

gaa atg tcc ttc cgg gtg tgg cag tgt ggg ggc cag ctg gag atc atc 1200
 35 Glu Met Ser Phe Arg Val Trp Gln Cys Gly Gly Gln Leu Glu Ile Ile
 385 390 395 400

ccc tgc tct gtc gta ggc cat gtg ttc cgg acc aag agc ccc cac acc 1248
 40 Pro Cys Ser Val Val Gly His Val Phe Arg Thr Lys Ser Pro His Thr
 45 405 410 415

ttc ccc aag ggc act agt gtc att gct cgc aat caa gtg cgc ctg gca 1296
 50 Phe Pro Lys Gly Thr Ser Val Ile Ala Arg Asn Gln Val Arg Leu Ala
 55 420 425 430

ES 2 364 078 T3

gag gtc tgg atg gac agc tac aag aag att ttc tat agg aga aat ctg 1344
 5 Glu Val Trp Met Asp Ser Tyr Lys Lys Ile Phe Tyr Arg Arg Asn Leu
 435 440 445

10 cag gca gca aag atg gcc caa gag aaa tcc ttc ggt gac att tgc gaa 1392
 Gln Ala Ala Lys Met Ala Gln Glu Lys Ser Phe Gly Asp Ile Ser Glu
 15 450 455 460

20 cga ctg cag ctg agg gaa caa ctg cac tgt cac aac ttt tcc tgg tac 1440
 Arg Leu Gln Leu Arg Glu Gln Leu His Cys His Asn Phe Ser Trp Tyr
 465 470 475 480

25 ctg cac aat gtc tac cca gag atg ttt gtt cct gac ctg acg ccc acc 1488
 Leu His Asn Val Tyr Pro Glu Met Phe Val Pro Asp Leu Thr Pro Thr
 30 485 490 495

35 ttc tat ggt gcc atc aag aac ctc ggc acc aac caa tgc ctg gat gtg 1536
 Phe Tyr Gly Ala Ile Lys Asn Leu Gly Thr Asn Gln Cys Leu Asp Val
 40 500 505 510

45 ggt gag aac aac cgc ggg ggg aag ccc ctc atc atg tac tcc tgc cac 1584
 Gly Glu Asn Asn Arg Gly Gly Lys Pro Leu Ile Met Tyr Ser Cys His
 515 520 525

50 ggc ctt ggc ggc aac cag tac ttt gag tac aca act cag agg gac ctt 1632

55
 60
 65

ES 2 364 078 T3

Gly Leu Gly Gly Asn Gln Tyr Phe Glu Tyr Thr Thr Gln Arg Asp Leu
 5 530 535 540

cgc cac aac atc gca aag cag ctg tgt cta cat gtc agc aag ggt gct 1680
 10 Arg His Asn Ile Ala Lys Gln Leu Cys Leu His Val Ser Lys Gly Ala
 545 550 555 560

ctg ggc ctt ggg agc tgt cac ttc act ggc aag aat agc cag gtc ccc 1728
 15 Leu Gly Leu Gly Ser Cys His Phe Thr Gly Lys Asn Ser Gln Val Pro
 20 565 570 575

aag gac gag gaa tgg gaa ttg gcc cag gat cag ctc atc agg aac tca 1776
 25 Lys Asp Glu Glu Trp Glu Leu Ala Gln Asp Gln Leu Ile Arg Asn Ser
 30 580 585 590

gga tct ggt acc tgc ctg aca tcc cag gac aaa aag cca gcc atg gcc 1824
 35 Gly Ser Gly Thr Cys Leu Thr Ser Gln Asp Lys Lys Pro Ala Met Ala
 40 595 600 605

ccc tgc aat ccc agt gac ccc cat cag ttg tgg ctc ttt gtc 1866
 45 Pro Cys Asn Pro Ser Asp Pro His Gln Leu Trp Leu Phe Val
 610 615 620

