



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 274 220**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **03717443 .0**

⑧6 Fecha de presentación : **10.04.2003**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1497656**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2005**

⑤4 Título: **Diagnóstico de carcinoma usando polipéptidos RAIG1.**

③0 Prioridad: **11.04.2002 GB 0208331**
17.09.2002 GB 0221538

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

⑦3 Titular/es: **UCB, S.A.**
Allée de la Recherche 60
1070 Bruxelles, BE

⑦2 Inventor/es: **Terrett, J. A.**

⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 274 220 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

Diagnóstico de carcinoma usando polipéptidos RAIG1.

5 El presente invento se refiere al escrutinio para el cáncer de mama, cáncer de colon y/u osteosarcoma en un individuo, y/o a la monitorización de la eficacia de una terapia anti-cáncer de mama, anti-cáncer de colon y/o anti-osteosarcoma empleando el polipéptido RAIG1 (gen 1 inducible por el ácido retinoico, del inglés *retinoic acid-inducible gene 1*; también conocido como hipotética proteína FLJ10899 o inducida por el ácido retinoico 3) o un ácido nucleico correspondiente. También se proporciona el empleo de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido RAIG1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de colon y/u osteosarcoma, en el que el anticuerpo está conjugado con un resto terapéutico o medicamentoso.

15 Se han identificado proteínas específicas del tumor para muchos tipos de cánceres empleando técnicas como el escrutinio diferencial de ADNc (Hubert, R.S., *et al.*, 1999, Proc Natl Acad Sci, USA 96:14523-14528) y la purificación de proteínas de la superficie celular que son reconocidas por anticuerpos específicos de tumor (Catimel, B., *et al.*, 1996, J Biol Chem 271:25664-25670). Más recientemente, los “chips” de ADN que contienen hasta 10.000 elementos de secuencia expresados se han empleado para caracterizar la expresión génica de células tumorales (Dhanasekaran, S.M., *et al.*, 2001, Nature 412:822-826). Sin embargo, hay varias razones por las que los numerosos y extensos análisis transcriptómicos previos de cánceres pueden no haber revelado todas, o incluso la mayoría, de las proteínas asociadas a tumores. Éstas incluyen: (i) ausencia de correlación entre los niveles de transcrito y de proteína asociada a la enfermedad, particularmente frecuente para proteínas de membrana que a menudo tienen una vida media larga y, como tales, no tienen un elevado recambio de ARNm. Por tanto, mientras la diferencia en niveles de proteína entre las células normales y cancerosas sea consistente es difícil, a menudo, asociar cambios en el ARNm para una proteína de membrana dada con el estado canceroso; (ii) la translocación de una proteína en el estado enfermo, más bien que simplemente niveles diferenciales del transcrito; por ejemplo, erbB2/HER2-neu muestra mucha mayor localización en la membrana plasmática de las células cancerosas que en las células normales de mama, y los factores de transcripción del receptor de estrógenos y STAT3 se translocan al núcleo para ejercer sus efectos tumorigénicos; y (iii) los genes nuevos, sin caracterizar, no están muy bien representados dentro del “sistema cerrado” de un array de ADNc donde hay restricciones en el número de elementos de secuencia expresados por chip y en el conocimiento y disponibilidad de los clones de ADN.

30 Por tanto, existe una necesidad de identificar más marcadores para diagnosticar el cáncer y más dianas que puedan emplearse en una aproximación terapéutica al cáncer. El presente invento está basado en la nueva asociación de RAIG1 con el carcinoma, en particular con el cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma. El análisis de la expresión del ARNm de RAIG1 reveló que está elevada en el cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario y osteosarcoma cuando se comparó con tejido normal o tejido control correspondiente.

40 El documento EP 1074617 se refiere a sets de cebadores para sintetizar ADNc de extensión completa, útiles para estudiar la función de la proteína, y describe una secuencia nucleotídica de RAIG1 como una de las 16.000 secuencias útiles para fabricar tales sets de cebadores. Sin embargo, no se advirtió asociación con enfermedades.

45 RAIG1 es un receptor acoplado a proteína G huérfana (GPCR, del inglés *G-protein coupled receptor*) localizado en el cromosoma 12 (Cheng y Lotan, arriba; Brauner-Osbourne, H., 2001, Biochim Biophys Acta 1518:237-248). A diferencia de un receptor relacionado (GPCR5B), que se expresa ampliamente en los tejidos periférico y central, se ha publicado que RAIG1 muestra un patrón de expresión más restringido (Brauner-Osbourne, H. y Krogsgaard-Larsen, P., 2000, Genomics, 65:121-128).

50 En consecuencia, el presente invento proporciona un método para escrutar el cáncer de mama, cáncer de colon y/u osteosarcoma en un individuo, y/o para monitorizar la eficacia de la terapia anti-cáncer de mama, anti-cáncer de colon y/o anti-osteosarcoma, el cual comprende la etapa de detectar y/o cuantificar en una muestra biológica obtenida de dicho individuo un polipéptido RAIG1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID n° 1); en el que dicho polipéptido RAIG1 se detecta y/o se cuantifica empleando un anticuerpo que se une de forma específica a dicho polipéptido RAIG1.

55 En el contexto del presente invento, los polipéptidos RAIG1 pueden obtenerse a partir de una muestra biológica de cualquier fuente, tal como, y sin limitación, una muestra de tejido de mama, páncreas, pulmón, hígado, ovario, colon y/o médula ósea. En una realización, el nivel del polipéptido RAIG1 se compara con un intervalo de referencia o control.

60 El término “carcinoma” incluye un crecimiento maligno nuevo que surge del epitelio, encontrado en la piel, o más frecuentemente, en el endotelio de los órganos del cuerpo, por ejemplo: mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o intestino. Los carcinomas tienden a infiltrarse en el tejido adyacente y a extenderse (metastatizar) a órganos distantes, por ejemplo: a hueso, hígado, pulmón o al cerebro.

65 Los polipéptidos descritos con anterioridad se denominan posteriormente “polipéptidos RAIG1”. El término “polipéptidos” incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Éstos se emplean indistintamente a menos que se especifique

de otra manera. Los polipéptidos RAIG1 pueden estar en forma de una proteína “madura” o pueden ser parte de una proteína más grande tal como una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contiene secuencias secretoras o líder, una secuencia de pre, pro o preproteína o una secuencia que ayuda en la purificación tal como una etiqueta de afinidad, por ejemplo, pero sin limitación, residuos múltiples de histidina, una etiqueta FLAG, etiqueta HA o etiqueta myc. Una secuencia adicional que pueda proporcionar estabilidad durante la producción del recombinante también puede emplearse. Tales secuencias pueden eliminarse opcionalmente, según se precise, incorporando una secuencia escindible como secuencia adicional o parte de la misma. De este modo, un polipéptido RAIG1 puede fusionarse a otros restos, incluidos otros polipéptidos. Tales secuencias y etiquetas de afinidad adicionales se conocen bien en la técnica.

El invento también proporciona un método para escrutar el cáncer de mama, el cáncer de colon y/o el osteosarcoma en un individuo, y/o para monitorizar la eficacia de la terapia anti-cáncer de mama, anti-cáncer de colon y/o anti-osteosarcoma, el cual comprende la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida de dicho individuo un ácido nucleico que:

- a) comprende o consiste en la secuencia de ADN mostrada en la Figura 2 (SEQ ID nº 2) o en su ARN equivalente;
- b) tiene una secuencia que es complementaria a una secuencia de a); o
- c) tiene una secuencia que codifica para un polipéptido según se define anteriormente.

A menos de que el contexto indique lo contrario, los ácidos nucleicos de RAIG1 incluyen aquellas moléculas de ácido nucleico definidas en a) a c) anteriormente y pueden tener una o más de las siguientes características:

- 1) pueden ser ADN o ARN;
- 2) pueden ser de cadena sencilla o doble;
- 3) pueden estar en forma substancialmente pura. De este modo, pueden proporcionarse en una forma que está substancialmente libre de proteínas contaminantes y/o de otros ácidos nucleicos; y
- 4) pueden estar con intrones o sin intrones (p. ej., como ADNc).

El uso de ácidos nucleicos que son complementarios a los ácidos nucleicos de RAIG1 descritos anteriormente en a)-c) y que pueden hibridar a dichos ácidos nucleicos de RAIG1 es posible. Tales moléculas de ácido nucleico se denominan moléculas de ácido nucleico “hibridadoras”. Por ejemplo, pero sin limitación, moléculas de ácido nucleico hibridadoras pueden ser útiles como sondas o cebadores. Las moléculas de ácido nucleico hibridadoras pueden tener un elevado grado de identidad de secuencia a lo largo de su longitud con una molécula de ácido nucleico dentro del alcance de a) - c) anterior (p. ej., al menos 50%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de identidad de secuencia).

Los ensayos de hibridación pueden emplearse para detectar, pronosticar, diagnosticar o monitorizar el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma, en un individuo. En consecuencia, tal ensayo de hibridación comprende:

- i) hacer contacto con una muestra biológica, obtenida de un individuo, que contiene ácido nucleico con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridar una molécula de ácido nucleico de RAIG1, bajo condiciones en las que pueda ocurrir la hibridación; y
- ii) detectar o medir cualquier hibridación resultante.

Preferiblemente, tales moléculas hibridadoras tienen al menos 10 nucleótidos de longitud y tienen preferiblemente al menos 25 o al menos 50 nucleótidos de longitud. Más preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico hibridadoras hibridan específicamente ácidos nucleicos dentro del alcance de a) - c) anterior. Más preferiblemente, la hibridación ocurre bajo condiciones de hibridación astringentes. Un ejemplo de condiciones de hibridación astringentes es cuando la hibridación que se intenta se lleva a cabo a una temperatura desde aproximadamente 35°C hasta aproximadamente 65°C, empleando una solución salina que es de aproximadamente 0,9 M. Sin embargo, la persona experta será capaz de variar tales condiciones según sea apropiado para tener en cuenta variables tales como la longitud de la sonda, la composición de las bases, el tipo de iones presentes, etc.

Puede proporcionarse un kit diagnóstico que comprende una sonda de ácido nucleico capaz de hibridar con el ARN que codifica un polipéptido RAIG1, reactivos adecuados e instrucciones de uso.

Puede proporcionarse un kit diagnóstico que comprende en uno o más recipientes un par de cebadores que bajo condiciones de reacción apropiadas puede amplificar con cebador al menos una parte de una molécula de ácido nucleico de RAIG1, tal como por reacción en cadena de la polimerasa (véase, p. ej., Innis *et al.*, 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), reacción en cadena de la ligasa (véase el documento EP 320.308), empleo de

la replicasa Q β , reacción de la sonda cíclica u otros métodos conocidos en la técnica. Típicamente, los cebadores son al menos de ocho nucleótidos de largo y serán preferiblemente de al menos diez a veinticinco nucleótidos de largo y más preferiblemente de quince a veinticinco nucleótidos de largo. En algunos casos, pueden emplearse cebadores de al menos treinta o de al menos treinta y cinco nucleótidos de longitud.

En un aspecto adicional, el método para detectar la presencia de un polipéptido RAIG1 comprende detectar el polipéptido capturado empleando un reactivo de detección marcado directa o indirectamente.

Un polipéptido RAIG1 puede detectarse por medio de cualquier inmunoensayo conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que emplean técnicas como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (siglas en inglés de ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima), inmunoensayos “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

Kits diagnósticos, que comprenden un reactivo de captura (p. ej., un anticuerpo) frente al polipéptido RAIG1 como se define anteriormente, pueden proporcionarse. Además, tal kit puede comprender opcionalmente uno o más de los siguientes:

- 1) instrucciones para el uso del reactivo de captura para diagnosticar, pronosticar, monitorizar terapéuticamente o cualquier combinación de estas aplicaciones;
- 2) una pareja de unión marcada al reactivo de captura;
- 3) una fase sólida (tal como una tira de reactivo) sobre la que se inmoviliza el reactivo de captura; y
- 4) un marcaje o inserto que indica aprobación reguladora para diagnosticar, pronosticar, emplear terapéuticamente o cualquier combinación de las mismas.

Si no se proporciona pareja de unión marcada al reactivo de captura, el reactivo de captura anti-polipéptido en sí mismo puede marcarse con un marcador detectable, p. ej., un resto quimioluminiscente, enzimático, fluorescente o radiactivo (véase arriba).

Pueden realizarse métodos de diagnóstico empleando muchos métodos conocidos para aquellos expertos en la técnica, incluidos, sin limitación, inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico, electroforesis en gel de 2 dimensiones, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo empleando técnicas como transferencias en Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, inmunoensayos, p. ej., radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima), inmunoensayos “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

Los polipéptidos RAIG1 representan una diana adecuada para el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma. De este modo, son posibles métodos para identificar agentes capaces de interactuar con, o modular, la expresión o actividad de un polipéptido RAIG1 o la expresión de una molécula de ácido nucleico de RAIG1. Los agentes identificados a través de estos métodos de escrutinio son potencialmente terapéuticos para el uso en el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma.

Los agentes pueden seleccionarse a partir de una amplia variedad de agentes candidatos. Ejemplos de agentes candidatos incluyen, pero no están limitados a, ácidos nucleicos (p. ej., ADN y ARN), anticuerpos, carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos. Los agentes pueden obtenerse empleando cualquiera de los numerosos planteamientos en métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluidas: bibliotecas biológicas; bibliotecas con diversidad espacial dirigida realizadas en fase sólida o solución de manera paralelizada; el método de la biblioteca “una bola un compuesto”; y los métodos de bibliotecas sintéticas que emplean selección por cromatografía de afinidad. El planteamiento de la biblioteca biológica se adapta a las bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro planteamientos son aplicables a péptidos, oligómeros no péptídicos o bibliotecas de moléculas pequeñas de compuestos (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145; patente de EE.UU. 5.738.996 y patente de EE.UU. 5.807.683).

Ejemplos de métodos adecuados basados en la presente descripción para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo en: 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; Carrell *et al.*, 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell *et al.*, 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y Gallop *et al.*, 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233.

Pueden presentarse bibliotecas de compuestos, por ejemplo, en solución (p. ej., Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), o en bolas (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), chips (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), bacterias (patente de EE.UU. 5.223.409), esporas (patentes de EE.UU. 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) o fagos (Scott y Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-6382; y Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310).

