



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 10 059 T2** 2007.05.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 497 656 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/574** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 10 059.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB03/01587**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 717 443.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/087832**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.04.2003**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **23.10.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.01.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.05.2007**

(30) Unionspriorität:

0208331	11.04.2002	GB
0221538	17.09.2002	GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

(73) Patentinhaber:

UCB S.A., Brüssel/Bruxelles, BE

(72) Erfinder:

TERRETT, Oxford GlycoSciences (UK) Ltd, J. A., Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(54) Bezeichnung: **DIAGNOSE VON KARZINOMEN MIT HILFE DES RAIG1-POLYPEPTIDS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Screening auf Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom in einem Individuum und/oder zur Überwachung der Wirksamkeit einer Anti-Brustkrebs-, Anti-Darmkrebs- und/oder Anti-Osteosarkom-Therapie unter Verwendung des Polypeptids RAIG1 (Retinsäure-induzierbares Gen 1, auch bekannt als hypothetisches Protein FLJ10899 oder Retinsäure-induziert 3) oder einer entsprechenden Nukleinsäure. Auch die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an ein RAIG1-Polypeptid bindet, bei Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, wobei der Antikörper an eine therapeutische oder Arzneistoffgruppierung konjugiert ist, wird bereitgestellt.

[0002] Tumorspezifische Proteine sind unter Verwendung von Techniken wie dem Differentialscreening von cDNAs (Hubert, R. S., et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14523–14528) und der Reinigung von Zelloberflächenproteinen, die durch tumorspezifische Antikörper erkannt werden (Catimel, B., et al., 1996, J. Biol. Chem 271: 25664–25670) für viele Krebsarten identifiziert worden. Vor Kurzem sind DNA-„Chips“, enthaltend bis zu 10.000 exprimierte Sequenzelemente, zur Charakterisierung der Tumorzellengenexpression verwendet worden (Dhanasekaran, S. M., et al., 2001, Nature 412: 822–826). Es gibt jedoch mehrere Gründe, warum die bisherigen zahlreichen und ausgedehnten Transkriptionsanalysen von Krebsen nicht alle oder sogar die meisten Tumor-assoziierte Proteine möglicherweise nicht erkennen lassen. Diese umfassen: (i) keine übereinstimmenden Transkript- und Krankheitsassoziierten Proteingehalte, was besonders bei Membranproteinen üblich ist, die oftmals eine lange Halbwertszeit haben und als solche keinen hohen mRNA-Turnover aufweisen. Daher ist es aufgrund der Tatsache, daß der Unterschied der Proteingehalte zwischen normalen und Krebszellen konsistent ist, oftmals schwer, Veränderungen der mRNA für ein vorgegebenes Membranprotein mit dem Krebszustand in Verbindung zu bringen. (ii) Die Translokation eines Proteins im Krankheitszustand zeigt, eher als einfach nur unterschiedliche Gehalte des Transkripts, zum Beispiel, erbB2/HER2-neu, eine viel größere Plasma-Membran-Lokalisierung in Krebszellen als in normalen Brustzellen, und die Transkriptionsfaktoren Oestrogenrezeptor und STAT3 translozieren unter Ausübung ihrer tumorbildenden Wirkungen zum Kern. (iii) Neue, nicht charakterisierte Gene werden in dem „geschlossenen System“ eines cDNA-Chips, wo die Anzahl exprimierter Sequenzelemente pro Chip und die Kenntnis und Verfügbarkeit von DNA-Klonen begrenzt ist, nicht außerordentlich dargestellt.

[0003] Daher besteht der Bedarf an der Identifizierung weiterer Marker zur Diagnose von Krebs und weiterer Targets, die bei einem therapeutischen Ansatz für Krebs verwendet werden können. Die vorliegende Erfindung basiert auf der neuartigen Assoziation von RAIG1 mit einem Karzinom, insbesondere Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom. Die Analyse der RAIG1mRNA-Expression offenbart, daß sie bei Darmkrebs, Brustkrebs, Lungenkrebs, Pankreaskrebs, Eierstockkrebs und Osteosarkom im Vergleich zu normalem Gewebe oder übereinstimmendem Kontrollgewebe hochreguliert wird.

[0004] EP 1074617 bezieht sich auf Primergruppen zur Synthese von Vollängen-cDNAs, die für das Studium der Proteinfunktion nützlich sind, und offenbart eine RAIG1-Nukleotidsequenz als eine von 16.000 Sequenzen, die zur Herstellung solcher Primergruppen nützlich sind. Es wird jedoch keine Krankheitsassoziation erwähnt.

[0005] RAIG1 ist ein Orphan-G-Protein-verknüpfter Rezeptor (GPCR) an Chromosom 12 (Cheng & Lotan, oben; Brauner-Osbourne, H., 2001, Biochim. Biophys. Acta 1518: 237–248). Anders als ein verwandter Rezeptor (GPCR5B), der verbreitet in peripheren und zentralen Geweben exprimiert wird, ist von RAIG1 berichtet worden, daß er ein begrenzteres Expressionsmuster zeigt (Brauner-Osbourne, H. & Krosgaard-Larsen, P. 2000, Genomics, 65: 121–128).

[0006] Demgemäß liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Screening auf Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom in einem Individuum und/oder zur Überwachung der Wirksamkeit einer Anti-Brustkrebs-, Anti-Darmkrebs- und/oder Anti-Osteosarkom-Therapie, wobei man in dem Verfahren in einer dem Individuum entnommenen biologischen Probe ein RAIG1-Polypeptid, das die in [Fig. 1](#) gezeigte Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 1) umfaßt oder daraus besteht, nachweist und/oder quantifiziert, wobei das RAIG1-Polypeptid unter Verwendung eines an das RAIG1-Polypeptid spezifisch bindenden Antikörpers nachgewiesen und/oder quantifiziert wird.

[0007] Im Kontext der vorliegenden Erfindung können RAIG1-Polypeptide aus einer biologischen Probe aus irgendeiner Quelle wie beispielsweise und ohne Einschränkung einer Probe von Brust-, Pankreas-, Lungen-, Leber-, Eierstock-, Darm- und/oder Knochenmarksgewebe erhalten werden. In einer Ausführungsform wird der

Gehalt an dem RAIG1-Polypeptid mit einem Referenzbereich oder einer Kontrolle verglichen.

[0008] Der Ausdruck „Karzinom“ umfaßt malignes Neoplasma, das aus dem Epithel, das in der Haut oder üblicher Auskleidungen von Körperorganen, zum Beispiel: Brust, Prostata, Lunge, Niere, Pankreas, Bauch oder Darm, zu finden ist, wächst. Karzinome neigen dazu, in benachbartes Gewebe zu infiltrieren und sich auf entfernten Organen, zum Beispiel: Knochen, Leber, Lunge oder Gehirn, zu verteilen (darauf Metastasen zu bilden).