taggaccag atcacccca gagagagccc ccacaagctc ctcaggaaac aggattgctg 1926
 50

atgtctggga acctgatcac cagcttcctt ggaggccgta aagatggatt tctaaacca 1986
 55

60

65

ES 2 364 078 T3

	ctgggtggca aggcaggacc ttctaatacc ttgcaacaac atigggccca ttttctttcc	2046
5	ttcacaccga tgggaagagac cattaggaca tatattttagc ctagegtttt cctgtttctag	2106
10	aaatagaggc tcccaaagta ggggaaggcag ctgggggagg gttcaggcca gcaatgctga	2166
15	gttcaagaaa agtacttcag gctgggcaca gtggtcatg cctgaaatcc tagcactttg	2226
20	ggaagacaat gtgggagaat ggcttgagcc caggagtcca agaccggcct gagcaacata	2286
25	gtgaggatcc catctctacg cccaccclcc ccccgcaaaa aaaaaaagc tgggtatggt	2346
30	ggcttatgcc tgtagtcgca gctactcaga aggcigaggt gggaggatig ctigtccccc	2406
35	ggaggttgaa gctacagtga gccttgattg tgctactgca ctccagcctg ggcaacaggt	2466
40	aagactctgt ctcaaaaaaa aacaaaaaag aagaagaaaa gtacttctac agccatgtcc	2526
45	tattccitga tcatccaaag cacctgcaga gtccagtga atgatatt ctggctgggc	2586
50	acagtggctc acacctgtaa tcctagcact ttgggaggcc aaggcagggt gatcacctga	2646
55	ggtcagaagt ttgaaaccag ccitggactac atggtgaaac tccatctca ctaaaagtac	2706
60	aaaaattagc tgggcatgat ggcacgcacc tgcagtccca gctactlggg aggctgaggc	2766
65		

ES 2 364 078 T3

5 aggagaatca ctcgaacca ggaggcagag gttgcagtga gccaaagacag caccattgca 2826
 10 ccccagcctg agcaacaaga gcgaaactcc atctcaggaa aaaaaaaaaa aaaaaaagta 2886
 15 tattctaaaca gacagatcag aggtctaaga gatcctccct tgctattatt acctgaagtc 2946
 20 tgtagaactg titacagata tctccttgac aggtgtcctt tatcttactt tatctgtaca 3006
 25 gtaatcctgt gagaaagaca ggacagaaac cactgtgcct attttacaga tacgaaaact 3066
 30 gagacacagg taaaggggct tgtcigtagt cccatagcta gcagatggct ggagccaaga 3126
 35 ctgaggctcg ticttcautg ctgagccagg gctccttccg ctgcaccaca agaacgctag 3186
 40 accactgcc accagccttc tcattccctc ttctctcatt ctaatcattt ctagctgget 3246
 45 ggcctccaca gagcatagga aaacagccag ggccggggcac ggtggctcat gcctgtaatc 3306
 50 tcaacactct gggaggccga gccgggtgga taacctgagg tcaggaattc gagaccagcc 3366
 55 tggccaacat ggtaaaacc cctctctact aaaaatataa aaattagcca ggcattggtgg 3426
 60 cgcacaccig taatcccagc tactcaagag gctgaggcag gagaattgct taaatctggg 3486
 65 aggcggaagt tgcagtgagc caagatcgcg ccactgaact ccagcctagg caacaagagc 3546

ES 2 364 078 T3

	aaaactccat ctccaaaaaa aagaaaggaa aaacagggcc aggtagccat tgtggagaga	3606
5	gcacacttag gaatcctggg atgttagtgt taaaagaaag ctctgggagc cagtgattct	3666
10	caggtttgtc ccagaaccct tttttctaag cccatataa aaggtagatt aaaaaaaca	3726
15	agtagcatga gtgaaattga gagagggaca ggtaatgcct tccagcccct aacttctaac	3786
20	aatctggaag cacaacgtga aatcacgta gcccaaccct atcattttca tattatgaaa	3846
25	ctgagtcag gtaagtgaat ctglccaagg tcaccagca aggtatcagt agccctgagg	3906
30	gtaaggactc tgalaaggct cgggagggtc ctggaaagcc tgaggcggca ggaagagtgt	3966
35	gcagagttga gcgtgtctgg aaggctgac cactgctggg cccacatcaa agcccccag	4026
40	gggagcagac ccgactgcac atggctcttt tgctggaaga agagcatggc tgcgcagagg	4086
45	actaaaatt catctgggaa ggcttcttt gactgtcagt agcaggatgt caccagatga	4146
50	gggtgctatg ggaccacagc tgtctttgtt cccattgcaa ctcaaccctg cgggaggccg	4206
55	cctacatccc tgagagcctt ctggagccta cagaggagac attggccagc caaaaggaaa	4266
60	ggagtggcca gggtagacc tggagtaggg aagggaaaaa gttcccggaa agaagagaat	4326
65	tggatgagag gtctcagtgg aaataaaggt ttcttgcat tggtaagga aactc	4381
	<210> 25	
	<211> 622	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 364 078 T3