Agentes que interaccionan con (p. ej., se unen a) un polipéptido RAIG1 pueden identificarse en un ensayo basado en células donde una población de células que expresan un polipéptido RAIG1 pueden ponerse en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interaccionar con un polipéptido RAIG1 puede compararse con un intervalo de referencia o control. Alternativamente, una primera y segunda población de células que expresa un polipéptido RAIG1 puede ponerse en contacto con un agente candidato o un agente control y puede determinarse la capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido comparando la diferencia de interacción entre el agente candidato y el agente control. Si se desea, este tipo de ensayo puede emplearse para escrutar una pluralidad (p. ej., una biblioteca) de agentes candidatos empleando una pluralidad de poblaciones celulares que expresan un polipéptido RAIG1. Si se desea, este ensayo puede usarse para escrutar una pluralidad (p. ej., una biblioteca) de agentes candidatos. La célula, por ejemplo, puede ser de origen procariota (p. ej., *E. coli*) o de origen eucariota (p. ej., levadura o mamífero). Además, las células pueden expresar el polipéptido RAIG1 endógenamente o pueden fabricarse por ingeniería genética para expresar el polipéptido. En algunas realizaciones, un polipéptido RAIG1 o el agente candidato se marcan, por ejemplo, con un marcaje radiactivo (tal como ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I) o con un marcaje fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído o fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre un polipéptido y un agente candidato.

Agentes que interaccionan con (p. ej., se unen a) un polipéptido RAIG1 pueden identificarse en un sistema de ensayo libre de células donde una muestra que expresa un polipéptido RAIG1 se pone en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato a interaccionar con un polipéptido RAIG1 puede compararse con un intervalo de referencia o control. Preferiblemente, una primera y segunda muestra que comprende polipéptido RAIG1 nativo o recombinante puede ponerse en contacto con un agente candidato o con un agente control y la capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido puede determinarse por comparación de la diferencia de interacción entre el agente candidato y el agente control. Si se desea, este ensayo puede emplearse para escrutar una pluralidad (p. ej., una biblioteca) de agentes candidatos empleando una pluralidad de muestras de polipéptidos RAIG1. Preferiblemente, el polipéptido se inmoviliza primero mediante, por ejemplo, contacto del polipéptido con un anticuerpo inmovilizado que lo reconoce específicamente y se une a él, o mediante contacto de una preparación purificada de polipéptido con una superficie designada para unir proteínas. El polipéptido puede purificarse parcial o completamente (p. ej., parcial o completamente libre de otros polipéptidos) o ser parte de un lisado celular. Además, el polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende el polipéptido RAIG1 o una parte biológicamente activa del mismo y un dominio tal como glutatión-S-transferasa. Alternativamente, el polipéptido puede biotinilarse empleando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en el campo (p. ej., kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL). La capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido puede duplicarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Un polipéptido RAIG1 puede emplearse como una “proteína cebo” en un ensayo de 2-híbridos o en un ensayo de tres híbridos para identificar otras proteínas que se unen o interaccionan con el polipéptido RAIG1 (véase, p. ej., la patente de EE.UU. 5.283.317; Zervos *et al.*, 1993, *Cell* 72:223-232; Madura *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.*, 1993, *Bio/Techniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.*, 1993, *Oncogene* 8:1693-1696; y el documento WO 94/10300). Como los expertos en la técnica apreciarán, tales proteínas de unión están también probablemente implicadas en la propagación de señales por un polipéptido RAIG1. Por ejemplo, pueden ser elementos anteriores o posteriores de una vía de señalización que implica a un polipéptido RAIG1. Alternativamente, los polipéptidos que interaccionan con un polipéptido RAIG1 pueden identificarse aislando un complejo proteico que comprende un polipéptido RAIG1 (es decir, un polipéptido RAIG1 que interacciona directa o indirectamente con otro o más polipéptidos) e identificando las proteínas asociadas empleando métodos conocidos en la técnica tales como espectrometría de masas o transferencia Western (véanse, por ejemplo, Blackstock, W. y Weir, M. 1999, *Trends in Biotechnology*, 17: 121-127; Rigaut, G. 1999, *Nature Biotechnology*, 17:1030-1032; Husi, H. 2000, *Nature Neurosci.* 3:661-669; Ho, Y. *et al.*, 2002, *Nature*, 415:180-183; Gavin, A. *et al.*, 2002, *Nature*, 415:141-147).

En todos los casos, la capacidad del agente candidato para interaccionar directa o indirectamente con el polipéptido RAIG1 puede determinarse mediante métodos conocidos para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, pero sin limitación, la interacción entre un agente candidato y un polipéptido RAIG1 puede determinarse mediante citometría de flujo, un ensayo de centelleo, un ensayo de actividad, espectrometría de masas, microscopía, inmunoprecipitación o análisis de transferencia Western.

Pueden identificarse agentes que interaccionan competitivamente con (es decir, se unen competitivamente) un polipéptido RAIG1 en un ensayo de unión competitiva y puede determinarse la capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido RAIG1. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interaccionar con un polipéptido RAIG1 puede compararse con un intervalo de referencia o control. Preferiblemente, una primera y segunda población de células que expresan ambas un polipéptido RAIG1 y una proteína que se sabe interacciona con

el polipéptido RAIG1 pueden ponerse en contacto con un agente candidato o con un agente control. La capacidad del agente candidato para interaccionar competitivamente con el polipéptido RAIG1 puede determinarse entonces comparando la interacción en la primera y segunda población de células. Alternativamente, una segunda población alternativa o una población adicional de células puede ponerse en contacto con un agente que se sabe que interacciona competitivamente con un polipéptido RAIG1. Alternativamente, agentes que competitivamente interaccionan con un polipéptido RAIG1 se identifican en un sistema de ensayo libre de células al contactar una primera y segunda muestra que comprende un polipéptido RAIG1 y una proteína que se sabe interacciona con el polipéptido RAIG1 con un agente candidato o con un agente control. La capacidad del agente candidato para interaccionar competitivamente con el polipéptido RAIG1 se determina entonces comparando la interacción en la primera y segunda muestra. Alternativamente, una segunda muestra alternativa o una muestra adicional que comprende un polipéptido RAIG1 puede ponerse en contacto con un agente que se sabe interacciona competitivamente con un polipéptido RAIG1. En cualquier caso, el polipéptido RAIG1 y la proteína interactiva conocida pueden expresarse de forma natural o pueden expresarse recombinantemente; el agente candidato puede añadirse exógenamente o expresarse de forma natural o recombinante.

Pueden identificarse agentes que modulan una interacción entre un polipéptido RAIG1 y otro agente, por ejemplo, aunque sin limitación, una proteína, en un ensayo basado en células poniendo en contacto células que expresan un polipéptido RAIG1 en presencia de un agente interactivo conocido y de un agente modulador candidato, y seleccionando el agente candidato que modula la interacción. Alternativamente, los agentes que modulan una interacción entre un polipéptido RAIG1 y otro agente, por ejemplo, aunque sin limitación, una proteína, pueden identificarse en un sistema de ensayo libre de células poniendo en contacto el polipéptido con un agente que se sabe interactúa con el polipéptido en presencia de un agente candidato. Un agente modulador puede actuar como un anticuerpo, un cofactor, un inhibidor, un activador o tener un efecto antagonista o agonista sobre la interacción entre un polipéptido RAIG1 y un agente conocido. Según se establece anteriormente, la capacidad del agente que se sabe interacciona con un polipéptido RAIG1 puede determinarse por métodos conocidos en la técnica. Estos ensayos, basados en células o libres de células, pueden emplearse para escrutar una pluralidad (p. ej., una biblioteca) de agentes candidatos.

Un sistema de ensayo basado en células puede emplearse para identificar agentes capaces de modular (es decir, estimular o inhibir) la actividad de un polipéptido RAIG1. En consecuencia, la actividad de un polipéptido RAIG1 se mide en una población de células que expresan de forma natural o recombinante un polipéptido RAIG1, en presencia de un agente candidato. Preferiblemente, la actividad de un polipéptido RAIG1 se compara con un intervalo de referencia o control. Preferiblemente, la actividad de un polipéptido RAIG1 se mide en una primera y segunda población de células que expresa de forma natural o recombinante un polipéptido RAIG1 en presencia de agente o en ausencia de un agente candidato (p. ej., en presencia de un agente control) y se compara la actividad del polipéptido RAIG1. El agente candidato puede entonces identificarse como un modulador de la actividad de un polipéptido RAIG1 de acuerdo con esta comparación. Alternativamente, la actividad de un polipéptido RAIG1 puede medirse en un sistema de ensayo libre de células donde el polipéptido RAIG1 es bien natural o recombinante. Preferiblemente, la actividad de un polipéptido RAIG1 se mide en una primera y segunda muestra en presencia o ausencia de un agente candidato y se compara la actividad del polipéptido RAIG1. El agente candidato puede entonces identificarse como un modulador de la actividad de un polipéptido RAIG1 de acuerdo con esta comparación.

La actividad de un polipéptido RAIG1 puede evaluarse detectando su efecto sobre un efector posterior, por ejemplo, aunque sin limitación, el nivel o actividad de un segundo mensajero (p. ej., cAMP, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP_3 , etc.), detectando la actividad catalítica o enzimática, detectando la inducción de un gen indicador (p. ej., luciferasa) o detectando una respuesta celular, por ejemplo, proliferación, diferenciación o transformación donde apropiado, como saben los expertos en la técnica (para técnicas de medida de actividad, véase, p. ej., la patente de EE.UU. 5.401.639). El agente candidato puede entonces identificarse como un modulador de la actividad de un polipéptido RAIG1 al comparar los efectos del agente candidato con el agente control. Agentes control adecuados incluyen PBS o salino normal.

Pueden identificarse agentes tales como una enzima, o una parte biológicamente activa de la misma, la cual es responsable de la producción o degradación de un polipéptido o ácido nucleico RAIG1 o es responsable de la modificación postraduccional de un polipéptido RAIG1. En una criba primaria, polipéptidos RAIG1 substancialmente puros, expresados de forma nativa o recombinante, ácidos nucleicos o extractos celulares, u otra muestra que comprende polipéptidos o ácidos nucleicos RAIG1 expresados de forma nativa o recombinante, se ponen en contacto con una pluralidad de agentes candidatos (por ejemplo, pero sin limitación, con una pluralidad de agentes presentados como una biblioteca) que pueden ser responsables del procesamiento de un polipéptido o ácido nucleico RAIG1, para identificar tales agentes. La capacidad del agente candidato para modular la producción, degradación o modificación postraduccional de un polipéptido o ácido nucleico RAIG1 puede determinarse mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo, sin limitación, citometría de flujo, marcaje radiactivo, un ensayo de kinasa, un ensayo de fosfatasa, inmunoprecipitación y análisis de transferencia Western o análisis de transferencia Northern.

Las células que expresan un polipéptido RAIG1 pueden ponerse en contacto con una pluralidad de agentes candidatos. La capacidad de tal agente para modular la producción, degradación o modificación postraduccional de un polipéptido RAIG1 puede determinarse mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica, según se describe anteriormente.

Pueden identificarse agentes que modulan la expresión de un polipéptido RAIG1 (es decir, estimulan o inhiben) en un sistema de ensayo basado en células. En consecuencia, una población de células que expresa un polipéptido o ácido

nucleico RAIG1 se pone en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para alterar la expresión del polipéptido o ácido nucleico RAIG1 por comparación con un intervalo de referencia o control. Alternativamente, una primera y segunda población de células que expresa un polipéptido RAIG1 se pone en contacto con un agente candidato o con un agente control y se determina la capacidad del agente candidato para alterar la expresión del polipéptido o ácido nucleico RAIG1 entre la primera y segunda poblaciones de células. Alternativamente, la expresión del polipéptido o ácido nucleico RAIG1 en la primera población puede compararse adicionalmente con un intervalo de referencia o control. Si se desea, este ensayo puede emplearse para escrutar una pluralidad de agentes candidatos (p. ej., una biblioteca). La célula, por ejemplo, puede ser de origen procariota (p. ej., *E. coli*) o de origen eucariota (p. ej., levadura o mamífero). Además, las células pueden expresar un polipéptido o ácido nucleico RAIG1 endógenamente o fabricarse por ingeniería genética para expresar un polipéptido o ácido nucleico RAIG1. La capacidad de los agentes candidatos para alterar la expresión de un polipéptido o ácido nucleico RAIG1 puede determinarse por métodos conocidos para aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, y sin limitación, mediante citometría de flujo, marcaje radiactivo, un ensayo de centelleo, inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western o análisis de transferencia Northern.

Pueden identificarse agentes que modulan la expresión de un polipéptido o ácido nucleico RAIG1 en un modelo animal. Ejemplos de animales adecuados incluyen, pero no están limitados a, ratones, ratas, conejos, monos, cobayas, perros y gatos. Preferiblemente, el animal empleado representa un modelo de carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma. En consecuencia, se administra un agente candidato o un agente control a un primer y segundo grupo de mamíferos y se determina la capacidad del agente candidato para modular la expresión del polipéptido o ácido nucleico RAIG1 comparando la diferencia en el nivel de expresión entre el primer y el segundo grupo de mamíferos. Si se desea, los niveles de expresión de los polipéptidos o ácidos nucleicos RAIG1 en el primer y segundo grupos de mamíferos pueden compararse con el nivel de un polipéptido o ácido nucleico RAIG1 en un grupo control de mamíferos. El agente candidato o un agente control puede administrarse por medios conocidos en la técnica (p. ej., oral, rectal o parenteralmente, tal como intraperitoneal o intravenosamente). Cambios en la expresión de un polipéptido o ácido nucleico pueden evaluarse por los métodos esbozados anteriormente. Particularmente, un agente terapéuticamente eficaz puede identificarse monitorizando un alivio o mejoría en los síntomas de la enfermedad, para retrasar el inicio o disminuir la progresión de la enfermedad, por ejemplo, pero sin limitación, una reducción en el tamaño del tumor. Las técnicas conocidas para los médicos familiarizados con el carcinoma pueden emplearse para determinar si un agente candidato ha alterado uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

Un experto en la técnica también apreciará que un polipéptido RAIG1 puede usarse también en un método para el diseño basado en la estructura de un agente, en particular, una molécula pequeña que actúa para modular (p. ej., estimular o inhibir) la actividad de dicho polipéptido, dicho método comprende:

- 1) determinar la estructura tridimensional de dicho polipéptido;
- 2) deducir la estructura tridimensional dentro del polipéptido del sitio(s) probablemente reactivo(s) o de unión;
- 3) sintetizar agentes candidatos que se predice reaccionan o se unen al sitio deducido de reacción o de unión; y
- 4) someter a ensayo si el agente candidato es capaz de modular la actividad de dicho polipéptido.

Se apreciará que el método descrito anteriormente es probable que sea un procedimiento iterativo.