[0009] Die oben beschriebenen Polypeptide werden hierin nachstehend als „RAIG1-Polypeptide“ bezeichnet. Der Ausdruck „Polypeptide“ umfaßt Peptide, Polypeptide und Proteine. Diese werden, sofern nicht etwas anderes angegeben ist, gegenseitig austauschbar verwendet. RAIG1-Polypeptide können in Form eines „reifen“ Proteins vorliegen oder können ein Teil eines größeren Proteins wie eines Fusionsprotein sein. Es ist oftmals von Vorteil, eine zusätzliche Aminosäuresequenz, die Sekretions- oder Leader-Sequenzen enthält, eine Prä-, Pro- oder Präpro-Proteinsequenz, oder eine Sequenz, die bei der Reinigung eines solchen Affinitätsanhangs behilflich ist, einzubeziehen, zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, multiple Histidinreste, einen FLAG-Anhang, einen HA-Anhang oder einen myc-Anhang. Eine zusätzliche Sequenz, die während der Rekombinantproduktion für Stabilität sorgt, kann auch verwendet werden. Solche Sequenzen können nach Bedarf gegebenenfalls durch die Einführung einer abspaltbaren Sequenz als eine zusätzliche Sequenz oder ein Teil davon entfernt werden. So kann ein RAIG1-Polypeptid an andere Gruppierungen, die andere Polypeptide umfassen, fusioniert werden. Solche zusätzliche Sequenzen und Affinitätsanhänge sind in der Technik allgemein bekannt.

[0010] Die Erfindung liefert auch ein Verfahren zum Screening auf Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom in einem Individuum und/oder zur Überwachung der Wirksamkeit einer Anti-Brustkrebs-, Anti-Darmkrebs- und/oder Anti-Osteosarkom-Therapie, wobei in dem Verfahren in einer dem Individuum entnommenen biologischen Probe eine Nukleinsäure nachweist, die:

- a) die DNA-Sequenz, gezeigt in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO: 2), oder deren RNA-Äquivalent umfaßt oder daraus besteht;
- b) eine Sequenz aufweist, die zu einer Sequenz aus a) komplementär ist; oder
- c) eine Sequenz aufweist, die für ein oben definiertes Polypeptid codiert.

[0011] Sofern der Kontext nichts anderes angibt, umfassen RAIG1-Nukleinsäuren die oben in a) bis c) definierten Nukleinsäuremoleküle und können eines oder mehrere der folgenden Merkmale aufweisen:

- 1) sie können DNA oder RNA sein;
- 2) sie können einzel- oder doppelsträngig sein;
- 3) sie können in im wesentlichen reiner Form vorliegen. Daher können sie in einer Form bereitgestellt werden, die im wesentlichen frei ist von kontaminierenden Proteinen und/oder von anderen Nukleinsäuren; und
- 4) sie können Introns aufweisen oder nicht (z. B. als cDNA).

[0012] Die Verwendung von Nukleinsäuren, die zu den in a) bis c) oben beschriebenen RAIG1-Nukleinsäuren komplementär sind und die an diese RAIG1-Nukleinsäuren hybridisieren können, ist möglich. Solche Nukleinsäuremoleküle werden als „Hybridisierungs“-Nukleinsäuremoleküle bezeichnet. Beispielsweise, aber ohne Einschränkung, können Hybridisierungsnukleinsäuremoleküle als Sonden oder Primer nützlich sein. Hybridisierungsnukleinsäuremoleküle können einen hohen Grad an Sequenzidentität entlang ihrer Länge mit einem Nukleinsäuremolekül innerhalb des Umfangs von a) bis c) oben aufweisen (z. B. mindestens 50 %, mindestens 75 %, mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 95 % oder mindestens 98 % Sequenzidentität).

[0013] Hybridisierungsassays können zum Nachweis, zur Prognose, zur Diagnose oder zur Überwachung der Karzinomtherapie, z. B. von Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, in einem Individuum verwendet werden. Demgemäß umfaßt ein solcher Hybridisierungsassay:

- i) das Kontaktieren einer biologischen Probe, erhalten aus einem Individuum, enthaltend Nukleinsäure, mit einer Nukleinsäuresonde, die an ein RAIG1-Nukleinsäuremolekül hybridisieren kann, unter Bedingungen, bei denen die Hybridisierung stattfinden kann; und
- ii) den Nachweis oder die Messung einer sich daraus ergebenden Hybridisierung.

[0014] Bevorzugt sind solche Hybridisierungsmoleküle mindestens 10 Nukleotide lang und sind bevorzugt mindestens 25 oder mindestens 50 Nukleotide lang. Stärker bevorzugt hybridisieren Hybridisierungsnukleinsäuremoleküle spezifisch an Nukleinsäuren innerhalb des Umfangs von a) bis c) oben. Am stärksten bevorzugt findet die Hybridisierung unter stringenden Hybridisierungsbedingungen statt. Ein Beispiel für stringende Hyb-

ridisierungsbedingungen ist, wenn die Versuchshybridisierung bei einer Temperatur von etwa 35 bis etwa 65 °C unter Verwendung einer Salzlösung, die etwa 0,9 M ist, durchgeführt wird. Ein Fachmann wird jedoch unter Berücksichtigung von Variablen wie der Sondenlänge, der Grundzusammensetzung, der Art der vorhandenen Ionen usw. in der Lage sein, die Bedingungen je nach Bedarf zu variieren.

[0015] Es kann ein diagnostischer Kit, umfassend eine Nukleinsäuresonde, die an ein RAIG1-Polypeptid codierende RNA hybridisieren kann, geeignete Reagenzien und Instruktionen zur Verwendung, bereitgestellt werden.

[0016] Es kann ein diagnostischer Kit bereitgestellt werden, der in einem oder mehreren Behältern ein Paar Primer umfaßt, die unter geeigneten Reaktionsbedingungen die Amplifikation von mindestens einem Teil eines RAIG1-Nukleinsäuremoleküls vorbereiten können, wie durch Polymerasekettenreaktion (siehe z. B. Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), Ligasekettenreaktion (siehe EP 320,308), Verwendung von Q-Replikase, zyclische Sondenreaktion oder andere Verfahren, die in der Technik bekannt sind. Typischerweise sind Primer mindestens acht Nukleotide lang und werden bevorzugt mindestens zehn bis fünfundzwanzig Nukleotide und stärker bevorzugt fünfzehn bis fünfundzwanzig Nukleotide lang sein. In einigen Fällen können Primer verwendet werden, die mindestens dreißig oder mindestens fünfunddreißig Nukleotide lang sind.