<400> 25

5 Met Arg Leu Leu Arg Arg Arg His Met Pro Leu Arg Leu Ala Met Val
1 5 10 15

10

15 Gly Cys Ala Phe Val Leu Phe Leu Phe Leu Leu His Arg Asp Val Ser
20 25 30

20

25 Ser Arg Glu Glu Ala Thr Glu Lys Pro Trp Leu Lys Ser Leu Val Ser
35 40 45

30 Arg Lys Asp His Val Leu Asp Leu Met Leu Glu Ala Met Asn Asn Leu
50 55 60

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 364 078 T3

5	Arg Asp Ser Met Pro Lys Leu Gln Ile Arg Ala Pro Glu Ala Gln Gln	65	70	75	80
10	Thr Leu Phe Ser Ile Asn Gln Ser Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Thr Pro		85	90	95
15					
20	Ala Glu Leu Lys Pro Phe Trp Glu Arg Pro Pro Gln Asp Pro Asn Ala		100	105	110
25					
30	Pro Gly Ala Asp Gly Lys Ala Phe Gln Lys Ser Lys Trp Thr Pro Leu		115	120	125
35					
40	Glu Thr Gln Glu Lys Glu Glu Gly Tyr Lys Lys His Cys Phe Asn Ala		130	135	140
45					
50	Phe Ala Ser Asp Arg Ile Ser Leu Gln Arg Ser Leu Gly Pro Asp Thr		145	150	155
55					
60	Arg Pro Pro Glu Cys Val Asp Gln Lys Phe Arg Arg Cys Pro Pro Leu				
65					

ES 2 364 078 T3

5
165 170 175
10 Ala Thr Thr Ser Val Ile Ile Val Phe His Asn Glu Ala Trp Ser Thr
180 185 190
15
20 Leu Leu Arg Thr Val Tyr Ser Val Leu His Thr Thr Pro Ala Ile Leu
195 200 205
25
30 Leu Lys Glu Ile Ile Leu Val Asp Asp Ala Ser Thr Glu Glu His Leu
210 215 220
35
40 Lys Glu Lys Leu Glu Gln Tyr Val Lys Gln Leu Gln Val Val Arg Val
225 230 235 240
45
50 Val Arg Gln Glu Glu Arg Lys Gly Leu Ile Thr Ala Arg Leu Leu Gly
245 250 255
55
60 Ala Ser Val Ala Gln Ala Glu Val Leu Thr Phe Leu Asp Ala His Cys
260 265 270
65

ES 2 364 078 T3

5 Glu Cys Phe His Gly Trp Leu Glu Pro Leu Leu Ala Arg Ile Ala Glu
 275 280 285

10 Asp Lys Thr Val Val Val Ser Pro Asp Ile Val Thr Ile Asp Leu Asn
 290 295 300

20 Thr Phe Glu Phe Ala Lys Pro Val Gln Arg Gly Arg Val His Ser Arg
 305 310 315 320

30 Gly Asn Phe Asp Trp Ser Leu Thr Phe Gly Trp Glu Thr Leu Pro Pro
 325 330 335

40 His Glu Lys Gln Arg Arg Lys Asp Glu Thr Tyr Pro Ile Lys Ser Pro
 340 345 350

50 Thr Phe Ala Gly Gly Leu Phe Ser Ile Ser Lys Ser Tyr Phe Glu His
 355 360 365

65 Ile Gly Thr Tyr Asp Asn Gln Met Glu Ile Trp Gly Gly Glu Asn Val

ES 2 364 078 T3

	370		375		380														
5																			
10	Glu	Met	Ser	Phe	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Gly	Gly	Gln	Leu	Glu	Ile	Ile			
	385					390					395					400			
15																			
20	Pro	Cys	Ser	Val	Val	Gly	His	Val	Phe	Arg	Thr	Lys	Ser	Pro	His	Thr			
					405					410						415			
25																			
30	Phe	Pro	Lys	Gly	Thr	Ser	Val	Ile	Ala	Arg	Asn	Gln	Val	Arg	Leu	Ala			
				420					425					430					
35																			
40	Glu	Val	Trp	Met	Asp	Ser	Tyr	Lys	Lys	Ile	Phe	Tyr	Arg	Arg	Asn	Leu			
			435						440					445					
45																			
50	Gln	Ala	Ala	Lys	Met	Ala	Gln	Glu	Lys	Ser	Phe	Gly	Asp	Ile	Ser	Glu			
		450					455						460						
55																			
60	Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	His	Cys	His	Asn	Phe	Ser	Trp	Tyr			
	465						470					475				480			
65																			