Pueden proporcionarse agentes que interaccionan o modulan la expresión o actividad de un polipéptido o ácido nucleico RAIG1, polipéptidos RAIG1, anticuerpos y ácidos nucleicos RAIG1 y los usos de los mismos para tratamientos, según se describe en esta memoria. Posteriormente, los agentes, polipéptidos RAIG1 y ácidos nucleicos RAIG1 de uso en el tratamiento se denominan “agentes activos”. El término “tratamiento” incluye bien terapia terapéutica o profiláctica. Cuando se hace una referencia en la presente memoria a un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección empleando un agente activo particular o combinación de agentes, debe entenderse que tal referencia pretende incluir el uso de ese agente activo o combinación de agentes en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la enfermedad o afección.

En consecuencia, puede proporcionarse un método para la profilaxis y/o el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma, el cual comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente activo.

A fin de emplear agentes activos en la terapia (humana o veterinaria), éstos se formularán normalmente en una composición farmacéutica de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar, p. ej., agregando el agente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas son particularmente útiles en la prevención o tratamiento del carcinoma. En un aspecto, la composición farmacéutica es para uso como una vacuna y, de este modo, cualquier componente adicional será aceptable para uso como vacuna. Además, la persona experta apreciará que puede añadirse uno o más adyuvantes adecuados a tales preparaciones de vacuna.

Los agentes activos pueden administrarse a un individuo por cualquiera de las vías empleadas convencionalmente para la administración de fármacos, por ejemplo, pueden administrarse parenteral, oral, tópicamente (incluyendo bu-

cal, sublingual o transdérmicamente) o por inhalación. Las vías de administración más adecuadas en cualquier caso dependerán del agente activo particular, del carcinoma implicado, del individuo y de la naturaleza y gravedad de la enfermedad y de la condición física del individuo.

- 5 Los agentes activos pueden administrarse en combinación, p. ej., simultánea, secuencial o separadamente con otro o más agentes terapéuticamente activos, p. ej., anti-carcinoma.

10 La dosis de administración de un agente activo variará de acuerdo con el agente activo particular, el carcinoma implicado, el individuo y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del individuo y la vía de administración seleccionada; la dosis apropiada puede determinarse fácilmente por una persona experta en la técnica. Para el tratamiento del carcinoma en humanos y animales, la dosis puede variar desde 0,01 mg/kg hasta 750 mg/kg. Para uso profiláctico en humanos y animales, la dosis puede variar desde 0,01 mg/kg hasta 100 mg/kg.

15 Las composiciones pueden contener desde 0,1% en peso, preferiblemente desde 10-60% en peso, del agente activo del invento, dependiendo del método de administración.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo del invento por dosis. Tal unidad puede contener, por ejemplo, aunque sin limitación, de 750 mg/kg a 0,1 mg/kg dependiendo de la afección a tratar, la vía de administración y la edad, peso y condición del individuo. Las composiciones de dosis unitarias preferidas son aquellas que contienen una dosis o subdosis diaria del agente activo, según se relata anteriormente, o una fracción apropiada de la misma.

25 Se reconocerá por un experto en la técnica que la cantidad y el espaciado óptimos de las dosis individuales de un agente activo se determinarán por la naturaleza y alcance de la afección a tratar, la forma, vía y lugar de administración y el individuo a tratar en particular, y que estos óptimos pueden determinarse mediante técnicas convencionales. Un experto en la técnica apreciará también que el curso óptimo de tratamiento, es decir, el número de dosis de un agente activo dado al día durante un número definido de días puede averiguarse por aquellos expertos en la técnica que emplean tests de determinación del curso del tratamiento convencionales.

30 Los regímenes de dosis se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente, según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

35 Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo, p. ej., de la vía de administración.

40 Las composiciones para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las preparaciones orales líquidas pueden estar en la forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas o aceitosas, soluciones, emulsiones, siropes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para reconstituir con agua o con otro vehículo adecuado antes de usar. Las preparaciones orales líquidas pueden contener agentes suspendidos, por ejemplo, sorbitol, metilcelulosa, sirope de glucosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel estearato de aluminio o grasas hidrogenadas comestibles, agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina, monooleato de sorbitán o acacia; agua; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, ésteres aceitosos tales como glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico; pueden usarse agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares.

50 En el caso de preparaciones orales sólidas tales como polvos, cápsulas y comprimidos, pueden incluirse vehículos como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares. Debido a su fácil administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma de dosis unitaria oral más ventajosa en la que se emplean generalmente vehículos farmacéuticos de envoltura sólida. Además de las formas frecuentes de dosificación expuestas anteriormente, los agentes activos también pueden administrarse mediante medios de liberación y/o aparatos de administración controlada. Los comprimidos y las cápsulas pueden comprender vehículos o excipientes convencionales tales como agentes de unión, por ejemplo, sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; rellenos, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricantes de comprimidos, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; desintegrantes, por ejemplo, almidón de patata; o agentes humidificantes aceptables tales como laurilsulfato sódico. Los comprimidos pueden estar recubiertos mediante técnicas estándares acuosas o no acuosas, de acuerdo con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal.

60 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, cada una conteniendo una cantidad predeterminada del agente activo, como polvo o granulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Tales composiciones pueden prepararse por cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de asociar el agente activo con el vehículo, lo que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando uniforme e íntimamente el agente activo con los vehículos líquidos o con los vehículos sólidos finamente divididos o con ambos y, entonces, si es necesario, dando forma al producto en la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

Las tabletas comprimidas pueden prepararse por compresión, en una máquina adecuada, del agente activo en forma de una fluencia suave tal como un polvo o granulos, mezclados opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del agente en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. De forma deseable, cada comprimido contiene desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 500 mg del agente activo y cada sello o cápsula contiene desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 mg del agente activo.

También pueden prepararse composiciones que comprenden un agente activo en polvo o en forma de concentrado líquido. Los excipientes solubles en agua convencionales, tales como lactosa o sacarosa, pueden incorporarse en los polvos para mejorar sus propiedades físicas. De este modo, polvos particularmente adecuados de este invento comprenden 50 a 100% p/p, y preferiblemente 60 a 80% p/p de la combinación, y 0 a 50% p/p y preferiblemente 20 a 40% p/p de los excipientes convencionales. Cuando se emplean en un contexto veterinario tales polvos pueden añadirse a los piensos de los animales, por ejemplo, por medio de un intermediario premezclado, o diluido en el agua de bebida del animal.

Los concentrados líquidos para la administración oral contienen adecuadamente una combinación de agentes solubles en agua y pueden incluir opcionalmente un solvente miscible en agua aceptable en veterinaria, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol, glicerol formal o tales solventes mezclados con hasta un 30% v/v de etanol.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden prepararse como soluciones o suspensiones de agentes activos del invento en agua mezclados de forma adecuada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, glicoles de polietileno líquido y mezclas de los mismos en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas, las cuales pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la composición isotónica con la sangre del futuro receptor y suspensiones estériles acuosas o no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las soluciones de inyección, dispersiones y suspensiones extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, granulos y comprimidos estériles.

Las composiciones pueden presentarse en dosis única o en envases de múltiples dosis, por ejemplo, en ampollas y viales sellados, y para aumentar la estabilidad pueden almacenarse en un estado de secado por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para las inyecciones, inmediatamente antes del uso. El vehículo líquido estéril puede suministrarse en un vial o ampolla separado y puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de éstos y aceites vegetales. De forma ventajosa, agentes tales como un anestésico local, agentes conservantes y tamponadores pueden incluirse en el vehículo líquido estéril.

Los agentes activos pueden formularse para asegurar la distribución adecuada *in vivo*, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de forma selectiva dentro de células u órganos específicos, aumentan de este modo la administración dirigida del fármaco (véase, p. ej., Ranade, V. 1989, J Clin Pharmacol. 29:685).

Restos ejemplares dirigidos incluyen folato o biotina (véase, p. ej., la patente de EE.UU. 5.416.016); manósidos (Umezawa, *et al.*, 1988, Biochem Biophys Res Comm. 153:1038); anticuerpos (Bloeman, P. *et al.*, 1995, FEBS Lett. 357:140; Owais, M., *et al.*, 1995, Antimicrob Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A tensioactiva (Briscoe, *et al.*, 1995, Am J Physiol. 1233:134), diferentes especies de las cuales comprenden las composiciones, así como componentes, de los agentes activos; psi 20 (Schreier, *et al.*, 1994, J Biol Chem. 269:9090); véanse también Keinänen, K. y Laukkanen, M., 1994, FEBS Lett. 346:123; Killion, J. y Fidler, I., 1994, Immunomethods 4:273. Los agentes activos pueden formularse en liposomas; más preferiblemente los liposomas incluyen un resto dirigido. Lo más preferible, los agentes terapéuticos activos en los liposomas se administran por inyección de bolo hasta un lugar próximo al tumor.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, nebulizadores, aerosoles o aceites, aparatos transdérmicos, polvos de uso externo y similares. Estas composiciones pueden prepararse vía los métodos convencionales que contienen el agente activo. De este modo, éstos también pueden comprender vehículos y aditivos convencionales tales como conservantes, solventes para ayudar en la penetración del fármaco, emolientes en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleico para lociones. Tales vehículos pueden estar presentes como desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 98% de la composición. Más habitualmente formarán hasta aproximadamente un 80% de la composición. Como ilustración solamente, una crema o pomada se prepara mezclando cantidades suficientes de material hidrofílico y agua, conteniendo entre aproximadamente 5-10% en peso del agente activo, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada que tiene la consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos que tienen el propósito de permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el agente activo puede distribuirse a partir del parche mediante ionoforesis.

5 Para aplicaciones en tejidos externos, por ejemplo la boca y piel, las composiciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el agente activo puede emplearse bien con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Alternativamente, el agente activo puede formularse como una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen grageas, comprimidos y lavados bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en el ojo incluyen gotas de ojos en las que el agente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. Éstas también incluyen pomadas o cremas tópicas como anteriormente.

20 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en las que el vehículo es un sólido se presentan más preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Vehículos adecuados incluyen mantequilla de cacao u otro glicérido o materiales empleados frecuentemente en la técnica, y los supositorios pueden estar convenientemente formados por mezcla de la combinación con el(los) vehículo(s) ablandador(es) o fundidor(es) seguido(s) por moldes de refrigeración y moldeo. Éstas también pueden administrarse como enemas.

25 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o composiciones pulverizadas. Éstas pueden comprender emolientes o bases según se emplean comúnmente en la técnica.

El empleo de al menos un polipéptido RAIG1 en la preparación de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma puede proporcionarse. Preferiblemente, polipéptidos RAIG1 recombinantes pueden emplearse en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma. Particularmente, se proporciona un polipéptido RAIG1 fusionado a otro polipéptido, tal como el dominio de transducción de la proteína HIV/Tat, la cual facilita la entrada de la proteína de fusión dentro de una célula (Asoh, S., *et al.*, 2002, Proc Natl Acad Sci USA, 99:17107-17112) para usar en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma.

40 Los polipéptidos RAIG1 recombinantes pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica a partir de células hospedantes fabricadas por ingeniería genética que comprenden sistemas de expresión. En consecuencia, el presente invento también se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polipéptido RAIG1 o ácido nucleico RAIG1, a células hospedantes que están fabricadas por ingeniería genética con tales sistemas de expresión y a la producción de polipéptidos RAIG1 mediante técnicas recombinantes. Los sistemas de traducción libres de células también pueden emplearse para producir polipéptidos recombinantes (p. ej., lisado de reticulocitos de conejo, lisado de germen de trigo y los kits de transcripción y traducción SP6/T7 *in vitro* T&T y RTS 100 *E. coli* HY de Roche Diagnostics Ltd., Lewes, RU y el sistema TNT Quick de transcripción/traducción acopladas de Promega RU, Southampton, RU).

50 Para producir el polipéptido recombinante RAIG1, las células hospedantes pueden fabricarse por ingeniería genética para incorporar sistemas de expresión o partes de los mismos para ácidos nucleicos RAIG1. Tal incorporación puede llevarse a cabo empleando métodos bien conocidos en la técnica, tales como transfección por fosfato cálcico, transfección mediada por DEAD-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga de raspado, introducción balística o infección (*véase*, p. ej., Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, 1986 y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989).

60 Ejemplos representativos de células hospedantes incluyen células bacterianas, p. ej., células de *E. coli*, *Streptococci*, *Staphylococci*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células de hongos tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células de animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, HEK 293, BHK y células de melanoma de Bowes; y células de plantas.

65 Puede usarse una amplia variedad de sistemas de expresión tales como, y sin limitación, sistemas derivados de cromosomas, episomas y virus, p. ej., vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levaduras, de virus tal como baculovirus, papova virus como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de éstos, tal como los derivados de plásmidos y elementos genéticos de bacteriófagos, como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones control que regulan, así como engendran expresión. Generalmente, puede emplearse cualquier sistema o vector que es capaz de

mantener, propagar o expresar un ácido nucleico para producir un polipéptido en un hospedante. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse dentro de un sistema de expresión por cualquier variedad de las técnicas rutinarias y bien conocidas, tales como las divulgadas en Sambrook *et al.*, *supra*. Pueden incorporarse en el polipéptido RAIG1 señales de secreción apropiadas para permitir la secreción de la proteína traducida dentro del lumen del retículo endoplásmico, del espacio periplásmico o del medio extracelular. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido RAIG1 o pueden ser señales heterólogas.

Los polipéptidos RAIG1 pueden proporcionarse de forma aislada e incluir polipéptidos RAIG1 que se han purificado al menos parcialmente. Los polipéptidos RAIG1 pueden producirse empleando métodos recombinantes, producirse sintéticamente o producirse por una combinación de estos métodos. Los polipéptidos RAIG1 pueden proporcionarse en forma substancialmente pura, es decir, libres, substancialmente, de otras proteínas. De este modo, un polipéptido RAIG1 puede proporcionarse en una composición en la que es el componente presente predominante (es decir, está presente en un nivel de al menos el 50%; preferiblemente al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95%; cuando se determina en base a peso/peso, excluyendo los disolventes o excipientes).

Si se va a expresar un polipéptido RAIG1 para usarse en ensayos de escrutinio basados en células, es preferible que el polipéptido se produzca en la superficie celular. En este evento, las células pueden recogerse antes de emplearse en el ensayo de escrutinio. Si el polipéptido RAIG1 se segrega en el medio, el medio puede recuperarse para aislar dicho polipéptido. Si se produce intracelularmente, las células deben lisarse primero antes de que el polipéptido RAIG1 se recupere.

Los polipéptidos RAIG1 pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes por métodos bien conocidos, incluida precipitación por sulfato de amonio o etanol, extracción en ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de tamizado molecular, métodos de centrifugación, métodos de electroforesis y cromatografía de lectina. Se emplea una combinación de estos métodos. Alternativamente, se emplea cromatografía líquida de alta resolución. Alternativamente, puede emplearse un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido RAIG1 para vaciar una muestra que contiene un polipéptido RAIG1 de dicho polipéptido o para purificar dicho polipéptido. Pueden emplearse técnicas bien conocidas en el campo del replegado hasta regenerar las conformaciones nativa o activa de los polipéptidos RAIG1 cuando los polipéptidos se han desnaturalizado durante el aislamiento y/o la purificación.