[0017] In einem weiteren Aspekt umfaßt das Verfahren zum Nachweis der Gegenwart eines RAIG1-Polypeptids den Nachweis des gefangenen Polypeptids unter Verwendung eines direkt oder indirekt markierten Nachweisreagens.

[0018] Ein RAIG1-Polypeptid kann mittels irgendeines Immunassays, der in der Technik bekannt ist, nachgewiesen werden, einschließlich, ohne Einschränkung, kompetitiver und nicht kompetitiver Assaysysteme unter Verwendung von Techniken wie Western-Blots, Radioimmunoassays, ELISA (heterologer Enzym-Immunoassay), „Sandwich“-Immunassays, Immunpräzipitationsassays, Präzipitinreaktionen, Geldiffusionspräzipitinreaktionen, Immundiffusionsassays, Agglutinationsassays, Komplement-Fixationsassays, immunradiometrischer Assays, Fluoreszenzimmunassays und Protein A-Immunassays.

[0019] Es können diagnostische Kits bereitgestellt werden, die ein Fängerreagens (z. B. einen Antikörper) gegen ein RAIG1-Polypeptid, wie oben definiert, umfassen. Überdies kann ein solcher Kit gegebenenfalls eines oder mehreres von folgendem umfassen:

- (1) Instruktionen zur Verwendung des Fängerreagens zur Diagnose, Prognose, therapeutischen Überwachung oder einer Kombination dieser Anwendungen;
- (2) einen markierten Bindungspartner für das Fängerreagens;
- (3) eine Festphase (wie einen Reagensstreifen), auf der das Fängerreagens immobilisiert ist; und
- (4) ein Etikett oder eine Beilage, denen die Durchführgenehmigung zur diagnostischen, prognostischen oder therapeutischen Verwendung oder einer Kombination dieser zu entnehmen sind.

[0020] Wenn kein markierter Bindungspartner für das Fängerreagens vorliegt, kann das Anti-Polypeptid-Fängerreagens selbst mit einem nachweisbaren Marker markiert sein, z. B. mit einer chemilumineszierenden, enzymatischen, fluoreszierenden oder radioaktiven Gruppierung (siehe oben).

[0021] Diagnoseverfahren können unter Verwendung zahlreicher Verfahren, die einem Fachmann bekannt sind, durchgeführt werden, einschließlich, ohne Einschränkung, Immunpräzipitation, gefolgt von Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgelelektrophorese, zweidimensionaler Gelelektrophorese, kompetitiver und nicht-kompetitiver Assaysysteme unter Verwendung von Techniken wie Western-Blots, Immunzytochemie, Immunhistochemie, Immunassays, z.B. Radioimmunoassays, ELISA (heterologer Enzym-Immunoassay), „Sandwich“-Immunassays, Immunpräzipitationsassays, Präzipitinreaktionen, Geldiffusionspräzipitinreaktionen, Immundiffusionsassays, Agglutinationsassays, Komplement-Fixationsassays, immunradiometrischen Assays, Fluoreszenzimmunassays und Protein A-Immunassays.

[0022] Die RAIG1-Polypeptide stellen ein geeignetes Target zur Behandlung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, dar. Daher sind Verfahren zur Identifizierung von Mitteln, die mit der Expression oder Aktivität eines RAIG1-Polypeptids oder der Expression eines RAIG1-Nukleinsäuremoleküls interagieren oder sie modulieren, möglich. Durch diese Screeningverfahren identifizierte Mittel sind potentielle Therapeutika zur Verwendung bei der Behandlung von Karzinom, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs

und/oder Osteosarkom.

[0023] Die Mittel können aus einem breiten Bereich an in Frage kommenden Mitteln ausgewählt werden. Beispiele für in Frage kommende Mittel umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Nukleinsäuren (z. B. DNA und RNA), Antikörper, Kohlenhydrate, Lipide, Proteine, Polypeptide, Peptide, Peptidomimetika, kleine Moleküle und andere Arzneistoffe. Die Mittel sind unter Verwendung irgendeines der zahlreichen Ansätze in den Verfahren der kombinatorischen Bibliothek, die in der Technik bekannt sind, erhältlich, einschließlich: biologischer Bibliotheken; räumlich adressierbarer paralleler Festphasen- oder Lösungsphasenbibliotheken; synthetischer Bibliotheksverfahren, die der Dekonvolution bedürfen; der „Ein Kügelchen-eine Verbindung“-Bibliotheksverfahren; und synthetischer Bibliotheksverfahren unter Verwendung der Affinitätschromatographie-Selektion. Der Ansatz der biologischen Bibliothek ist für Peptidbibliotheken geeignet, während die anderen vier Ansätze auf Peptid-, Nicht-Peptidoligomer- oder kleine Molekülbibliotheken von Verbindungen anwendbar sind (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12: 145; US 5,738, 996; und US 5,807, 683).

[0024] Beispiele für geeignete Verfahren, die auf der vorliegenden Beschreibung basieren, für die Synthese molekularer Bibliotheken sind in der Technik zum Beispiel in: 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; Carell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; und Gallop et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37: 1233 zu finden.

[0025] Bibliotheken von Verbindungen können beispielsweise in Lösung (z. B. Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13: 412–421), oder auf Kügelchen (Lam, 1991, *Nature* 354: 82–84), Chips (Fodor, 1993, *Nature* 364: 555–556), Bakterien (US 5,223, 409), Sporen (US 5,571, 698; 5,403, 484; und 5,223,409), Plasmiden (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865–1869) oder Phage (Scott und Smith, 1990, *Science* 249: 386–390; Devlin, 1990, *Science* 249: 404–406; Cwirla et al. 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378–6382; und Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 301–310) dargestellt werden.