ES 2 364 078 T3

Leu His Asn Val Tyr Pro Glu Met Phe Val Pro Asp Leu Thr Pro Thr

5 485 490 495

10

Phe Tyr Gly Ala Ile Lys Asn Leu Gly Thr Asn Gln Cys Leu Asp Val

15 500 505 510

20

Gly Glu Asn Asn Arg Gly Gly Lys Pro Leu Ile Met Tyr Ser Cys His

515 520 525

25

Gly Leu Gly Gly Asn Gln Tyr Phe Glu Tyr Thr Thr Gln Arg Asp Leu

530 535 540

35

Arg His Asn Ile Ala Lys Gln Leu Cys Leu His Val Ser Lys Gly Ala

40 545 550 555 560

45

Leu Gly Leu Gly Ser Cys His Phe Thr Gly Lys Asn Ser Gln Val Pro

50 565 570 575

55

Lys Asp Glu Glu Trp Glu Leu Ala Gln Asp Gln Leu Ile Arg Asn Ser

60

65

ES 2 364 078 T3

580

585

590

5

Gly Ser Gly Thr Cys Leu Thr Ser Gln Asp Lys Lys Pro Ala Met Ala

10

595

600

605

15

Pro Cys Asn Pro Ser Asp Pro His Gln Leu Trp Leu Phe Val

20

610

615

620

25

<210> 26

<211> 4556

<212> ADN

30 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

35 <222> (207)..(2072)

<400> 26

40

aacaggccct gctgtgaggg accacgaggc agtgccagga tgaaagagtt ggagtaacct 60

45

aggtgattct gagtgaatca gtcaggagge cttcctggag ggggctgagg ccccagcttg 120

50

55

60

65

ES 2 364 078 T3

180 tggccaccac aacgtatcaa gctatctcca gggttgggct caggactcag agctgacgca
 5
 233 gctgggggtgc cccctgggttc tggagg atg agg ctc ctc cgc aga cgc cac atg
 Met Arg Leu Leu Arg Arg Arg His Met
 10 1 5
 281 ccc ctg cgc ctg gcc atg gtg ggc tgc gcc ttt gtg ctc ttc ctc ttc
 Pro Leu Arg Leu Ala Met Val Gly Cys Ala Phe Val Leu Phe Leu Phe
 10 15 20 25
 329 ctc ctg cat agg gat gtg agc agc aga gag gag gcc aca gag aag ccg
 25 Leu Leu His Arg Asp Val Ser Ser Arg Glu Glu Ala Thr Glu Lys Pro
 30 35 40
 377 tgg ctg aag tcc ctg gtg agc cgg aag gat cac gtc ctg gac ctc atg
 Trp Leu Lys Ser Leu Val Ser Arg Lys Asp His Val Leu Asp Leu Met
 35 45 50 55
 425 ctg gag gcc atg aac aac ctt aga gat tca atg ccc aag ctc caa atc
 Leu Glu Ala Met Asn Asn Leu Arg Asp Ser Met Pro Lys Leu Gln Ile
 45 60 65 70
 473 agg gct cca gaa gcc cag cag act ctg ttc tcc ata aac cag tcc tgc
 50 Arg Ala Pro Glu Ala Gln Gln Thr Leu Phe Ser Ile Asn Gln Ser Cys
 55 75 80 85
 60
 65

ES 2 364 078 T3

5 ctc cct ggg ttc tat acc cca gct gaa ctg aag ccc ttc tgg gaa cgg 521
 Leu Pro Gly Phe Tyr Thr Pro Ala Glu Leu Lys Pro Phe Trp Glu Arg
 90 95 100 105

10 cca cca cag gac ccc aat gcc cct ggg gca gat gga aaa gca ttt cag 569
 Pro Pro Gln Asp Pro Asn Ala Pro Gly Ala Asp Gly Lys Ala Phe Gln
 110 115 120

20 aag agc aag tgg acc ccc ctg gag acc cag gaa aag gaa gaa ggc tat 617
 Lys Ser Lys Trp Thr Pro Leu Glu Thr Gln Glu Lys Glu Glu Gly Tyr
 125 130 135

25 aag aag cac tgt ttc aat gcc ttt gcc agc gac cgg atc tcc ctg cag 665
 Lys Lys His Cys Phe Asn Ala Phe Ala Ser Asp Arg Ile Ser Leu Gln
 140 145 150

35 agg tcc ctg ggg cca gac acc cga cca cct gag tgt gtg gac cag aag 713
 Arg Ser Leu Gly Pro Asp Thr Arg Pro Pro Glu Cys Val Asp Gln Lys
 155 160 165