El empleo de al menos un ácido nucleico de RAIG1 en la preparación de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma puede proporcionarse.

Las moléculas de ácido nucleico que hibridan RAIG1 pueden emplearse como moléculas antisentido, para alterar la expresión de los polipéptidos RAIG1 al unirse a los ácidos nucleicos complementarios de RAIG1 y pueden emplearse en el tratamiento o prevención del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma. Un ácido nucleico antisentido incluye un ácido nucleico de RAIG1 capaz de hibridar en virtud de alguna complementariedad de secuencia a una parte de un ARN (preferiblemente ARNm) que codifica un polipéptido RAIG1. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una región codificante y/o no codificante de un ARNm que codifica dicho polipéptido. Más preferiblemente, la expresión de un polipéptido RAIG1 se inhibe mediante el empleo de ácidos nucleicos antisentido. De este modo, puede proporcionarse el uso terapéutico o profiláctico de ácidos nucleicos que comprenden al menos ocho nucleótidos que son antisentido a un gen o ADNc que codifica un polipéptido RAIG1.

Los síntomas del carcinoma pueden mejorarse por disminución del nivel o actividad de un polipéptido RAIG1 empleando secuencias génicas que codifican un polipéptido, según se define en la presente memoria en conjunción con métodos bien conocidos de “knock-out” génico, ribozimas o triple hélice para disminuir la expresión génica del polipéptido. En esta aproximación, las moléculas de ribozima o triple hélice se emplean para modular la actividad, expresión o síntesis del gen y, por tanto, para mejorar los síntomas del carcinoma. Tales moléculas pueden diseñarse para reducir o inhibir la expresión de un gen diana, mutante o no mutante. Las técnicas de producción y uso de tales moléculas son bien conocidas para los expertos en el campo.

La expresión endógena de polipéptido RAIG1 puede reducirse también por inactivación o “knocking out” del gen que codifica el polipéptido, o el promotor de tal gen, empleando recombinación homóloga dirigida (p. ej., véase Smithies, *et al.*, 1985, Nature 317:230-234; Thomas y Capecchi, 1987, Cell 51:503-512; Thompson *et al.*, 1989, Cell 5:313-321; y Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342:435-438). Por ejemplo, un gen mutante que codifica un polipéptido no funcional (o una secuencia de ADN completamente independiente) flanqueado por ADN homólogo al gen endógeno (bien las regiones codificantes o regiones reguladoras del gen que codifica el polipéptido) puede emplearse, con o sin un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable negativo, para transfectar células que expresan el gen diana *in vivo*. La inserción del constructo de ADN, vía recombinación homóloga dirigida, da como resultado la inactivación del gen diana.

El ácido nucleico puede administrarse vía terapia génica (véase, por ejemplo, Hoshida, T. *et al.*, 2002, Pancreas, 25:111-121; Ikuno, Y. 2002, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002, 43:2406-2411; Bollard, C, 2002, Blood 99:3179-3187; Lee E., 2001, Mol. Med. 7:773-782). La terapia génica se refiere a la administración a un individuo de un ácido

nucleico expresado o expresable. Cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica puede emplearse de acuerdo con el presente invento. En un aspecto, la composición farmacéutica comprende un ácido nucleico de RAIG1, dicho ácido nucleico es parte de un vector de expresión que expresa un polipéptido RAIG1 o proteína quimera del mismo en un hospedante adecuado. En particular, tal ácido nucleico tiene un promotor ligado operativamente a la región codificante del polipéptido, siendo dicho promotor inducible o constitutivo (y, opcionalmente, específico de tejido). Alternativamente, se emplea una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias codificantes y cualesquiera otras secuencias deseables están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un lugar deseado del genoma, proporcionando de este modo expresión intracromosómica del ácido nucleico (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342:435-438).

La administración del ácido nucleico RAIG1 en un paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o al vector que porta el ácido nucleico; esta aproximación se conoce como terapia génica *in vivo*. Alternativamente, la administración del ácido nucleico en el paciente puede ser indirecta, en cuyo caso las células se transforman primero con el ácido nucleico *in vitro* y entonces se trasplantan en el paciente; esta aproximación se conoce como terapia génica *ex vivo*.

Los ácidos nucleicos de RAIG1 pueden obtenerse empleando técnicas de clonaje y escrutinio convencionales a partir de una biblioteca de ADNc derivada de ARNm de células humanas, empleando análisis de secuencias etiqueta expresadas (EST, del inglés *expressed sequence tag*) (Adams, M. *et al.*, 1991, Science, 252:1651-1656; Adams, M. *et al.*, 1992, Nature 355:632-634; Adams, M. *et al.*, 1995, Nature, 377:supl:3-174). Los ácidos nucleicos de RAIG1 pueden obtenerse también a partir de fuentes naturales tales como bibliotecas de ADN genómicas o pueden sintetizarse empleando técnicas bien conocidas y disponibles comercialmente. Los ácidos nucleicos de RAIG1 que comprenden la secuencia codificante para los polipéptidos RAIG1 descritos anteriormente pueden emplearse para la producción recombinante de dichos polipéptidos. Los ácidos nucleicos de RAIG1 pueden incluir la secuencia codificante para el polipéptido maduro, por sí mismo; o la secuencia codificante para el polipéptido maduro en fase de lectura con otras secuencias codificantes, tales como las que codifican una secuencia líder o secretora, una secuencia pre, pro o prepro-proteína, una secuencia escindible u otras partes de un péptido de fusión, tales como una etiqueta de afinidad o una secuencia adicional que confiere estabilidad durante la producción del polipéptido. Las etiquetas de afinidad preferidas incluyen residuos múltiples de histidina (por ejemplo, véase Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824), una etiqueta FLAG, etiqueta HA o etiqueta myc. Los ácidos nucleicos de RAIG1 también pueden contener secuencias no codificantes 5' y 3', tales como secuencias transcritas no traducidas, señales de empalme y poliadenilación, lugares de unión a ribosomas y secuencias que estabilizan el ARNm.

Los derivados polipeptídicos de RAIG1, según se refiere en la parte b) anterior, pueden crearse por introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones nucleotídicas dentro de la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico de RAIG1, de modo que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos se introducen en la proteína codificada. Las técnicas estándares conocidas por aquellos expertos en la técnica pueden emplearse para introducir mutaciones, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, se realizan sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno o más aminoácidos predichos como no esenciales.

Un ácido nucleico de RAIG1 que codifica un polipéptido RAIG1, incluyendo homólogos y ortólogos de especies distintas de la humana, puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de escrutar una biblioteca apropiada bajo condiciones de hibridación astringentes con una sonda marcada que tiene la secuencia de un ácido nucleico de RAIG1 según se describe en a)-c) anterior, y se aísla el ADNc de cadena completa y los clones genómicos que contienen dicha secuencia de ácido nucleico. Tales técnicas de hibridación se conocen bien en el campo. Un ejemplo de condiciones de hibridación astringentes es donde la hibridación intentada se lleva a cabo a una temperatura desde aproximadamente 35°C hasta aproximadamente 65°C, empleando una solución salina de aproximadamente 0,9 M. Sin embargo, la persona experta será capaz de variar tales condiciones según sea apropiado para tener en cuenta variables como la longitud de la sonda, la composición de las bases, el tipo de iones presentes, etc. Para un grado alto de selectividad se emplean condiciones relativamente astringentes, como condiciones de baja sal o de temperatura elevada, para formar los dúplex. Condiciones altamente astringentes incluyen hibridación a ADN unido a filtro en 0,5 M de NaHPO₄, 7% de sodio dodecil sulfato (SDS), 1 mM de EDTA a 65°C y lavado en 0,1 x SSC/0,1% de SDS a 68°C (Ausubel F.M. *et al.*, eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, vol. I, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley y Sons, Inc., Nueva York, en el apartado 2.10.3). Para algunas aplicaciones, se requieren condiciones menos astringentes para la formación del dúplex. Condiciones moderadamente astringentes incluyen lavado en 0,2 x SSC/0,1% de SDS a 42°C (Ausubel *et al.*, 1989, *supra*). Las condiciones de hibridación pueden hacerse más astringentes mediante la adición de cantidades crecientes de formamida para desestabilizar el dúplex híbrido. De este modo, las condiciones de hibridación particulares pueden ser fácilmente manipuladas y se elegirán generalmente según convenga. En general, las temperaturas convenientes de hibridación en presencia de 50% de formamida son: 42°C para una sonda que es 95-100% idéntica al fragmento de un gen que codifica un polipéptido según se define en la presente memoria, 37°C para una identidad del 90-95% y 32°C para un 70-90% de identidad.

Uno experto en la técnica entenderá que, en muchos casos, una secuencia de ADNc aislada estará incompleta, en tanto que la región codificante para el polipéptido está interrumpida en el extremo 5' del ADNc. Esto es una consecuencia de la transcriptasa reversa, una enzima que tiene inherentemente baja procesividad (una medida de la capacidad de la enzima de permanecer unida al molde durante la reacción de polimerización), y no logra completar una copia de ADN del molde de ARNm durante la síntesis de la 1ª cadena de ADNc.

Los métodos para obtener ADNc de cadenas completas o para extender ADNc cortos se conocen bien en la técnica, por ejemplo, RACE (siglas en inglés de rápida amplificación de los extremos de ADNc; p. ej., Frohman *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:8998-9002). Modificaciones recientes de la técnica, ejemplificadas por la tecnología Marathon™ (Clontech Laboratorios, Inc.) han simplificado significativamente la búsqueda de ADNc más largos.

Esta tecnología emplea ADNc preparados a partir de ARNm extraído de un tejido elegido seguido por la ligación de una secuencia adaptadora sobre cada extremo. Entonces se lleva a cabo la PCR para amplificar el extremo 5' que falta del ADNc empleando una combinación de cebadores oligonucleótidos específicos de gen y específicos de adaptador. La reacción de PCR se repite entonces empleando cebadores anidados que se han diseñado para aparearse con el producto amplificado, típicamente un cebador específico del adaptador que se aparea en 3' más allá de la secuencia adaptadora y un cebador específico de gen que se aparea en 5' más allá de la secuencia conocida del gen. Los productos de esta reacción pueden analizarse entonces mediante secuenciación de ADN y un ADNc de extensión completa se construye bien por unión del producto directamente al ADNc existente para dar una secuencia completa o llevando a cabo una PCR de extensión completa separada empleando la nueva información de la secuencia para el diseño del cebador en 5'.

Puede proporcionarse la composición de una vacuna de uso en el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma. Un polipéptido o ácido nucleico RAIG1, según se describe con anterioridad, puede usarse en la producción de vacunas para el tratamiento del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma. Tal material puede ser antigénico y/o inmunogénico. El antigénico incluye una proteína o ácido nucleico que es capaz de usarse para generar anticuerpos o en realidad es capaz de inducir una respuesta humoral en un individuo. El material inmunogénico incluye una proteína o ácido nucleico que es capaz de producir una respuesta inmune en un individuo. De este modo, en el último caso, la proteína o ácido nucleico puede ser capaz de generar no sólo una respuesta humoral, sino, además, una respuesta inmune no basada en anticuerpos, es decir, una respuesta celular o humoral. Se conoce bien en la técnica que es posible identificar las regiones de un polipéptido antigénico o inmunogénico que son responsables de la antigenicidad o inmunogenicidad de dicho polipéptido, es decir, un epítipo o epítomos. Las características de los aminoácidos y los péptidos, bien conocidas para los expertos, pueden emplearse para predecir el índice antigénico (una medida de la probabilidad de que una región sea antigénica) de un polipéptido RAIG1. Por ejemplo, aunque sin limitación, puede emplearse el programa "Peptidestructure" (Jameson y Wolf, 1988, CABIOS, 4(1):181) y una técnica denominada "Threading" (Altuvia Y. *et al.*, 1995, J. Mol. Biol. 249:244). De este modo, los polipéptidos RAIG1 pueden incluir uno o más de tales epítomos o ser suficientemente similares a tales regiones como para retener sus propiedades antigénicas/inmunogénicas.

Dado que un polipéptido o un ácido nucleico puede descomponerse en el estómago, la composición de la vacuna puede administrarse preferiblemente de forma parenteral (p. ej., inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica).

En consecuencia, puede proporcionarse:

- a) el uso de tal vacuna para inducir una respuesta inmune en un individuo; y
- b) un método para tratar el carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma, en un individuo, o para vacunar a un individuo frente al carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma, lo que comprende la etapa de administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido o ácido nucleico RAIG1, preferiblemente como una vacuna.

Puede proporcionarse un método para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de colon y/u osteosarcoma en un individuo, lo que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido RAIG1, en el que el anticuerpo está conjugado con un resto terapéutico o medicamentoso. Pueden usarse anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos RAIG1 para inhibir la actividad de dichos polipéptidos.

En consecuencia, se proporciona el uso de un anticuerpo que reconoce de forma específica un polipéptido RAIG1 para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de colon y/u osteosarcoma, en el que el anticuerpo se conjuga con un resto terapéutico o medicamentoso.

Un anticuerpo conjugado con un resto terapéutico puede emplearse como composición terapéutica que se administra sola o en combinación con un(os) factor(es) citotóxico(s) y/o citoquina(s). En particular, los anticuerpos del invento se conjugan con un agente terapéutico o resto medicamentoso para modificar una respuesta biológica dada. El agente terapéutico o resto medicamentoso no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto medicamentoso puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales restos pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, una toxina como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o la toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador plasminógeno de tejidos, un agente trombótico o un agente angiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina; o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF, del inglés *granulocyte macrophage colony stimulating factor*), factor estimulante

de colonias de granulocitos (G-CSF, del inglés *granulocyte colony stimulating factor*), factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*) u otros factores de crecimiento. Otros restos terapéuticos pueden incluir radionucleidos tales como ^{111}In e ^{90}Y ; antibióticos, p. ej., caliqueamicina; o fármacos tales como, aunque no limitados a, alquilfosfolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con los anticuerpos se conocen bien en la técnica (véase, p. ej., Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* eds., 1985, pág. 243-56, ed. Alan R. Liss, Inc; Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery*, 2ª ed. Robinson *et al.* eds., 1987, pág. 623-53, Marcel Dekker, Inc.; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*; Pinchera *et al.*, 1985, eds., pág. 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabelled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, pág. 303-16, Academic Press; Thorpe *et al.*, 1982 "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik *et al.*, 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83:67-123).

Un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado (véase la patente de EE. UU. 4.676.980).