[0026] Mittel, die mit einem RAIG1-Polypeptid interagieren (z. B. daran binden), können in einem Zell-basierenden Assay identifiziert werden, wo die Population an Zellen, die ein RAIG1-Polypeptid exprimieren, mit einem in Frage kommenden Mittel kontaktiert werden kann und die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, mit dem Polypeptid zu interagieren, bestimmt wird. Vorzugsweise kann die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, mit einem RAIG1-Polypeptid zu interagieren, mit einem Referenzbereich oder einer Kontrolle verglichen werden. Alternativ können eine erste und eine zweite Population an Zellen, die ein RAIG1-Polypeptid exprimieren, mit einem in Frage kommenden Mittel oder einem Kontrollmittel kontaktiert werden, und die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, mit dem Polypeptid zu interagieren, kann durch den Vergleich des Unterschiedes hinsichtlich der Wechselwirkung zwischen dem in Frage kommenden Mittel und dem Kontrollmittel bestimmt werden. Nach Bedarf kann diese Art von Assay zum Screening einer Vielzahl (z. B. einer Bibliothek) an in Frage kommenden Mitteln unter Verwendung einer Vielzahl von Zellpopulationen, die ein RAIG1-Polypeptid exprimieren, verwendet werden. Nach Bedarf kann diese Art von Assay zum Screening einer Vielzahl (z. B. einer Bibliothek) an in Frage kommenden Mitteln verwendet werden. Die Zelle kann beispielsweise prokaryotischen (z. B. *E. coli*) oder eukaryotischen Ursprungs (z. B. Hefe oder Säuger) sein. Ferner können die Zellen das RAIG1-Polypeptid endogen exprimieren oder genetisch zur Expression des Polypeptids konstruiert werden. In einigen Ausführungsformen ist das RAIG1-Polypeptid oder das in Frage kommende Mittel beispielsweise mit einer radioaktiven Markierung (wie ^{32}P , ^{35}S oder ^{125}I) oder einer fluoreszierenden Markierung (wie Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phthaldehyd oder Fluorescamin) markiert, um so den Nachweis einer Wechselwirkung zwischen einem Polypeptid und einem in Frage kommenden Mittel zu ermöglichen.

[0027] Mittel, die mit einem RAIG1-Polypeptid interagieren (z. B. daran binden), können in einem Zell-freien Assaysystem identifiziert werden, wo eine Probe, die ein RAIG1-Polypeptid exprimiert, mit einem in Frage kommenden Mittel kontaktiert wird und die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, mit dem Polypeptid zu interagieren, bestimmt wird. Bevorzugt kann die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, mit dem Polypeptid zu interagieren, mit einem Referenzbereich oder einer Kontrolle verglichen werden. Bevorzugt können eine erste und eine zweite Probe, die natives oder rekombinantes RAIG1-Polypeptid umfassen, mit einem in Frage kommenden Mittel oder einem Kontrollmittel verglichen werden, und die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, mit dem Polypeptid zu interagieren, kann durch den Vergleich des Unterschiedes hinsichtlich der Wechselwirkung zwischen dem in Frage kommenden Mittel und dem Kontrollmittel bestimmt werden. Nach Bedarf kann dieser Assay zum Screening einer Vielzahl (z. B. einer Bibliothek) von in Frage kommenden Mitteln unter Verwendung einer Vielzahl von RAIG1-Polypeptidproben verwendet werden. Bevorzugt wird das Polypeptid zuerst beispielsweise durch die Kontaktierung des Polypeptids mit einem immobilisierten Antikörper, der

dieses spezifisch erkennt und daran bindet, oder durch die Kontaktierung eines gereinigten Präparats aus Polypeptid mit einer zur Bindung von Proteinen konstruierten Oberfläche immobilisiert. Das Polypeptid kann teilweise oder vollständig gereinigt (z. B. teilweise oder vollständig frei von anderen Polypeptiden) oder Teil eines Zellsats sein. Ferner kann das Polypeptid ein Fusionsprotein sein, das das RAIG1-Polypeptid oder einen biologisch aktiven Teil davon und eine Domäne wie Glutathionin-S-transferase umfaßt. Alternativ kann das Polypeptid unter Verwendung von Techniken, die einem Fachmann bekannt sind (z. B. Biotinylierungskit, Pierce Chemicals; Rockford, IL) biotinyliert werden. Die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, mit dem Polypeptid zu interagieren, kann durch Verfahren, die einem Fachmann bekannt sind, dupliziert werden.

[0028] Ein RAIG1-Polypeptid kann als ein „Köderprotein“ in einem Zwei-Hybrid-Assay oder Drei-Hybrid-Assay zur Identifizierung anderer Proteine, die an das RAIG1-Polypeptid binden oder damit interagieren, verwendet werden (siehe z. B. US 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; und WO 94/10300). Wie ein Fachmann erkennen wird, sind solche Bindungsproteine auch in die Ausbreitung von Signalen eines RAIG1-Polypeptids involviert. Beispielsweise können sie Upstream- oder Downstreamelemente eines Signalweges, der ein RAIG1-Polypeptid umfaßt, sein. Alternativ können Polypeptide, die mit einem RAIG1-Polypeptid interagieren, durch die Isolierung eines Proteinkomplexes, der ein RAIG1-Polypeptid umfaßt (d. h. ein RAIG1-Polypeptid, das direkt oder indirekt mit einem oder mehreren anderen Polypeptiden interagiert) und Identifizierung der damit verbundenen Proteine unter Anwendung von in der Technik bekannten Verfahren, wie Massenspektrometrie oder Westernblotting, identifiziert werden (siehe beispielsweise Blackstock, W. & 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).

[0029] In all diesen Fällen kann die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, direkt oder indirekt mit dem RAIG1-Polypeptid zu interagieren, durch Verfahren, die einem Fachmann bekannt sind, bestimmt werden. Beispielsweise, jedoch ohne Einschränkung, kann die Wechselwirkung zwischen dem in Frage kommenden Mittel und einem RAIG1-Polypeptid durch Durchflußzytometrie, einen Szintillationsassay, einen Aktivitätsassay, Massenspektrometrie, Mikroskopie, Immunpräzipitation oder Western-Blot-Analyse bestimmt werden.

[0030] Mittel, die kompetitiv mit einem RAIG1-Polypeptid interagieren (d. h. kompetitiv daran binden), können in einem kompetitiven Bindungsassay identifiziert, und die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, mit dem RAIG1-Polypeptid zu interagieren, kann bestimmt werden. Bevorzugt kann die Fähigkeit eines in Frage kommenden Mittels, mit einem RAIG1-Polypeptid zu interagieren, mit einem Referenzbereich oder einer Kontrolle verglichen werden. Vorzugsweise können eine erste und eine zweite Population an Zellen, die sowohl ein RAIG1-Polypeptid als auch ein Protein, das bekanntermaßen mit dem RAIG1-Polypeptid interagiert, exprimieren, mit einem in Frage kommenden Mittel oder einem Kontrollmittel kontaktiert werden. Die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, mit dem RAIG1-Polypeptid kompetitiv zu interagieren, wird dann durch einen Vergleich der Wechselwirkung in der ersten und der zweiten Zellpopulation bestimmt. Alternativ kann eine alternative zweite Population oder eine weitere Population an Zellen mit einem Mittel, das bekanntermaßen kompetitiv mit einem RAIG1-Polypeptid interagiert, kontaktiert werden.