45 ttc egg cgc tgc ccc cca ctg gcc acc acc agc gtg atc att gtg ttc 761
 Phe Arg Arg Cys Pro Pro Leu Ala Thr Thr Ser Val Ile Ile Val Phe
 170 175 180 185

50 cac aac gaa gcc tgg tcc aca ctg ctg cga aca gtg tac agc gtc cta 809
 His Asn Glu Ala Trp Ser Thr Leu Leu Arg Thr Val Tyr Ser Val Leu

ES 2 364 078 T3

	190	195	200	
5	cac acc acc cct gcc atc ttg ctc aag gag atc ata ctg gtg gat gat			857
	His Thr Thr Pro Ala Ile Leu Leu Lys Glu Ile Ile Leu Val Asp Asp			
10	205	210	215	
15	gcc agc aca gag gag cac cta aag gag aag ctg gag cag tac gtg aag			905
	Ala Ser Thr Glu Glu His Leu Lys Glu Lys Leu Glu Gln Tyr Val Lys			
	220	225	230	
20	cag ctg cag gtg gtg agg gtg gtg cgg cag gag gag cgg aag ggg ttg			953
	Gln Leu Gln Val Val Arg Val Val Arg Gln Glu Glu Arg Lys Gly Leu			
25	235	240	245	
30	atc acc gcc cgg ctg ctg ggg gcc agc gtg gca cag gcg gag gtg ctc			1001
	Ile Thr Ala Arg Leu Leu Gly Ala Ser Val Ala Gln Ala Glu Val Leu			
35	250	255	260	265
40	acg ttc ctg gat gcc cac tgt gag tgc ttc cac ggc tgg ctg gag ccc			1049
	Thr Phe Leu Asp Ala His Cys Glu Cys Phe His Gly Trp Leu Glu Pro			
	270	275	280	
45	ctc ctg gct cga atc gct gag gac aag aca gtg gtg gtg agc cca gac			1097
	Leu Leu Ala Arg Ile Ala Glu Asp Lys Thr Val Val Val Ser Pro Asp			
50	285	290	295	
55				
60				
65				

ES 2 364 078 T3

5 atc gtc acc atc gac ctt aat act ttt gag ttc gcc aag ccc gtc cag 1145
 Ile Val Thr Ile Asp Leu Asn Thr Phe Glu Phe Ala Lys Pro Val Gln
 300 305 310

10 agg ggc aga gtc cat agc cga ggc aac ttt gac tgg agc ctg acc ttc 1193
 Arg Gly Arg Val His Ser Arg Gly Asn Phe Asp Trp Ser Leu Thr Phe
 315 320 325

20 ggc tgg gaa aca ctt cct cca cat gag aag cag agg cgc aag gat gaa 1241
 Gly Trp Glu Thr Leu Pro Pro His Glu Lys Gln Arg Arg Lys Asp Glu
 330 335 340 345

30 aca tac ccc atc aaa tcc ccg acg ttt gct ggt ggc ctc ttc tcc atc 1289
 Thr Tyr Pro Ile Lys Ser Pro Thr Phe Ala Gly Gly Leu Phe Ser Ile
 350 355 360

40 ccc aag tcc tac ttt gag cac atc ggt acc tat gat aat cag atg gag 1337
 Pro Lys Ser Tyr Phe Glu His Ile Gly Thr Tyr Asp Asn Gln Met Glu
 365 370 375

50 atc tgg gga ggg gag aac gtg gaa atg tcc ttc cgg gtg tgg cag tgt 1385
 Ile Trp Gly Gly Glu Asn Val Glu Met Ser Phe Arg Val Trp Gln Cys
 380 385 390

60 ggg ggc cag ctg gag atc atc ccc tgc tct gtc gta ggc cat gtg ttc 1433
 Gly Gly Gln Leu Glu Ile Ile Pro Cys Ser Val Val Gly His Val Phe
 65