Pueden proporcionarse las proteínas de fusión de los anticuerpos (o fragmentos funcionalmente activos del mismo), por ejemplo, pero sin limitación, donde el anticuerpo o fragmento de éste se fusiona vía un enlace covalente (p. ej., un enlace peptídico) en el N-terminal o C-terminal opcionalmente, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma; preferiblemente al menos una parte de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína). Preferiblemente, el anticuerpo o su fragmento está ligado a la otra proteína en el N-terminal del dominio constante del anticuerpo. Según se establece anteriormente, tales proteínas de fusión pueden facilitar la depleción o purificación de un polipéptido según se describe en la presente memoria, aumentar la vida media *in vivo* e intensificar la administración de un antígeno a través de una barrera epitelial hasta el sistema inmune.

Los polipéptidos RAIG1 o las células que los expresan pueden emplearse entonces para producir anticuerpos, p. ej., los que reconocen específicamente dichos polipéptidos RAIG1. Reconocer específicamente o unirse específicamente significa que los anticuerpos tienen mayor afinidad por los polipéptidos RAIG1 que por otros polipéptidos. Los anticuerpos generados contra un polipéptido RAIG1 pueden obtenerse administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente a un animal no humano, empleando protocolos rutinarios y bien conocidos.

En una realización adicional, el presente invento proporciona el empleo de un anticuerpo que se une específicamente al menos a un polipéptido RAIG1 para escrutar el cáncer de mama, cáncer de colon y/o osteosarcoma en un individuo o para monitorizar la eficacia de una terapia anti-cáncer de mama, anti-cáncer de colon y/o anti-osteosarcoma.

Los anticuerpos de RAIG1 pueden emplearse, entre otras cosas, para el diagnóstico del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/o osteosarcoma, mediante la detección de la expresión de RAIG1 en tejido humano y/o en subfracciones del mismo, por ejemplo, aunque sin limitación, subfracciones de membrana, citosólicas o nucleares.

Los anticuerpos de RAIG1 incluyen fragmentos, derivados o análogos funcionalmente activos y pueden ser, aunque no están limitados a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanizados o quimeras, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotipos (anti-Id) y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR, del inglés *complementarity determining regions*) de las especies no humanas y una región entramado de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., la patente de EE. UU. 5.585.089). Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y partes activas inmunológicamente de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un lugar de unión a antígeno que une específicamente un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulinas del invento pueden ser de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de célula B humana (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today*, 4:72) y la técnica del EBV-hibridoma (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pág. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos quimeras son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulinas que se han fabricado por ingeniería genética, de modo que los genes de la cadena ligera y pesada se componen de segmentos de genes de inmunoglobulinas que pertenecen a diferentes especies. Estos anticuerpos quimera son probablemente menos antigénicos. Los anticuerpos biespecíficos pueden construirse mediante métodos conocidos en la técnica (Milstein *et al.*, 1983, *Nature* 305:537-539; documento WO 93/08829, Trautner *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659).

Los anticuerpos para uso en el presente invento pueden generarse también empleando varios métodos de exposición en fago conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman *et al.* (en J. Immunol. Methods, 1995, 182:41-50), Ames *et al.* (en J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough *et al.* (en Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic *et al.* (Gene. 1997, 187:9-18), Burton *et al.* (en Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) y en los documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y en las patentes de EE.UU. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108. Las técnicas para producir anticuerpos de cadena sencilla, tales como las descritas en la patente de EE.UU. 4.946.778 también pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla a polipéptidos NKCC1. También, ratones transgénicos u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, pueden usarse para expresar anticuerpos humanizados.

La detección de la interacción de un anticuerpo con un antígeno puede facilitarse por acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable, por ejemplo, aunque sin limitación, una enzima (como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, acetilcolinesterasa), un grupo prostético (como estreptavidina, avidina, biotina), un material fluorescente (como umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de amina de diclorotriazinilo, cloruro de dansilo, ficoeritrina), un material luminiscente (como luminol), un material bioluminiscente (como luciferasa, luciferina, aequorina), un nucleído radiactivo (como ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{99}Tc), un metal que emite positrones o un ión metálico paramagnético no radiactivo (véase la patente de EE.UU. 4.741.900).

Los anticuerpos del invento incluyen análogos y derivados que están modificados, por ejemplo, aunque sin limitación, por la adhesión covalente de cualquier tipo de molécula. Preferiblemente, dicha adhesión no impide la unión inmuno-específica.

En compendio, el invento además proporciona el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido RAIG1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de colon y/u osteosarcoma, en el que el anticuerpo está conjugado con un resto terapéutico o medicamentoso.

El invento se describirá ahora con referencia a los ejemplos siguientes, los cuales son meramente ilustrativos y no deberían de ningún modo interpretarse como limitantes del alcance del presente invento. Los ejemplos se refieren a las figuras en las que:

La Figura 1 muestra la secuencia de la proteína RAIG1 (RAIG1; AAC98506/O95357), SEQ ID n° 1. Los péptidos del espectro de masas en tándem están en fuente negrita, subrayada; los péptidos del espectro de masa MALDI están en fuente negrita).

La Figura 2 muestra la secuencia del ácido nucleico de RAIG1 (RAIG1; AF095448), SEQ ID n° 2.

La Figura 3 muestra la distribución del ARNm de RAIG1 en tejidos emparejados adyacentes normales (un número seguido por la letra N) y tumorales de mama (un número seguido por la letra T) de pacientes; los niveles de ARNm se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real y se expresaron como el número de copias ng^{-1} de ADNc.

La Figura 4 muestra la distribución del ARNm de RAIG1 en tejidos emparejados normales (un número seguido por la letra N) y tumorales de colon (un número seguido por la letra T); los niveles de ARNm se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real y se expresaron como el número de copias ng^{-1} de ADNc.

La Figura 5 muestra la distribución del ARNm de RAIG1 en 3 muestras de tejido emparejado normal (norm) y en 8 de tumores pancreáticos; los niveles de ARNm se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real y se expresaron como el número de copias ng^{-1} de ADNc.

La Figura 6 muestra la distribución del ARNm de RAIG1 en tejidos tumorales de mama. Se obtuvieron 40 muestras tumorales de pacientes con (barras negras) o sin (barras blancas) metástasis de los ganglios linfáticos; también se muestran 2 muestras de tejido de mama normal (barras grises). Los niveles de ARNm se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real y se expresaron como el número de copias ng^{-1} de ADNc.

La Figura 7 muestra la distribución del ARNm de RAIG1 en tejido normal de pulmón y en 6 muestras de cáncer de pulmón; los niveles de ARNm se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real y se expresaron como el número de copias ng^{-1} de ADNc.

La Figura 8 muestra la distribución del ARNm de RAIG1 en tejido normal de ovario y médula ósea, en líneas celulares de ovario y osteosarcoma, en 5 muestras de cistadenocarcinoma seroso de ovario, en 6 muestras de adenocarcinoma de ovario y en 3 muestras de osteosarcoma; los niveles de ARNm se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real y se expresaron como el número de copias ng^{-1} de ADNc.

ES 2 274 220 T3

Ejemplo 1

Aislamiento de proteína RAIG1 a partir de líneas celulares de mama, riñón, páncreas e hígado

- 5 Las proteínas de las membranas de las líneas celulares de mama, riñón, páncreas e hígado se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron.

Fraccionamiento crudo de las líneas celulares

10 1a - Cultivo celular

La línea celular de tumor pancreático HPAFII se cultivó en EMEM + 2 mM de glutamina + 1 mM de NaPyr + 1% de NEAA + 10% de FBS + 1,5 g/l de bicarbonato sódico. La línea celular de tumor pancreático Capan2 se cultivó en medio McCoy + 2 mM de glutamina + 10% de FBS + 1,5 g/l de bicarbonato sódico (Capan2).

- 15 Las líneas celulares de cáncer de mama T47D y MCF7pool se cultivaron en medio DMF12 que contenía 10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina.

- 20 La líneas celulares de cáncer hepático SK 3B2.1-7 y SKHep1pool se cultivaron en EMEM + 2 mM de glutamina + 1 mM de NaPyr + 1% de NEAA + 10% de FBS.

- 25 Las líneas celulares de cáncer renal empleadas fueron CAK12 + A498 + SW839 + CAK12pool. CAK12 se cultivó en medio McCoy + 2 mM de glutamina + 10% de FBS, las células A498 y SW839 se cultivaron en DMEM + 2 mM de glutamina + 10% de FBS. Todas las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada del 95% de aire y el 5% de dióxido de carbono.

1b - Fraccionamiento celular y generación de las membranas plasmáticas

- 30 Las preparaciones de membranas purificadas se aislaron a partir de las líneas celulares. Las células adherentes (2×10^8) se lavaron tres veces con PBS y se rasparon empleando un recolector celular de plástico. Las células se centrifugaron a 1.000 x g durante 5 min a 4°C y el sedimento de células se resuspendió en tampón de homogeneización (250 mM de sacarosa, 10 mM de HEPES, 1 mM de EDTA, 1 mM de vanadato y 0,02% de azida, inhibidores de proteasas). Las células se fraccionaron empleando un homogenizador de soporte de bolas (bola de 8,002 mm, del equipo HGM Lab) hasta que aproximadamente el 95% de las células se rompió. Las membranas se fraccionaron empleando el método descrito por Pasquali, C. *et al.*, (1999, J. Chromatography 722:89-102). Las células fraccionadas se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante postnuclear se estratificó sobre un colchón de 60% de sacarosa y se centrifugó a 100.000 x g durante 45 min. Las membranas se recogieron empleando una pipeta pasteur y se estratificaron sobre un gradiente previamente formado del 15% al 60% de sacarosa y se centrifugaron a 100.000 x g durante 17 horas. Las proteínas del gradiente de sacarosa fraccionado se migraron en un gel 1D del 4-20% (Novex) y se sometieron a transferencia Western; las fracciones que contenían fosfatasa alcalina y transferrina inmunorreactivas, pero no oxidoreductasa II o calnexina inmunorreactiva, se agruparon y representaron la fracción de membranas plasmáticas.

45 1c - Preparación de las fracciones de membrana plasmática para análisis en gel 1D

- Se identificaron las fracciones de membrana plasmática que presentaban inmunorreactividad a transferrina, pero sin inmunorreactividad a oxidoreductasa II ni calnexina. Estas fracciones de sacarosa se agruparon y se diluyeron al menos cuatro veces con 10 mM de HEPES, 1 mM de EDTA, 1 mM de vanadato, 0,02% de azida. La fracción diluida de sacarosa se añadió a un tubo SW40 o SW60 y se centrifugó a 100.000 x g durante 45 min con aceleración y desaceleración bajas. El sobrenadante se eliminó del sedimento de membranas y el sedimento se lavó tres veces con PBS-CM. El sedimento de membranas se solubilizó en 2% de SDS en 63 mM de TrisHCl a pH 7,4. Se realizó un ensayo de proteína seguido de la adición de mercaptoetanol (2% final), glicerol (10%) y se añadió azul de bromofenol (0,0025% final). Se empleó una concentración final de proteína de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la carga del gel 1D.

55 1d - Tecnología del gel 1D

La proteína o sedimentos de membranas se solubilizaron en tampón de muestra 1D (aproximadamente 1 mg/ml) y la mezcla se calentó a 95°C durante 5 min.

- 60 Las muestras se separaron empleando electroforesis en gel 1D sobre geles en gradiente 8-16% previamente montados adquiridos de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, RU). Una muestra que contenía 30-50 microgramos de las mezclas de proteínas obtenidas a partir de un extracto de detergente se aplicaron a los pocillos del gel de empaquetamiento empleando una micropipeta. Un pocillo que contenía marcadores de peso molecular (10, 15, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa) se incluyó para calibrar por interpolación del gel separador tras formación de la imagen. La separación de las proteínas se llevó a cabo aplicando una corriente de 30 mA al gel durante aproximadamente 5 horas o hasta que el colorante del marcador azul de bromofenol hubiese alcanzado el final del gel.

Después de la electroforesis las placas del gel se abrieron a palanca, el gel se colocó en un recipiente de fijador (10% de ácido acético, 40% de etanol, 50% de agua) y se agitó durante toda la noche. El gel entonces se imprimó durante 30 minutos por agitación en una solución de imprimación (7,5% de ácido acético, 0,05% de SDS en agua Milli-Q) seguido por incubación con un colorante fluorescente (0,06% de colorante OGS en 7,5% de ácido acético) con agitación durante 3 h. Se describe un colorante fluorescente preferido en la patente de EE.UU. 6.335.446. El rojo de Sypro (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón) es un colorante alternativo adecuado para este propósito.

Una imagen digital del gel teñido se obtuvo mediante escaneo en un escáner Storm (Molecular Dynamics Inc., EE.UU.) en el modo de fluorescencia azul. La imagen capturada se empleó para determinar el área del gel a cortar para la proteólisis en gel.

1e - Recuperación y análisis de las proteínas seleccionadas

Una calle vertical del gel correspondiente a 77 kDa se cortó empleando una cuchilla de escalpelo de acero inoxidable o un cortador de geles PEEK (OGS) que reduce secuencialmente la longitud de la calle del gel sin intentar recoger bandas de proteínas específicas.

Las proteínas se procesaron empleando digestión del gel con tripsina (tripsina modificada, Promega, Winsconsin, EE.UU.) para generar péptidos por digestión triptica. Las muestras recuperadas se dividieron en dos. Antes del análisis MALDI las muestras se desalaron y se concentraron empleando C18 Zip Tips™ (Millipore, Bedford, MA). Las muestras para la espectrometría de masa en tándem se purificaron empleando un sistema nano LC (LC Packings, Ámsterdam, Holanda) que incorpora material C18 SPE. Las agrupaciones de los péptidos recuperados se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (Voyager STR, Applied Biosystems, Framingham, MA) empleando un láser de 337 nm de longitud de onda para la desorción y el modo de análisis reflectron. Las agrupaciones se analizaron también por espectrometría de masas en tándem nano-LC (LC/MS/MS) empleando un espectrómetro de masas Micromass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF, Micromass, Altrincham, RU). Para la secuenciación parcial de los aminoácidos y la identificación de proteínas de la membrana de células de cáncer de hígado y pulmón se buscaron espectros de masa en tándem no interpretados de péptidos tripticos frente a una base de datos de proteínas de dominio público construida de entradas de proteínas en la base de datos no redundante mantenida por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, del inglés *National Centre for Biotechnology Information*) que está accesible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, empleando el programa de búsqueda SEQUEST (Eng *et al.*, 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989), versión v.C.1. Los criterios para la identificación de la base de datos incluyeron: la escisión específica de la tripsina y la detección de una serie de iones a, b e y en los péptidos devueltos de la base de datos. Tras la identificación de las proteínas a través de la correlación espectral-espectral empleando el programa SEQUEST, las masas detectadas en los espectros de masas MALDI-TOF se asignaron a los péptidos obtenidos por digestión triptica dentro de las proteínas identificadas. En los casos en los que no se pudieron identificar las secuencias de aminoácidos a través de la búsqueda de los péptidos obtenidos por digestión triptica con espectros MS/MS no interpretados empleando el programa SEQUEST, se interpretaron manualmente los espectros de masas en tándem de los péptidos empleando métodos conocidos en la técnica. (En el caso de interpretación de espectros de masas por fragmentación de baja energía de iones peptídicos véase Gaskell *et al.*, 1992, Rapid Commun. Mass Spectrom. 6:658-662). El método descrito en el documento WO 02/21139 se empleó también para interpretar los espectros de masas.