[0031] Alternativ können Mittel, die kompetitiv mit einem RAIG1-Polypeptid interagieren, in einem Zell-freien Assaysystem durch das Kontaktieren einer ersten und einer zweiten Probe, die ein RAIG1-Polypeptid und ein Protein, das bekanntermaßen mit dem RAIG1-Polypeptid interagiert, umfaßt, mit einem in Frage kommenden Mittel oder einem Kontrollmittel identifiziert werden. Die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, kompetitiv mit dem RAIG1-Polypeptid zu interagieren, wird dann durch den Vergleich der Wechselwirkung in der ersten und der zweiten Probe bestimmt. Alternativ kann eine alternative zweite Probe oder eine weitere Probe, die ein RAIG1-Polypeptid umfaßt, mit einem Mittel, das bekanntermaßen kompetitiv mit einem RAIG1-Polypeptid interagiert, kontaktiert werden. In jedem Fall können das RAIG1-Polypeptid und das bekannte interagierende Protein natürlich oder rekombinant exprimiert werden; das in Frage kommende Mittel kann exogen zugeführt werden oder natürlich oder rekombinant exprimiert werden.

[0032] Mittel, die eine Wechselwirkung zwischen einem RAIG1-Polypeptid und einem anderen Mittel, zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, einem Protein, modulieren, können in einem Zell-basierenden Assay durch Kontaktierung von Zellen, die ein RAIG1-Polypeptid exprimieren, in Gegenwart eines bekannten Interaktionsmittels mit einem in Frage kommenden Modulationsmittel und Selektion des in Frage kommenden Mittels, das die Wechselwirkung moduliert, identifiziert werden. Alternativ können die Mittel, die eine Wechselwirkung zwischen einem RAIG1-Polypeptid und einem anderen Mittel, zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, einem Protein, modulieren, in einem Zell-freien Assaysystem durch Kontaktierung des Polypeptids mit einem

Mittel, das bekanntermaßen mit dem Polypeptid interagiert, in Gegenwart eines in Frage kommenden Mittels, identifiziert werden. Ein Modulationsmittel kann als ein Antikörper, ein Cofaktor, ein Inhibitor, ein Aktivator agieren oder kann eine antagonistische oder agonistische Wirkung auf die Wechselwirkung zwischen einem RAIG1-Polypeptid und einem bekannten Mittel haben. Wie oben angegeben, kann die Fähigkeit des bekannten Mittels, mit einem RAIG1-Polypeptid zu interagieren, durch Verfahren, die einem Fachmann bekannt sind, bestimmt werden. Diese Assays, ob nun Zell-basierend oder Zellfrei, können zum Screening einer Vielzahl (z. B. einer Bibliothek) in Frage kommender Mittel verwendet werden.

[0033] Ein Zell-basierendes Assaysystem kann zur Identifizierung von Mitteln, die die Aktivität eines RAIG1-Polypeptids modulieren (d. h. stimulieren oder inhibieren) können, verwendet werden. Demgemäß wird die Aktivität eines RAIG1-Polypeptids in einer Population von Zellen, die ein RAIG1-Polypeptid natürlich oder rekombinant exprimieren, in Gegenwart eines in Frage kommenden Mittels gemessen. Bevorzugt wird die Aktivität eines RAIG1-Polypeptids mit einem Referenzbereich oder einer Kontrolle verglichen. Bevorzugt wird die Aktivität eines RAIG1-Polypeptids in einer ersten und einer zweiten Population von Zellen, die ein RAIG1-Polypeptid natürlich oder rekombinant exprimieren, in Gegenwart eines Mittels oder Abwesenheit eines in Frage kommenden Mittels (z. B. in Gegenwart eines Kontrollmittels) gemessen, und die Aktivität des RAIG1-Polypeptids wird verglichen. Das in Frage kommende Mittel kann dann, basierend auf diesem Vergleich, als ein Modulator der Aktivität eines RAIG1-Polypeptids identifiziert werden. Alternativ kann die Aktivität eines RAIG1-Polypeptids in einem Zell-freien Assaysystem gemessen werden, wo das RAIG1-Polypeptid entweder natürlich oder rekombinant ist. Bevorzugt wird die Aktivität eines RAIG1-Polypeptids mit einem Referenzbereich oder einer Kontrolle verglichen. Bevorzugt wird die Aktivität eines RAIG1-Polypeptids in einer ersten und einer zweiten Probe in Gegenwart oder Abwesenheit eines in Frage kommenden Mittels gemessen, und die Aktivität des RAIG1-Polypeptids wird verglichen. Das in Frage kommende Mittel kann dann, basierend auf diesem Vergleich, als ein Modulator der Aktivität eines RAIG1-Polypeptids identifiziert werden.

[0034] Die Aktivität eines RAIG1-Polypeptids kann durch den Nachweis seiner Wirkung auf einen Downstream-Effektor, zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, den Gehalt oder die Aktivität eines zweiten Messengers (z. B. cAMP, intrazelluläres Ca^{2+} , Diacylglycerol, IP_3 usw.), den Nachweis der katalytischen oder enzymatischen Aktivität, den Nachweis der Induktion eines Reportergens (z. B. Luciferase) oder den Nachweis einer zellulären Antwort, zum Beispiel Proliferation, Differenzierung oder Transformation, nach Bedarf und Kenntnis eines Fachmannes bewertet werden (für Techniken zur Messung der Aktivität siehe z. B. US 5,401,639). Das in Frage kommende Mittel kann dann durch den Vergleich der Wirkung des in Frage kommenden Mittels auf das Kontrollmittel als ein Modulator der Aktivität eines RAIG1-Polypeptids identifiziert werden. Geeignete Kontrollmittel umfassen PBS oder physiologische Kochsalzlösung.

[0035] Mittel wie ein Enzym oder ein biologisch aktiver Teil davon, die für die Produktion oder den Abbau eines RAIG1-Polypeptids oder einer -Nukleinsäure oder für die posttranslationale Modifikation eines RAIG1-Polypeptids verantwortlich sind, können identifiziert werden. In einem primären Screen werden im wesentlichen reine, native oder rekombinant exprimierte RAIG1-Polypeptide, -Nukleinsäuren oder zelluläre Extrakte oder andere Proben, die native oder rekombinant exprimierte RAIG1-Polypeptide oder -Nukleinsäuren umfassen, mit einer Vielzahl an in Frage kommenden Mitteln kontaktiert (zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, einer Vielzahl von Mitteln, dargestellt als Bibliothek), die für die posttranslationale Proteinmodifikation eines RAIG1-Polypeptids oder einer -Nukleinsäure verantwortlich sind, um solche Mittel identifizieren zu können. Die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, die Produktion, den Abbau oder die posttranslationale Modifikation eines RAIG1-Polypeptids oder einer -Nukleinsäure zu modulieren, kann durch Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, umfassend ohne Einschränkung Durchflußzytometrie, radioaktive Markierung, einen Kinaseassay, einen Phosphataseassay, Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse oder Northern-Blot-Analyse, bestimmt werden.