ES 2 364 078 T3

	395	400	405	
5	cgg acc aag agc ccc cac acc ttc ccc aag ggc act agt gtc att gct			1481
	Arg Thr Lys Ser Pro His Thr Phe Pro Lys Gly Thr Ser Val Ile Ala			
10	410	415	420	425
15	cgc aat caa gtg cgc ctg gca gag gtc tgg atg gac agc tac aag aag			1529
	Arg Asn Gln Val Arg Leu Ala Glu Val Trp Met Asp Ser Tyr Lys Lys			
20		430	435	440
25	att ttc tat agg aga aat ctg cag gca gca aag atg gcc caa gag aaa			1577
	Ile Phe Tyr Arg Arg Asn Leu Gln Ala Ala Lys Met Ala Gln Glu Lys			
30		445	450	455
35	tcc ttc ggt gac att tcg gaa cga ctg cag ctg agg gaa caa ctg cac			1625
	Ser Phe Gly Asp Ile Ser Glu Arg Leu Gln Leu Arg Glu Gln Leu His			
40		460	465	470
45	tgt cac aac ttt tcc tgg tac ctg cac aat gtc tac cca gag atg ttt			1673
	Cys His Asn Phe Ser Trp Tyr Leu His Asn Val Tyr Pro Glu Met Phe			
50		475	480	485
55	gtt cct gac ctg acg ccc acc ttc tat ggt gcc atc aag aac ctc ggc			1721
	Val Pro Asp Leu Thr Pro Thr Phe Tyr Gly Ala Ile Lys Asn Leu Gly			
60		490	495	500
65				505

ES 2 364 078 T3

acc aac caa tgc ctg gat gtg ggt gag aac aac cgc ggg ggg aag ccc 1769
 5 Thr Asn Gln Cys Leu Asp Val Gly Glu Asn Asn Arg Gly Gly Lys Pro
 510 515 520

ctc atc atg tac tcc tgc cac ggc ctt ggc ggc aac cag tac ttt gag 1817
 10 Leu Ile Met Tyr Ser Cys His Gly Leu Gly Gly Asn Gln Tyr Phe Glu
 15 525 530 535

tac aca act cag agg gac ctt cgc cac aac atc gca aag cag ctg tgt 1865
 20 Tyr Thr Thr Gln Arg Asp Leu Arg His Asn Ile Ala Lys Gln Leu Cys
 540 545 550

cta cat gtc agc aag ggt gct ctg ggc ctt ggg agc tgt cac ttc act 1913
 30 Leu His Val Ser Lys Gly Ala Leu Gly Leu Gly Ser Cys His Phe Thr
 555 560 565

ggc aag aat agc cag gtc ccc aag gac gag gaa tgg gaa ttg gcc cag 1961
 35 Gly Lys Asn Ser Gln Val Pro Lys Asp Glu Glu Trp Glu Leu Ala Gln
 40 570 575 580 585

gat cag ctc atc agg aac tca gga tct ggt acc tgc ctg aca tcc cag 2009
 45 Asp Gln Leu Ile Arg Asn Ser Gly Ser Gly Thr Cys Leu Thr Ser Gln
 590 595 600

gac aaa aag cca gcc atg gcc ccc tgc aat ccc agt gac ccc cat cag 2057
 55 Asp Lys Lys Pro Ala Met Ala Pro Cys Asn Pro Ser Asp Pro His Gln
 60
 65