Se encontró que dos espectros en tándem (mostrados en negrita y subrayados en la Figura 1) y 1 correspondencia de masa (mostrada en negrita en la Figura 1) se emparejaban con los números de acceso al GenBank AF095448 y AAC98506, y al SwissProt O95357.

Ejemplo 2

Distribución en el tejido normal y elevación de RAIG1 en el tejido enfermo empleando análisis de RT-PCR cuantitativa (Taqman)

Se empleó RT-PCR en tiempo real para medir cuantitativamente la expresión de RAIG1 en una gama de tejidos tumorales y sus correspondientes controles. Se obtuvo la aprobación ética de las muestras de tejido normal y tumoral de mama en la cirugía (Universidad de Oxford, RU). Se obtuvieron muestras de colon, pulmón, cistadenocarcinoma seroso de ovario, adenocarcinoma de ovario, muestras de osteosarcoma metastásico y de tumor pancreático de Ardais Corp., Banco de Tejidos de Peterborough, Banco de Tejido de Investigación Humana, Hospital del Distrito de Peterborough, RU y Clinomics Biosciences Inc., MD. Los cebadores empleados para PCR fueron como sigue:

Sentido, 5' - ctcgtgaagaagagctatggtc - 3', (SEQ ID nº 3)

Antisentido, 5' - cactcttcaggacagagtttagc - 3' (SEQ ID nº 4)

Reacciones con 5 ng de ADNc, reactivos de detección de la secuencia verde SYBR (PE Biosystems) y cebadores sentido y antisentido se sometieron a ensayo en un sistema de detección de secuencias ABI7700 (PE Biosystems). Las condiciones de PCR fueron 1 ciclo a 50°C durante 2 min, 1 ciclo a 95°C durante 10 min y 40 ciclos a 95°C durante 15 s, 65°C durante 1 min. La acumulación del producto de PCR se midió en tiempo real como el incremento de la fluorescencia verde SYBR y los datos se analizaron empleando un programa Detector de Secuencia v1.6.3 (PE

Biosystems). Las curvas estándar relacionando el número de copias del molde inicial con la fluorescencia y el ciclo de amplificación se generaron empleando el producto amplificado de PCR como molde y se emplearon para calcular el número de copias de RAIG1 en cada muestra.

- 5 Se observaron niveles de expresión de RAIG1 relativamente bajos en los tejidos normales (Figuras 3-8; obsérvese que las escalas entre las Figuras son diferentes).

En contraste, los niveles de expresión de RAIG1 estaban aumentados en las muestras de tumor de mama relativo a sus controles correspondientes, con 5/7 muestras de tumor mostrando niveles de expresión enormemente elevados por ng de ADNc (Figura 3).

La expresión de RAIG1 se examinó en trece muestras de tumores de colon y se observó un aumento de la expresión en diez muestras relativas a una muestra control de colon normal, con dos muestras mostrando poco cambio y una muestra de tumor mostrando una pequeña reducción (Figura 4). En las muestras de tumores pancreáticos, se observó un aumento de la expresión del ARNm de RAIG1 en seis de las ocho muestras tumorales relativas al tejido pancreático control (Figura 5). En las muestras de tumores de pulmón, 4/6 muestras mostraron un aumento de la expresión de RAIG1 relativo a una muestra control de tejido de pulmón (Figura 7).

Además, se investigó la expresión de RAIG1 en muestras de tejido de mama de 20 pacientes con metástasis en los nódulos linfáticos y de 20 pacientes sin metástasis en los nódulos linfáticos. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, aunque una comparación con las muestras de tejido normal indica que RAIG1 está elevada en gran proporción de los pacientes con y sin metástasis en los nódulos linfáticos cuando se comparaban a los controles (Figura 6).

La expresión del ARNm de RAIG1 se examinó en 5 muestras de cistadenocarcinoma seroso de ovario, 6 muestras de adenocarcinoma de ovario, 3 muestras de osteosarcoma metastásico y en tejido y líneas celulares control. Se observó un aumento en los niveles de expresión del ARNm de RAIG1 en 2/6 de las muestras de adenocarcinoma de ovario y en 2/3 de las muestras de osteosarcoma metastásico, pero no se observó aumento en las muestras de cistadenocarcinoma seroso de ovario (Figura 8).

Estos datos demuestran que RAIG1 se expresa en muchas de las líneas celulares tumorigénicas, incluidas líneas celulares de mama, hígado y páncreas y que está aumentado en una selección de carcinomas, incluido cáncer de mama, cáncer de colon, adenocarcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas, lo que indica que RAIG1 es probablemente de utilidad como una diana del carcinoma. Este hallazgo no podía haberse predicho a partir de hallazgos previamente descritos sobre los niveles de expresión de ARNm de RAIG1; RAIG1 fue inicialmente identificado empleando expresión diferencial como el ADNc de un nuevo gen con niveles elevados de expresión del ARNm en tejidos de pulmón fetales y adultos (Cheng, Y. y Lotan, R., 1998, J. Biol. Chem. 273:35008-35015). Se ha publicado que su expresión se induce por el ácido transretinoico (ATRA). Tres de cinco líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello y cuatro de pulmón que tenían bajos niveles de ARNm de RAIG1 exhibieron aumento del ARNm tras tratamiento con ATRA (Cheng y Lotan, anteriormente), sin embargo, los niveles de expresión de RAIG1 demostrados por estos autores fueron extremadamente variables (desde niveles de expresión indetectables hasta elevados). Otro grupo ha descrito que RAIG1 muestra un patrón de expresión restringido con la máxima abundancia en el tejido pulmonar (Brauner-Osbourne, H. y Krosgaard-Larsen, P. 2000, Genomics, 65:121-128); en contraste, aunque los autores de la presente memoria encontraron niveles bajos de expresión en las muestras de tejido control no encontraron una expresión más elevada de ARNm de RAIG1 en tejido de pulmón normal, particularmente cuando los compararon con los niveles exhibidos por las muestras tumorales. Por tanto, estos resultados demuestran claramente un aumento de la expresión del ARNm de RAIG1 en una variedad de tipos de carcinoma, lo que indica su utilidad en el diagnóstico, tratamiento y/o profilaxis del carcinoma, p. ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y/u osteosarcoma, lo que no hubiera sido obvio a partir de la bibliografía.

REIVINDICACIONES

1. Un método para escrutar el cáncer de mama, el cáncer de colon y/o el osteosarcoma en un individuo, y/o para monitorizar la eficacia de una terapia anti-cáncer de mama, anti-cáncer de colon y/o anti-osteosarcoma, el cual comprende la etapa de detectar y/o cuantificar, en una muestra biológica obtenida de dicho individuo, un polipéptido RAIG1 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID nº 1, en el que dicho polipéptido RAIG1 se detecta y/o se cuantifica empleando un anticuerpo que se une específicamente a dicho polipéptido RAIG1.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de dicho polipéptido se compara con un intervalo de referencia determinado previamente o control.

3. El método, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo se inmoviliza sobre una fase sólida.

4. El empleo de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido RAIG1, según se define en la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer de mama, el cáncer de colon y/o el osteosarcoma, en el que el anticuerpo se conjuga con un resto terapéutico o medicamentoso.

5. El empleo, de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado o biespecífico, o un fragmento de unión al epítipo de uno cualquiera de ellos.

6. El empleo, de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que el resto terapéutico o medicamentoso es un radio-nucleido o una toxina.

7. Un método para escrutar el cáncer de mama, el cáncer de colon y/o el osteosarcoma en un individuo y/o para monitorizar la eficacia de una terapia anti-cáncer de mama, anti-cáncer de colon y/o anti-osteosarcoma, el cual comprende la etapa de detectar en una muestra biológica obtenida de dicho individuo un ácido nucleico que:

a) comprende o consiste en la secuencia de ADN de SEQ ID nº 2, o en su ARN equivalente;

b) tiene una secuencia que es complementaria a una secuencia de a); o

c) tiene una secuencia que codifica para un polipéptido, según se define en la reivindicación 1.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el nivel de dicho ácido nucleico se compara con un intervalo de referencia determinado previamente o control.

Figura 1

1 MATTVPDGCR NGLKSKYYRL CDKAEAWGIV LETVATAGVV TSVAFMLTLP ILVCKVQDSN
61 RRKMLPTQFL FLLGVLGIFG LTFAFIIGLD GSTGPTRFLL FGILFSICFS CLLAHAVSLT
121 KLVGRGRKPLS LLVILGLAVG FSLVQDVIAI EYIVLTMNRT NVNVFSELSA PRNEDFVLL
181 LTYVLFLMAL TFLMSSFTFC GSFTGWKRHG AHIYLTMLLS IAIWVAWITL LMLPDFDRRW
241 DDYFILSSALA ANGWVFLAY VSPEFWLLTK QRNPMDYPVE DAFCKPQLVK KSYGVENRAY
301 SQEEITQGFE ETGDTLYAPY STFQLOLQNP PQKEFSIPRA HANPSPYKDY EVKKEGS

Figura 2

```

1  ccaaggtctc  cccagcact  gaggagctcg  cctgctgcc  tcttgccgc  ggggaagcagc
61  accaagttca  cggccaacgc  cttggcacta  ggggtccagaa  tggctacaac  agtccctgat
121  ggttgccgca  atggcctgaa  atccaagtac  tacagacttt  gtgataaggc  tgaagcttgg
181  ggcacgtcc  tagaaacggc  ggccacagcc  ggggttgtga  cctcggtygc  cttcatgtcc
241  actctcccga  tctcgtctg  caaggtgcag  gactccaaca  ggcgaaaaat  gctgcctact
301  cagtttctct  tctcctggg  tgtgttggg  atctttggcc  tcaccttcgc  cttcatcacc
361  ggactggacg  ggagcacagg  gccacacgc  ttcttctct  ttgggatcct  cttttccacc
421  tgcttctct  gcctgctgg  tcatgctgt  agtctgacca  agctcgtccg  ggggaggaag
481  cccctttccc  tgttggtgat  tctgggtctg  gccgtgggct  tcagcctagt  ccaggatgtt
541  atcgtctatt  aatatattgt  cctgacctg  aataggacca  acgtcaatgt  cttttctgag
601  ctttccgctc  ctgctcgcaa  tgaagacttt  gtctctctgc  tcacctacgt  cctcttcttg
661  atggcgctga  cttctctcat  gtctctctc  accttctgtg  gttccttcac  gggctggaag
721  agacatgggg  cccacatcta  cctcacgatg  ctctctcca  ttgccatctg  ggtggcctgg
781  atcaccctgc  tcatgcttcc  tgactttgac  cgcaggtygg  atgacaccat  cctcagctcc
841  gccttggtcg  ccaatggctg  ggtgttcctg  ttggcttatg  ttagtcccga  gttttggctg
901  ctcaaaagc  aacgaaaccc  catggattat  cctgttgagg  atgtttctg  taaacctcaa
961  ctctgaaga  agagctatgg  tgtggagaac  agagcctact  ctcaagagga  aatcactcaa
1021  ggttttgaag  agacagggga  cagctctat  gccccctatt  ccacacattt  tcagctgcag
1081  aaccagctc  cccaaaagga  attctccatc  ccacgggccc  acgcttggtc  gagcccttac
1141  aaagactatg  aagtaaagaa  agagggcagc  taactctgtc  ctgaagagtg  ggacaaatgc
1201  agccggggcg  cagatctagc  gggagctcaa  agggatgtgg  gcgaaatctt  gagtcttctg
1261  agaaaactgt  acaagacact  acgggaacag  tttgcctccc  tcccagctc  aaccacaatt
1321  cttccatgct  ggggctgatg  tgggctagta  agactccagt  tcttagaggc  gctgtagtat
1381  tttttttttt  ttgtctcacc  ctttggtacc  ttcttttaag  tgggagtctc  aggcaactca
1441  agtttagacc  cttactcttt  ttgtttgttt  tttgaaacag  gatcttgctc  tgtcaccag
1501  gcttgagtgc  agtggtgca  tcacagccca  gtgcagctc  gaccacctgt  gctcaagcaa
1561  tcctcccatc  tccatctccc  aaagtgtgg  gatgacaggc  gtgagccaca  gctccagcc
1621  taggccctta  atcttgctgt  tattttccat  ggactaaagg  tctgggtcac  tgagctcacg
1681  ctggctcaca  cagctctagg  ggcctgtctc  tctaactcac  agtgggtttt  gtgaggctct
1741  gtggcccaga  gcagacctgc  atatctgagc  aaaaatagca  aaagcctctc  tcagcccact
1801  ggctgaatc  tacactggaa  gccacttgc  tggcaccccc  gctcccacac  cttcttggc
1861  tgggtaggag  aggctaaaga  tcacctaaa  ttactcacc  tctctagtgc  tgcctcacat
1921  tgggctcag  cagctcccca  gcaccaattc  acaggtcacc  cctctcttct  tgcactgtcc
1981  ccaaacttgc  tgtcaattcc  gagatctaata  ctccccctac  gctctgccag  gaattcttcc
2041  agacctcact  agcacaagcc  cgggtgtctc  ttgtcaggag  aatttgtaga  tcattctcac
2101  ttcaaatctc  tggggctgat  acttctctca  tcttgacccc  caacctctgt  aaatagattt
2161  accgcatctt  cggctgcatt  ctgtaagtgg  gcatggctc  ctaatggagg  agtgttcatt
2221  gtataataag  ttattcacct  gagtatgcaa  taaagatgtg  gtggccactc  tttcatgggtg
2281  gtggcagcaa  aaaaaaaaaa  aa