[0036] Zellen, die ein RAIG1-Polypeptid exprimieren, können mit einer Vielzahl in Frage kommender Mittel kontaktiert werden. Die Fähigkeit eines solchen Mittels, die Produktion, den Abbau oder die posttranslationale Modifikation eines RAIG1-Polypeptids zu modulieren, kann durch Verfahren, die einem Fachmann bekannt sind, wie oben beschrieben, bestimmt werden.

[0037] Mittel, die die Expression eines RAIG1-Polypeptids modulieren (d. h. aufregulieren oder herabregulieren), können in einem Zell-basierenden Assaysystem identifiziert werden. Demgemäß wird eine Population an Zellen, die ein RAIG1-Polypeptid oder eine -Nukleinsäure exprimieren, mit einem in Frage kommenden Mittel kontaktiert, und die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, die Expression des RAIG1-Polypeptids oder der -Nukleinsäure zu verändern, wird durch den Vergleich mit einem Referenzbereich oder einer Kontrolle bestimmt. Alternativ werden eine erste und eine zweite Population an Zellen, die ein RAIG1-Polypeptid exprimie-

ren, mit einem in Frage kommenden Mittel oder einem Kontrollmittel kontaktiert, und die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, die Expression des RAIG1-Polypeptids oder der -Nukleinsäure zu verändern, wird durch den Vergleich des Unterschieds hinsichtlich des Expressionsspiegels des RAIG1-Polypeptids oder der -Nukleinsäure zwischen der ersten und der zweiten Zellpopulationen bestimmt. Alternativ kann die Expression des RAIG1-Polypeptids oder der -Nukleinsäure in der ersten Population ferner mit einem Referenzbereich oder einer Kontrolle verglichen werden. Nach Bedarf kann dieser Assay zum Screening einer Vielzahl (z. B. einer Bibliothek) in Frage kommender Mittel verwendet werden. Die Zelle kann zum Beispiel prokaryotischen (z. B. E. coli) oder eukaryotischen Ursprungs (z. B. Hefe oder Säuger) sein. Ferner können die Zellen ein RAIG1-Polypeptid oder eine -Nukleinsäure endogen exprimieren oder können genetisch für die Expression eines RAIG1-Polypeptids oder einer -Nukleinsäure konstruiert werden. Die Fähigkeit der in Frage kommenden Mittel, die Expression eines RAIG1-Polypeptids oder einer -Nukleinsäure zu verändern, kann durch Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, bestimmt werden, zum Beispiel und ohne Einschränkung mittels Durchflußzytometrie, radioaktiver Markierung, eines Szintillationsassays, Immunpräzipitation, Western-Blot-Analyse oder Northern-Blot-Analyse.

[0038] Mittel die die Expression eines RAIG1-Polypeptids oder einer -Nukleinsäure modulieren, können in einem Tiermodell identifiziert werden. Beispiele für geeignete Tiere umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Mäuse, Ratten, Kaninchen, Affen, Meerschweinchen, Hunde und Katzen. Bevorzugt stellt das verwendete Tier ein Modell eines Karzinoms dar, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom. Demgemäß wird einer ersten und einer zweiten Gruppe an Säugetieren ein in Frage kommendes Mittel oder ein Kontrollmittel verabreicht, und die Fähigkeit des in Frage kommenden Mittels, die Expression des RAIG1-Polypeptids oder der -Nukleinsäure zu modulieren, wird durch den Vergleich des Unterschieds hinsichtlich des Expressionsspiegels zwischen der ersten und der zweiten Gruppe an Säugetieren bestimmt. Nach Bedarf können die Expressionsspiegel der RAIG1-Polypeptide oder der -Nukleinsäure in der ersten und der zweiten Gruppe an Säugetieren mit dem Spiegel eines RAIG1-Polypeptids oder einer -Nukleinsäure in einer Kontrollgruppe von Säugetieren verglichen werden. Das in Frage kommende Mittel oder ein Kontrollmittel können durch in der Technik bekannte Mittel (z. B. oral, rektal oder parenteral wie intraperitoneal oder intravenös) verabreicht werden. Veränderungen der Expression eines Polypeptids oder einer Nukleinsäure können durch die oben erwähnten Verfahren bewertet werden. Genauer gesagt, kann ein therapeutisch wirksames Mittel durch die Überwachung einer Besserung oder Verbesserung der Krankheitssymptome identifiziert werden, um den Ausbruch der Krankheit zu verzögern oder deren Fortschreiten zu verlangsamen, zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, eine Verringerung der Tumorgroße. Zur Bestimmung, ob ein in Frage kommendes Mittel eines oder mehrere Symptome in Verbindung mit der Krankheit verändert hat, können Techniken, die mit Karzinom vertrauten Ärzten bekannt sind, verwendet werden.

[0039] Ein Fachmann wird auch erkennen, daß ein RAIG1-Polypeptid auch in einem Verfahren für die Struktur-basierende Gestaltung eines Mittels, insbesondere eines kleinen Moleküls, das die Aktivität des Polypeptids moduliert (z. B. stimuliert oder inhibiert) verwendet werden kann, wobei das Verfahren:

- 1) die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Polypeptids;
- 2) den Nachweis der dreidimensionalen Struktur in dem Polypeptid der voraussichtlich reaktiven oder Bindungsstelle(n);
- 3) die Synthese von in Frage kommenden Mitteln, die mit der abgeleiteten reaktiven oder Bindungsstelle reagieren oder an diese binden sollen; und
- 4) den Test, ob das in Frage kommende Mittel die Aktivität des Polypeptids modulieren kann,

umfaßt.

[0040] Es wird zu erkennen sein, daß das oben beschriebene Verfahren wahrscheinlich ein iteratives Verfahren ist.

[0041] Es können Mittel, die mit der Expression oder Aktivität eines RAIG1-Polypeptids oder einer Nukleinsäure, RAIG1-Polypeptiden, Antikörpern und RAIG1-Nukleinsäuren interagieren oder diese modulieren, und Verwendungen dieser für die oben beschriebenen Behandlungen, bereitgestellt werden. Hierin nachstehend werden die RAIG1-Polypeptide und die RAIG1-Nukleinsäuren zur Verwendung bei der Behandlung als „Wirkstoffe“ bezeichnet. Der Ausdruck „Behandlung“ umfaßt entweder eine therapeutische oder prophylaktische Therapie. Wenn sich hierin auf ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Krankheit oder eines Zustandes unter Verwendung eines bestimmten Wirkstoffes oder einer Kombination aus Mitteln bezogen wird, ist anzunehmen, daß ein solcher Verweis die Verwendung des Wirkstoffes oder der Kombination aus Mitteln bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Vorbeugung der Krankheit oder des Zustandes umfassen soll.