ES 2 364 078 T3

605

610

615

5

tig tgg ctc ttt gtc taggaccag atcatcccca gagagagccc ccacaagctc 2112

Leu Trp Leu Phe Val

10

620

15

ctcaggaaac aggaitgctg atgtctggga acctgatcac cagcttctct ggaggccgta 2172

20

aagatggatt tctaaaccca ctgggtggca aggcaggacc ttcctaatcc ttgcaacaac 2232

25

attgggcccc tttctttcc ttcacaccga tggagagac callaggaca tatatttagc 2292

30

ctagcgtttt cctgttctag aaatagaggc tcccaaagta gggaaggcag ctgggggagg 2352

35

gttcagggca gcaatgciga gttcaagaaa agtacttcag gctgggcaca gtggctcatg 2412

40

ccigaaatcc tagcactttg ggaagacaat gtgggagaat ggcttgagcc caggagtcca 2472

45

agaccggcct gagcaacata glgaggatcc catctctacg cccaccctcc ccccgcaaaa 2532

50

aaaaaaagct gggtatggig gcttatgocct gtagtcgcag ctactcagaa ggctgaggtg 2592

55

ggaggatigc ttgttcccc gaggttgaag ctacagttag ccttgattgt gtcactgcac 2652

60

iccagccigg gcaacaggta agactctgtc tcaaaaaaaaa acaaaaaaag aagaagaaaa 2712

65

ES 2 364 078 T3

gtacttctac agccaatgcc tattecttga tcatccaaag cacctgcaga gtccagtga 2772

5 atgatatatt ctggctgggc acagtggctc acacctgtaa tcctagcact ttgggaggcc 2832

10 aaggcaggtg gatcacciga ggtcagaagt ttgaaaccag cctggactac atggtgaaac 2892

15 tccatctcta ctaaaagtac aaaaattagc tgggcaigat ggcacgcacc tgcagtccca 2952

20 gctactiggg aggctgaggc aggagaatca ctcgaacca ggaggcagag gttgcagiga 3012

25 gccaaagacag caccattgca ccccagcctg agcaacaaga gcgaaactcc atctcaggaa 3072

30 aaaaaaaaaa aaaaaaagla tattctaaca gacagatcag aggtclaaga gatcctcct 3132

35 tgctattatt acctgaagtc tgtagaactg ttacagata tctccttgac aggtgtcctt 3192

40 tatcttactt tatctgtaca gtaatcctgt gagaaagaca ggacagaaac cactgtgcct 3252

45 attttacaga tacgaaaact gagacacagg taaagggct tgtctgtagt cccatagcta 3312

50 gcagatggct ggagccaaga ctgaggctcg ttcttcaatg ctgagccagg gctccttccg 3372

55 ctgcaccaca agaacgctag accactcgcc accagcttc tcattccctc tctctcatt 3432

60 ctaatcattt ctagctgget ggctccaca gagcatagga aaacagccag ggccgggcac 3492

65

ES 2 364 078 T3

5 ggtggctcat gcctgtaatc tcaacactct gggaggccga gccgggtgga taacctgagg 3552
 tcaggaattc gagaccagcc tggccaacat ggtaaaacc cactcttact aaaaatataa 3612
 10 aaattagcca ggcatggtgg cgcacacctg taatcccagc tactcaagag gctgaggcag 3672
 15 gagaattgct taaatctggg aggcggaagt tgcaagtgagc caagatcgcg ccactgaact 3732
 20 ccagcctagg caacaagagc aaaactccat ctccaaaaaa aagaaaggaa aaacagggcc 3792
 25 aggtagccat tgtggagaga gcacacttag gaatcctggg atgttagtgt taaaagaaag 3852
 ctctggagc cagtattct caggtttgic ccagaaccct ttttctaag ccccatataa 3912
 30 aaggtagatt aaaaaaacia agtagcatga gtgaaattga gagagggaca ggtaatgcct 3972
 35 tccagcccct aacttctaac aatctggaag cacaacgtga aaatcacgia gcccaaccct 4032
 40 atcattttca tattatgaaa ctgagtcag gtaagtgaat ctglccaagg tcaccagca 4092
 45 aggtatcagt agccctgagg gtaaggactc tgataaggct cgggagggtc ctggaagcc 4152
 tgaggcggca ggaagagtgt gcagagttga gctgtctgg aaggctgac cactgctggg 4212
 50 cccacatcaa agccccatg gggagcagac ccgactgcac atggctcttt tgctggaaga 4272
 55
 60
 65

ES 2 364 078 T3

5 agagcaatggc tgcgcagagg actaaaaatit catctgggaa ggcttctttt gactgtcagt 4332
 agcaggatgt caccagatga ggggtgctaig ggaccacagc tgtctttgtt cccattgcaa 4392
 10 ctcaaccctg cgggaggccg cctacatccc tgagagcett ctggagccta cagaggagac 4452
 attggccagc caaaaggaaa ggagtggcca ggglacgacc tggagttagg aagggaaaaa 4512
 20 gtccccgaa agaagagaat tggatgagag gtctcagigg aaat 4556

25 <210> 27
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 27

35 Met Arg Leu Leu Arg Arg Arg His Met Pro Leu Arg Leu Ala Met Val
 1 5 10 15

40
 45 Gly Cys Ala Phe Val Leu Phe Leu Phe Leu Leu His Arg Asp Val Ser
 20 25 30

50

55

60

65

ES 2 364 078 T3

Ser Arg Glu Glu Ala Thr Glu Lys Pro Trp Leu Lys Ser Leu Val Ser

35

40

45

5

Arg Lys Asp His Val Leu Asp Leu Met Leu Glu Ala Met Asn Asn Leu

50

55

60

10

15

Arg Asp Ser Met Pro Lys Leu Gln Ile Arg Ala Pro Glu Ala Gln Gln

65

70

75

80

20

25

Thr Leu Phe Ser Ile Asn Gln Ser Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Thr Pro