```

Figura 3

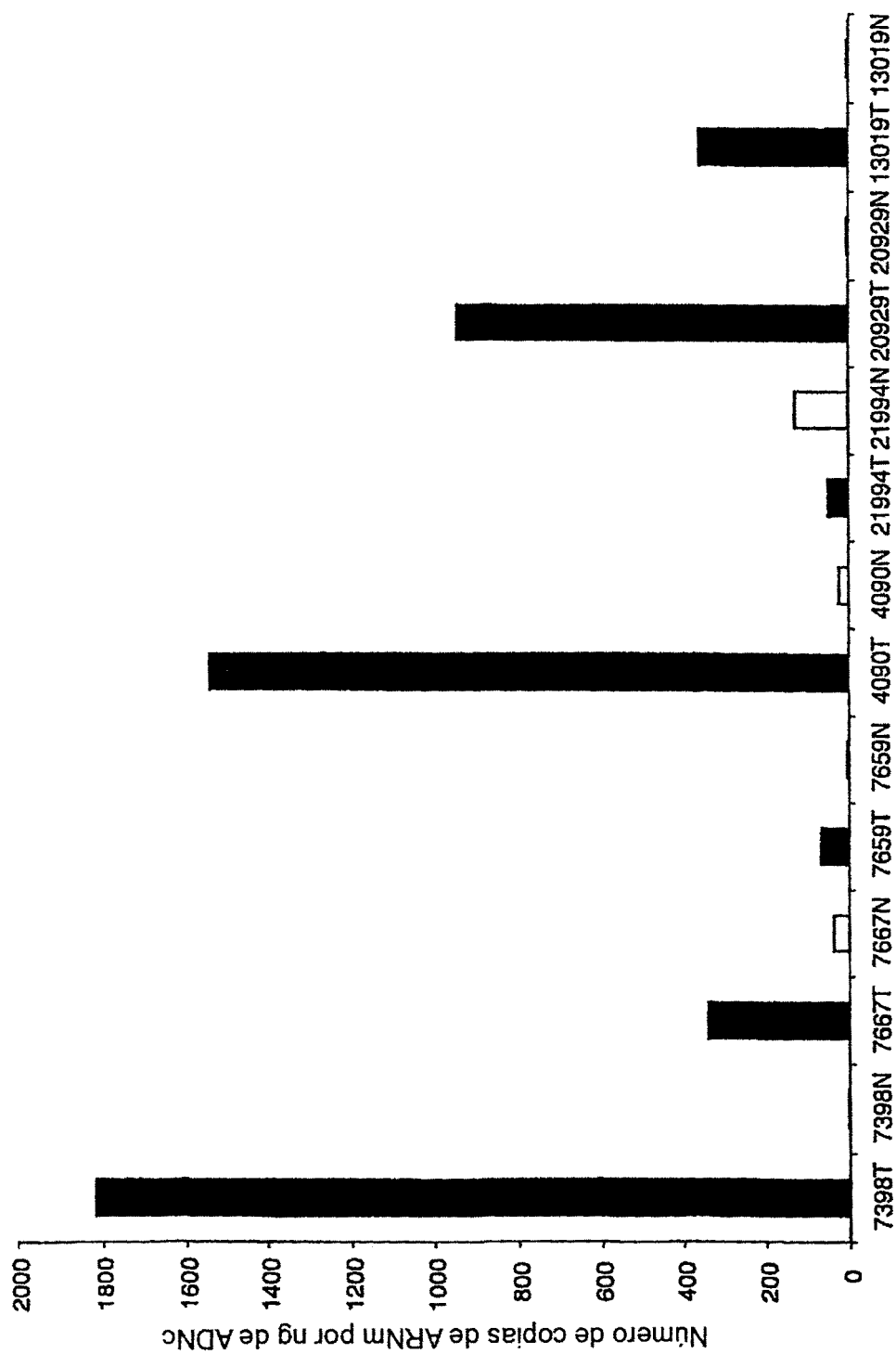


Figura 4

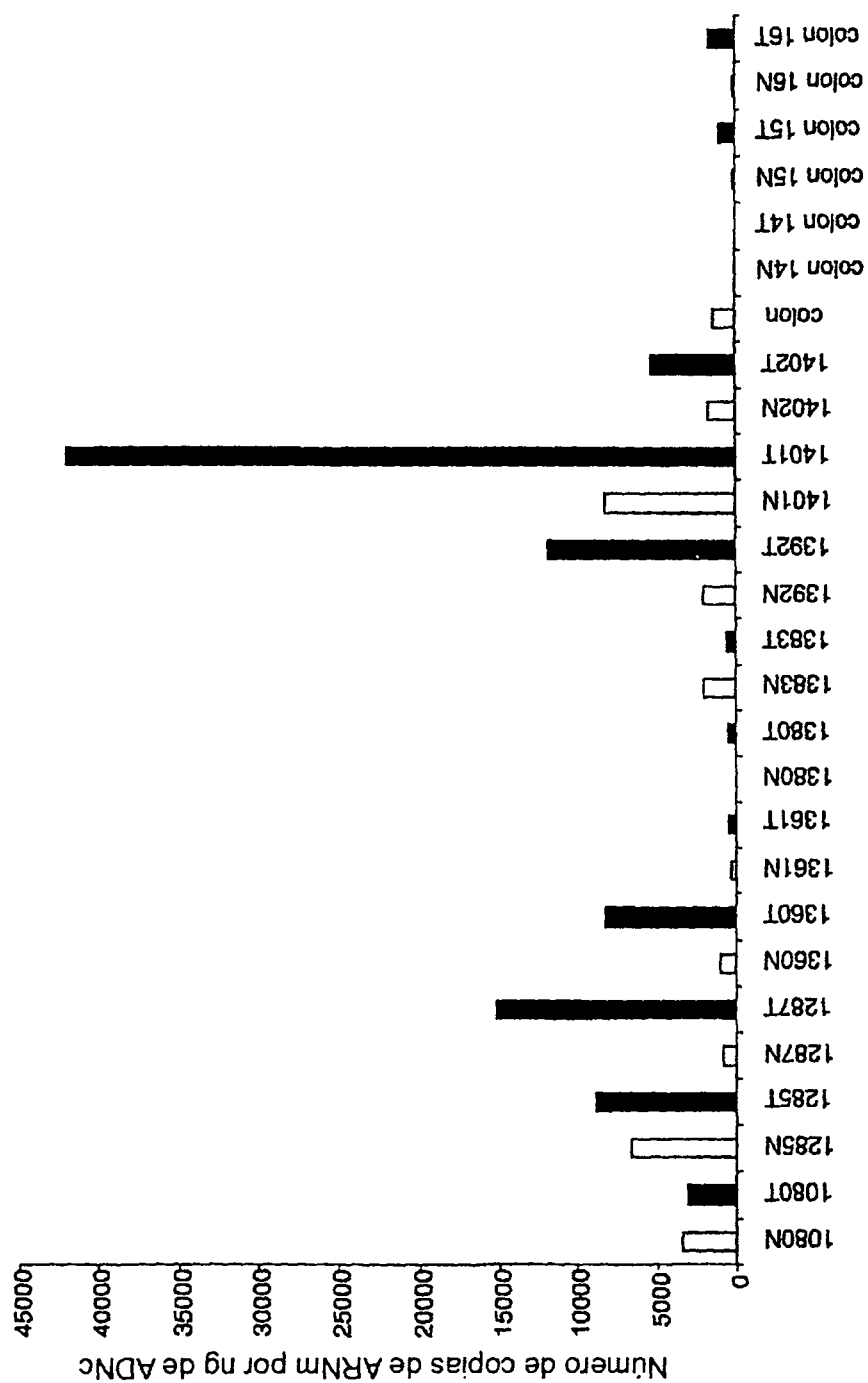


Figura 5

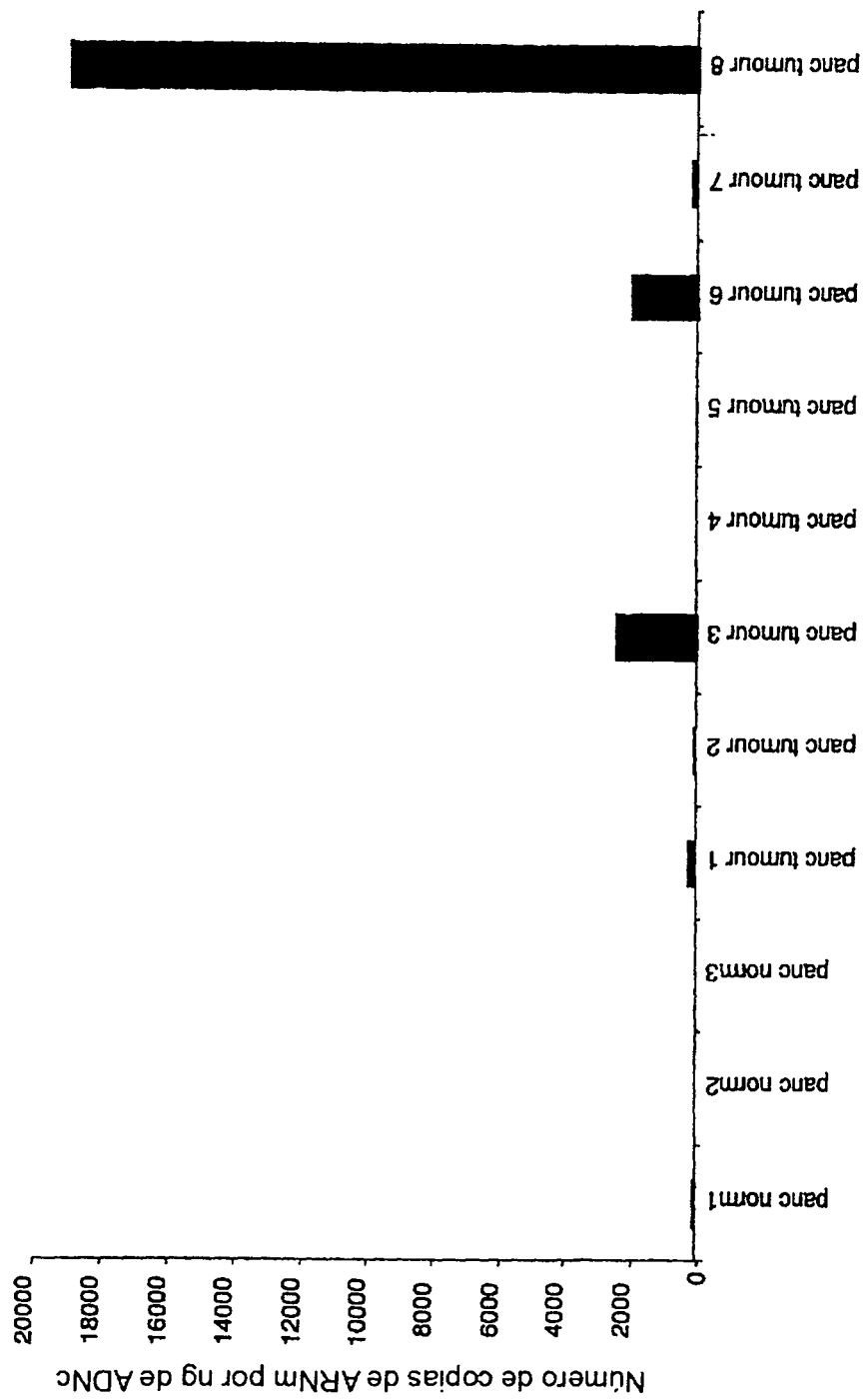


Figura 6

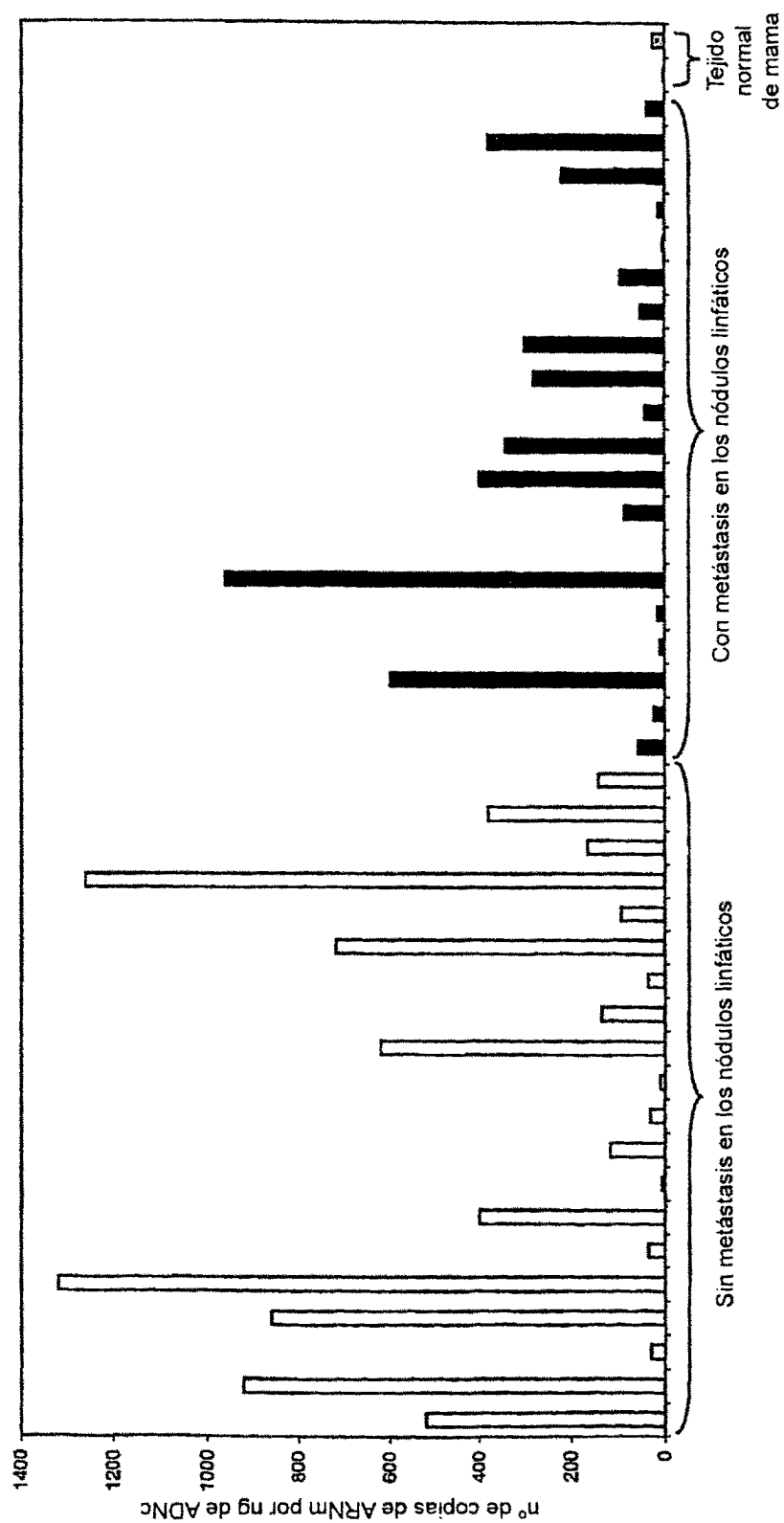


Figura 7

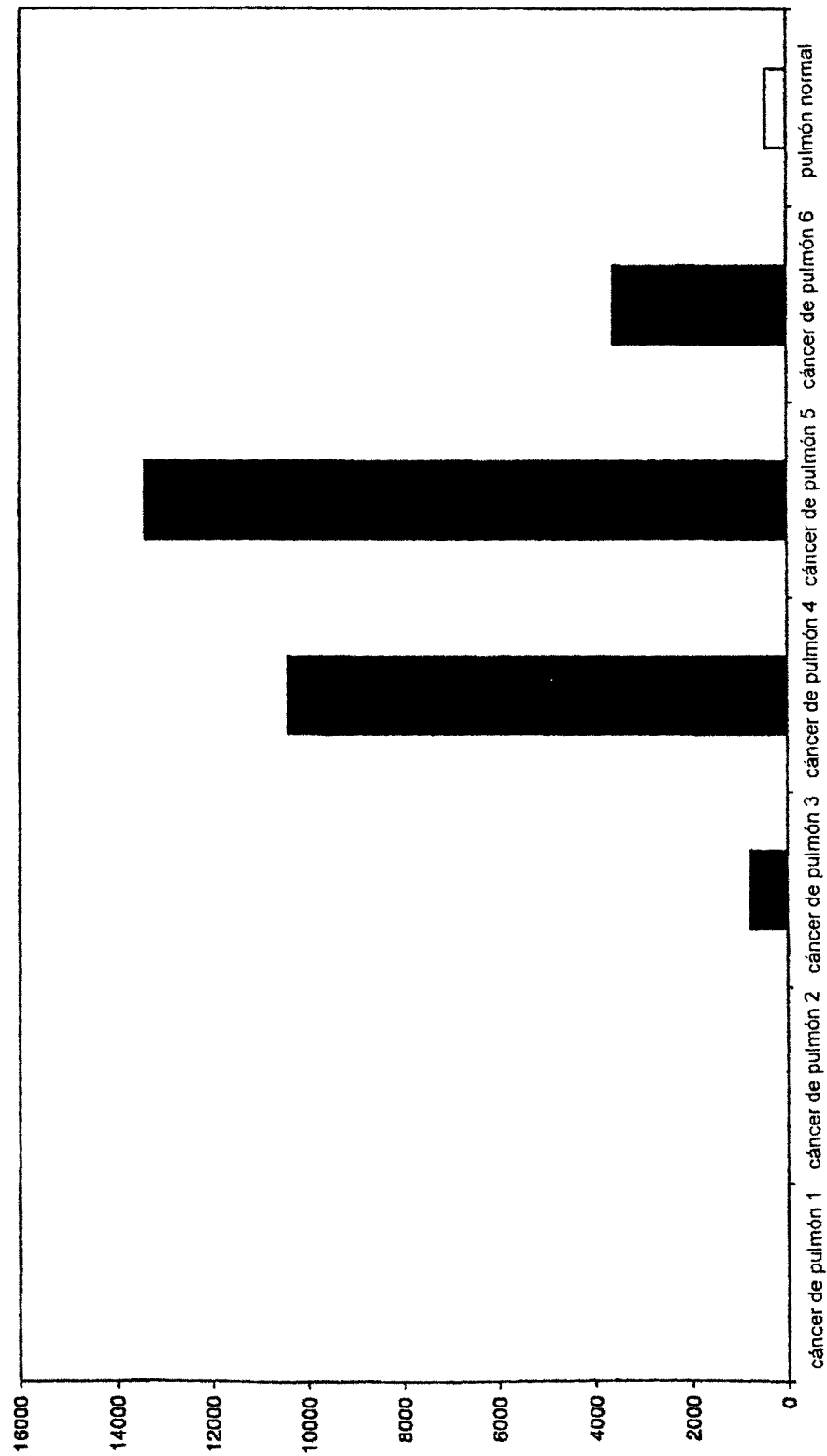
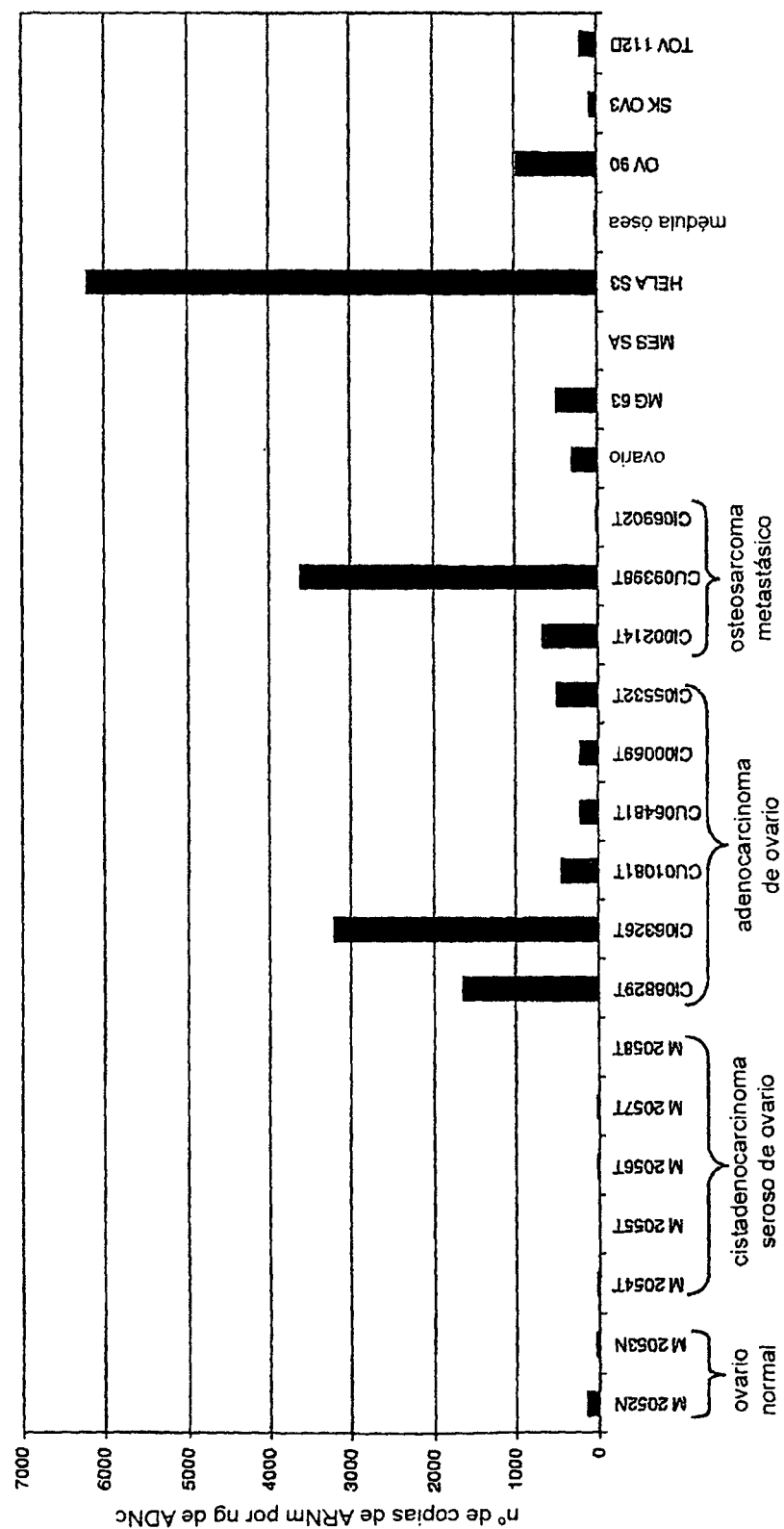


Figura 8



ES 2 274 220 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Oxford GlycoSciences (UK) Ltd
 Terrett, Jonathan A
 5
 <120> Una proteína implicada en el carcinoma
 <130> P0180-WO01
 10
 <150> GB0208331.9
 <151> 2002-04-11
 15
 <150> GB0221538.2
 <151> 2002-09-17
 <160> 4
 20
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 25
 <211> 357
 <212> Proteína
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 1

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

ES 2 274 220 T3

	Arg Phe Phe Leu Phe Gly Ile Leu Phe Ser Ile Cys Phe Ser Cys Leu	
	100	105 110
5	Leu Ala His Ala Val Ser Leu Thr Lys Leu Val Arg Gly Arg Lys Pro	
	115	120 125
10	Leu Ser Leu Leu Val Ile Leu Gly Leu Ala Val Gly Phe Ser Leu Val	
	130	135 140
15	Gln Asp Val Ile Ala Ile Glu Tyr Ile Val Leu Thr Met Asn Arg Thr	
	145	150 155 160
20	Asn Val Asn Val Phe Ser Glu Leu Ser Ala Pro Arg Arg Asn Glu Asp	
	165	170 175
25	Phe Val Leu Leu Leu Thr Tyr Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe	
	180	185 190
30	Leu Met Ser Ser Phe Thr Phe Cys Gly Ser Phe Thr Gly Trp Lys Arg	
	195	200 205
35	His Gly Ala His Ile Tyr Leu Thr Met Leu Leu Ser Ile Ala Ile Trp	
	210	215 220
40	Val Ala Trp Ile Thr Leu Leu Met Leu Pro Asp Phe Asp Arg Arg Trp	
	225	230 235 240
45	Asp Asp Thr Ile Leu Ser Ser Ala Leu Ala Ala Asn Gly Trp Val Phe	
	245	250 255
50	Leu Leu Ala Tyr Val Ser Pro Glu Phe Trp Leu Leu Thr Lys Gln Arg	
	260	265 270
55	Asn Pro Met Asp Tyr Pro Val Glu Asp Ala Phe Cys Lys Pro Gln Leu	
	275	280 285
60	Val Lys Lys Ser Tyr Gly Val Glu Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Glu Glu	
	290	295 300
65	Ile Thr Gln Gly Phe Glu Glu Thr Gly Asp Thr Leu Tyr Ala Pro Tyr	
	305	310 315 320
	Ser Thr His Phe Gln Leu Gln Asn Gln Pro Pro Gln Lys Glu Phe Ser	

ES 2 274 220 T3

325

330

335

Ile Pro Arg Ala His Ala Trp Pro Ser Pro Tyr Lys Asp Tyr Glu Val

340

345

350

Lys Lys Glu Gly Ser

355

<210> 2

<211> 2.302

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

ccaaggtctc cccagcact gaggagctcg cctgctgcc tcttgccgc gggaagcagc 60
accaagttca cggccaacgc cttggcacta ggggccagaa tggctacaac agtccctgat 120
ggttgccgca atggcctgaa atccaagtac tacagacttt gtgataaggc tgaagcttgg 180
ggcatcgtcc tagaaacggg ggcacacagc ggggttgtga cctcgggtggc cttcatgctc 240
actctcccga tctcgtctg caaggtgcag gactccaaca ggcgaaaaat gctgcctact 300