[0042] Demgemäß kann ein Verfahren zur Prophylaxe und/oder Behandlung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, bereitgestellt werden, das die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge zumindest eines Wirkstoffes an das Individuum umfaßt.

[0043] Um die Wirkstoffe in Therapie (menschlich oder veterinär) verwenden zu können, werden diese gemäß der üblichen pharmazeutischen Praxis, z. B. durch das Mischen des Wirkstoffes und eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers, für gewöhnlich zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung formuliert. Daher wird gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, umfassend mindestens einen Wirkstoff der Erfindung und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen sind besonders zur Vorbeugung oder Behandlung eines Karzinoms nützlich. In einem Aspekt ist die pharmazeutische Zusammensetzung für die Verwendung als ein Impfstoff gedacht, und somit sind irgendwelche zusätzlichen Komponenten für die Impfstoffverwendung akzeptabel. Überdies wird ein Fachmann erkennen, daß eines oder mehrere geeignete Zusatzmittel zu solchen Impfstoffpräparaten zugegeben werden können.

[0044] Die Wirkstoffe können einem Individuum auf irgendeinem Weg, der üblicherweise zur Arzneistoffverabreichung verwendet wird, verabreicht werden, zum Beispiel können sie parenteral, oral, topisch (einschließlich bukkal, sublingual oder transdermal) oder durch Inhalation verabreicht werden. Der geeignetste Weg zur Verabreichung in jedem gegebenen Fall wird von dem speziellen Wirkstoff, dem involvierten Karzinom, dem Individuum und der Art und Schwere der Krankheit und des physikalischen Zustandes des Individuums abhängen.

[0045] Die Wirkstoffe können in Kombination, z. B. simultan, nacheinander oder getrennt, mit einem oder mehreren anderen therapeutisch aktiven Mitteln, z. B. anti-karzinomen Mitteln, verabreicht werden.

[0046] Die von einem Wirkstoff zu verabreichende Dosis wird gemäß dem speziellen Wirkstoff, dem involvierten Karzinom, dem Individuum und der Art und Schwere der Krankheit und dem physikalischen Zustand des Individuums und dem gewählten Verabreichungsweg abhängen; die geeignete Dosis kann ohne weiteres von einem Fachmann bestimmt werden. Zur Behandlung eines Karzinoms bei Menschen oder Tieren kann die Dosis im Bereich von 0,01 mg/kg bis 750 mg/kg liegen. Zur prophylaktischen Verwendung bei Menschen und Tieren kann die Dosis im Bereich von 0,01 mg/kg bis 100 mg/kg liegen.

[0047] Die Zusammensetzungen können in Abhängigkeit des Verabreichungsvorganges 0,1 Gew.-%, bevorzugt 10 bis 60 Gew.-%, des Wirkstoffes der Erfindung enthalten.

[0048] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können günstigerweise in Einheitsdosierungsformen angeboten werden, die eine vorbestimmte Menge des Wirkstoffes der Erfindung pro Dosis enthalten. Eine solche Einheit kann zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, 750 mg/kg bis 0,1 mg/kg enthalten, was von dem zu behandelnden Zustand, dem Verabreichungsweg und dem Alter, dem Gewicht und dem Zustand des Individuums abhängt. Bevorzugte Einheitsdosierungszusammensetzungen sind die, die eine tägliche Dosis oder Subdosis, wie oben erwähnt, oder einen entsprechenden Bruchteil davon, des Wirkstoffes enthalten.

[0049] Ein Fachmann wird erkennen, daß die optimale Menge und Einteilung einzelner Dosierungen eines Wirkstoffes durch die Art und das Ausmaß des zu behandelnden Zustandes, die Verabreichungsform, den -weg und die -stelle und das spezielle zu behandelnde Individuum bestimmt werden und daß solche Optima durch herkömmliche Techniken bestimmt werden können. Ein Fachmann wird auch erkennen, daß der optimale Behandlungsablauf, d. h. die Anzahl der Dosen eines Wirkstoffes, die pro Tag für eine definierte Anzahl von Tagen verabreicht wird, von einem Fachmann unter Verwendung herkömmlicher Tests zur Bestimmung des Behandlungsablaufes ermittelt werden kann.

[0050] Die Dosierregime werden so eingestellt, daß die optimale gewünschte Reaktion erhalten wird. Beispielsweise kann eine einzelne große Pille verabreicht werden, können mehrere geteilte Dosen über die Zeit verabreicht werden oder kann die Dosis proportional verringert oder erhöht werden, wie es die therapeutische Situation erfordert.

[0051] Pharmazeutisch akzeptable Träger zur Verwendung können viele verschiedene Formen annehmen, die beispielsweise vom Verabreichungsweg abhängen.

[0052] Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung können flüssig oder fest sein. Orale Flüssigpräparate

können beispielsweise in Form wässriger oder ölgiger Suspensionen, Lösungen, Emulsionen, Sirups oder Elixier vorliegen oder können als ein trockenes Produkt zum Anrühren mit Wasser oder einem anderen geeigneten Vehikel vor der Verwendung angeboten werden. Orale Flüssigpräparate können Suspendiermittel, zum Beispiel Sorbitol, Methylcellulose, Glukosesirup, Gelatine, Hydroxyethylcellulose, Carboxymethylcellulose, Aluminiumstearatgel oder hydrierte Speisefette, Emulgatoren, zum Beispiel Lecithin, Sorbitanmonooleat oder Akazie; Wasser; nicht wässrige Vehikel (die Speiseöle umfassen können), zum Beispiel Mandelöl, ölige Ester wie Glycerin, Propylenglykol oder Ethylalkohol; Konservierungsstoffe, zum Beispiel Methyl- oder Propyl-p-hydroxybenzoat oder Sorbinsäure; Aromastoffe, Konservierungsstoffe, Färbemittel und dergleichen enthalten.