85

90

95

30

35

Ala Glu Leu Lys Pro Phe Trp Glu Arg Pro Pro Gln Asp Pro Asn Ala

100

105

110

40

45

Pro Gly Ala Asp Gly Lys Ala Phe Gln Lys Ser Lys Trp Thr Pro Leu

115

120

125

50

55

Glu Thr Gln Glu Lys Glu Glu Gly Tyr Lys Lys His Cys Phe Asn Ala

130

135

140

60

65

ES 2 364 078 T3

5 Phe Ala Ser Asp Arg Ile Ser Leu Gln Arg Ser Leu Gly Pro Asp Thr
145 150 155 160

10 Arg Pro Pro Glu Cys Val Asp Gln Lys Phe Arg Arg Cys Pro Pro Leu
165 170 175

15

20 Ala Thr Thr Ser Val Ile Ile Val Phe His Asn Glu Ala Trp Ser Thr
180 185 190

25

30 Leu Leu Arg Thr Val Tyr Ser Val Leu His Thr Thr Pro Ala Ile Leu
195 200 205

35

40 Leu Lys Glu Ile Ile Leu Val Asp Asp Ala Ser Thr Glu Glu His Leu
210 215 220

45

50 Lys Glu Lys Leu Glu Gln Tyr Val Lys Gln Leu Gln Val Val Arg Val
225 230 235 240

55

60

65

ES 2 364 078 T3

Val Arg Gln Glu Glu Arg Lys Gly Leu Ile Thr Ala Arg Leu Leu Gly
245 250 255

5

Ala Ser Val Ala Gln Ala Glu Val Leu Thr Phe Leu Asp Ala His Cys
260 265 270

10

15

Glu Cys Phe His Gly Trp Leu Glu Pro Leu Leu Ala Arg Ile Ala Glu
275 280 285

20

25

Asp Lys Thr Val Val Val Ser Pro Asp Ile Val Thr Ile Asp Leu Asn
290 295 300

30

35

Thr Phe Glu Phe Ala Lys Pro Val Gln Arg Gly Arg Val His Ser Arg
305 310 315 320

40

45

Gly Asn Phe Asp Trp Ser Leu Thr Phe Gly Trp Glu Thr Leu Pro Pro
325 330 335

50

His Glu Lys Gln Arg Arg Lys Asp Glu Thr Tyr Pro Ile Lys Ser Pro
340 345 350

55

60

65

ES 2 364 078 T3

Thr Phe Ala Gly Gly Leu Phe Ser Ile Pro Lys Ser Tyr Phe Glu His

355

360

365

5

Ile Gly Thr Tyr Asp Asn Gln Met Glu Ile Trp Gly Gly Glu Asn Val

370

375

380

10

15

Glu Met Ser Phe Arg Val Trp Gln Cys Gly Gly Gln Leu Glu Ile Ile

385

390

395

400

20

25

Pro Cys Ser Val Val Gly His Val Phe Arg Thr Lys Ser Pro His Thr

405

410

415

30

35

Phe Pro Lys Gly Thr Ser Val Ile Ala Arg Asn Gln Val Arg Leu Ala

420

425

430

40

45

Glu Val Trp Met Asp Ser Tyr Lys Lys Ile Phe Tyr Arg Arg Asn Leu

435

440

445

50

55

60

65

ES 2 364 078 T3

Gln Ala Ala Lys Met Ala Gln Glu Lys Ser Phe Gly Asp Ile Ser Glu
450 455 460

5

Arg Leu Gln Leu Arg Glu Gln Leu His Cys His Asn Phe Ser Trp Tyr
465 470 475 480

10

15

Leu His Asn Val Tyr Pro Glu Met Phe Val Pro Asp Leu Thr Pro Thr
485 490 495

20

25

Phe Tyr Gly Ala Ile Lys Asn Leu Gly Thr Asn Gln Cys Leu Asp Val
500 505 510

30

35

Gly Glu Asn Asn Arg Gly Gly Lys Pro Leu Ile Met Tyr Ser Cys His
515 520 525

40

Gly Leu Gly Gly Asn Gln Tyr Phe Glu Tyr Thr Thr Gln Arg Asp Leu
530 535 540

45

50

Arg His Asn Ile Ala Lys Gln Leu Cys Leu His Val Ser Lys Gly Ala
545 550 555 560

55

60

65

ES 2 364 078 T3

Leu Gly Leu Gly Ser Cys His Phe Thr Gly Lys Asn Ser Gln Val Pro
565 570 575

5

Lys Asp Glu Glu Trp Glu Leu Ala Gln Asp Gln Leu Ile Arg Asn Ser
580 585 590

10

15

Gly Ser Gly Thr Cys Leu Thr Ser Gln Asp Lys Lys Pro Ala Met Ala
595 600 605

20

25

Pro Cys Asn Pro Ser Asp Pro His Gln Leu Trp Leu Phe Val
610 615 620

30

35

40

45

50

55

60

65