cagtttctct tctcctggg tgtgttggg atctttggc tcaccttcgc cttcatcatc 360
ggactggacg ggagcacagg gccacacgc ttcttctct ttgggatacct cttttccatc 420
tgcttctctt gcctgctggc tcatgctgtc agtctgacca agctcgtccg ggggaggaag 480
cccctttccc tgttgggtgat tctgggtctg gccgtgggct tcagcctagt ccaggatgtt 540
atcgctattg aatataattgt cctgaccatg aataggacca acgtcaatgt cttttctgag 600
ctttccgctc ctgctcgcaa tgaagacttt gtcctcctgc tcacctacgt cctcttcttg 660
atggcgctga ctttctcat gtcctcttcc accttctgtg gtctcttcac gggctggaag 720
agacatgggg ccacatcta cctcacgatg ctctcttcca ttgccatctg ggtggcctgg 780
atcacccctg tcatgcttcc tgactttgac cgcaggtggg atgacaccat cctcagctcc 840
gccttggtct ccaatggctg ggtgttctct ttggcttatg ttagtcccga gttttggctg 900
ctcacaaagc aacgaaaccc catggattat cctgttgagg atgctttctg taaacctcaa 960
ctcgtgaaga agagctatgg tgtggagAAC agagcctact ctcaagagga aatcactcaa 1020
ggttttgaag agacagggga cacgctctat gccccctatt ccacacattt tcagctgcag 1080
aaccagcctc cccaaaagga attctccatc ccacgggccc acgcttggcc gagcccttac 1140
aaagactatg aagtaaagaa agagggcagc taactctgtc ctgaagagtg ggacaaatgc 1200
agccggggcg cagatctagc gggagctcaa agggatgtgg gcgaaatctt gagtcttctg 1260
agaaaaactgt acaagacact acgggaacag tttgcctccc tcccagcctc aaccacaatt 1320
cttccatgct ggggctgatg tgggctagta agactccagt tcttagaggc gctgtagtat 1380
tttttttttt ttgtctcatc ctttggatac ttcttttaag tgggagtctc aggcactca 1440
agttagacc cttactcttt ttgtttgttt ttgaaacag gatcttgctc tgtacccag 1500
gcttgagtgc agtgggtcga tcacagccca gtgcagcctc gaccacctgt gctcaagcaa 1560
tcttcccatc tccatctccc aaagtgtctg gatgacaggc gtgagccaca gctcccagcc 1620
taggccctta atcttctgt tattttccat ggactaaagg tctggctcatc tgagctcacg 1680
ctggtctaca cagctctagg ggcctgtctc tctaactcac agtgggtttt gtgaggctct 1740
gtggcccaga gcagacctgc atatctgagc aaaaatagca aaagcctctc tcagccact 1800

```

ES 2 274 220 T3

5 ggcctgaatc tacactggaa gccaaacttgc tggcaccccc gctccccaac ccttcttggc 1860
 tgggtaggag aggctaaaga tcaccctaaa tttactcatc tctctagtgc tgcctcacat 1920
 tgggcctcag cagctcccca gcaccaattc acaggtcacc cctctcttct tgcactgtcc 1980
 ccaaaacttgc tgtcaattcc gagatctaata ctcccctac gctctgccag gaattctttc 2040
 agacctcact agcacaagcc cggttgctcc ttgtcaggag aatttgtaga tcattctcac 2100
 10 ttcaaattcc tggggctgat acttctctca tcttgacccc caacctctgt aaatagattt 2160
 accgcattta cggctgcatt ctgtaagtgg gcatggtctc ctaatggagg agtggttcatt 2220
 gtataataag ttattcacct gagtatgcaa taaagatgtg gtggccactc ttcatggtg 2280
 15 gtggcagcaa aaaaaaaaaa aa 2302

<210> 3

<211> 22

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador

<400> 3

30 ctcgtgaaga agagctatgg tc

22

<210> 4

<211> 22

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Cebador

<400> 4

45 cactcttcag gacagagta gc

22

50

55

60

65