[0053] Im Fall von oralen festen Präparaten wie Pulvern, Kapseln und Tabletten, können Träger wie Stärken, Zucker, mikrokristalline Cellulose, Verdünnungsmittel, Granulierungsmittel, Schmiermittel, Bindemittel, Desintegrationsmittel und dergleichen enthalten sein. Wegen ihrer leichten Verabreichbarkeit bilden Tabletten und Kapseln die vorteilhafteste orale Dosiereinheit, wobei in diesem Fall im allgemeinen feste pharmazeutische Träger eingesetzt werden. Zusätzlich zu den oben erwähnten üblichen Dosierungsformen können die Wirkstoffe auch durch Mittel zur kontrollierten Freisetzung und/oder Abgabevorrichtungen verabreicht werden. Die Tabletten und Kapseln können herkömmliche Träger oder Trägerstoffe wie Bindemittel, zum Beispiel Sirup, Akazie, Gelatine, Sorbitol, Traganth oder Polyvinylpyrrolidon; Füllstoffe, zum Beispiel Lactose, Zucker, Maisstärke, Calciumphosphat, Sorbitol oder Glycin; Tablettierschmiermittel, zum Beispiel Magnesiumstearat, Talk, Polyethylenglykol oder Siliciumdioxid; Desintegrationsmittel, zum Beispiel Kartoffelstärke; oder akzeptable Benetzungsmittel wie Natriumlaurylsulfat umfassen. Die Tabletten können mittels wässriger oder nicht-wässriger Standardtechniken gemäß Verfahren, die in der normalen pharmazeutischen Praxis allgemein bekannt sind, beschichtet werden.

[0054] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die zur oralen Verabreichung geeignet sind, können als einzelne Einheiten wie Kapseln, Cachets oder Tabletten, die jeweils eine vorbestimmte Menge des Wirkstoffes enthalten, als ein Pulver oder Granulat, oder als eine Lösung oder eine Suspension in einer wässrigen Flüssigkeit, einer nicht-wässrigen Flüssigkeit, einer Öl-in-Wasser-Emulsion oder einer flüssigen Wasser-in-Öl-Emulsion angeboten werden. Solche Zusammensetzungen können durch irgendein pharmazeutisches Verfahren hergestellt werden, alle diese Verfahren umfassen jedoch den Schritt des Inverbindungbringens des Wirkstoffes mit dem Träger, der einen oder mehrere notwendige Bestandteile bildet. Im allgemeinen werden die Zusammensetzungen durch einheitliches und inniges Mischen des Wirkstoffes mit flüssigen Trägern oder feines Zerteilen fester Träger und dann bei Bedarf Formen des Produktes zu dem gewünschten Präparat hergestellt. Beispielsweise kann eine Tablette durch Komprimieren oder Formen, gegebenenfalls mit einem oder mehreren zusätzlichen Inhaltsstoffen, hergestellt werden.

[0055] Komprimierte Tabletten können hergestellt werden, indem der Wirkstoff in frei fließender Form wie ein Pulver oder Granulat, gegebenenfalls gemischt mit einem Bindemittel, Schmiermittel, inerten Verdünnungsmittel, oberflächenaktiven Mittel oder Dispergiermittel, in einer geeigneten Maschine komprimiert wird. Geformte Tabletten können hergestellt werden, indem ein Gemisch aus dem pulverisierten Mittel, angefeuchtet mit einem inerten flüssigen Verdünnungsmittel, in einer geeigneten Maschine geformt wird. Wünschenswerterweise enthält jede Tablette etwa 1 mg bis etwa 500 mg Wirkstoff, und jedes Cachet oder jede Kapsel enthält etwa 1 bis etwa 500 mg Wirkstoff.

[0056] Zusammensetzungen, die einen Wirkstoff umfassen, können auch in Pulver- oder Flüssigkonzentratform hergestellt werden. Herkömmliche wasserlösliche Trägerstoffe, wie Lactose oder Saccharose, können in die Pulver zur Verbesserung deren physikalischen Eigenschaften eingeführt werden. Daher umfassen besonders geeignete Pulver dieser Erfindung 50 bis 100 Gew.-% und bevorzugt 60 bis 80 Gew.-% der Kombination und 0 bis 50 Gew.-% und bevorzugt 20 bis 40 Gew.-% herkömmliche Trägerstoffe. Bei der Verwendung im veterinären Rahmen können solche Pulver dem Tierfutter zugegeben werden, zum Beispiel mittels einer intermediären Vormischung, oder verdünnt im Trinkwasser für Tiere.

[0057] Flüssige Konzentrate zur oralen Verabreichung enthalten geeigneterweise eine Kombination aus wasserlöslichen Mitteln und können gegebenenfalls ein veterinär akzeptables mit Wasser mischbares Lösungsmittel umfassen, zum Beispiel Polyethylenglykol, Propylenglykol, Glycerol, Glycerolformal oder ein solches Lösungsmittel, gemischt mit bis zu 30 Vol.-% Ethanol.

[0058] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die zur parenteralen Verabreichung geeignet sind, können als Lösungen oder Suspensionen aus den Wirkstoffen der Erfindung in Wasser, geeigneterweise gemischt mit einem oberflächenaktiven Mittel, wie Hydroxypropylcellulose, hergestellt werden. Dispersionen können auch in Glycerol, flüssigen Polyethylenglykolen und Gemischen daraus in Ölen hergestellt werden. Unter gewöhnli-

chen Lagerbedingungen enthalten diese Präparate ein Konservierungsmittel, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

[0059] Die pharmazeutischen Formen, die zur injizierbaren Verwendung geeignet sind, umfassen wässrige oder nicht-wässrige sterile Injektionslösungen, die Antioxiationsmittel, Puffer, Bakterioostatika und Solute enthalten können, die die Zusammensetzung mit dem Blut des vorgesehenen Empfängers isotonisch machen, und wässrige und nicht-wässrige sterile Suspensionen, die Suspendiermittel und Verdickungsmittel enthalten können. Unvorbereitete Injektionslösungen, Dispersionen und Suspensionen können auch sterilen Pulvern, Granulaten und Tabletten hergestellt werden.

[0060] Die Zusammensetzungen können in Einzeldosis- oder Multidosisbehältern angeboten werden, zum Beispiel in geschlossenen Ampullen und Fläschchen und können zur Erhöhung der Stabilität unter gefriergetrockneten (lyophilisierten) Bedingungen, bei denen unmittelbar vor der Verwendung nur der sterile flüssige Träger, zum Beispiel Injektionswasser, zugegeben werden muß, gelagert werden. Der sterile flüssige Träger kann in einem separaten Fläschchen oder einer Ampulle geliefert werden und kann ein Lösungsmittel- oder Dispersionsmedium sein, das beispielsweise Wasser, Ethanol, Polyol (z. B. Glycerol, Propylenglykol und flüssiges Polyethylenglykol), geeignete Gemische daraus und pflanzliche Öle enthält. Vorteilhafterweise können Mittel wie ein lokales Anästhetikum, ein Konservierungsstoff und Puffer in dem sterilen flüssigen Träger enthalten sein.

[0061] Die Wirkstoffe können so formuliert werden, daß eine geeignete Verteilung in vivo, zum Beispiel in Liposomen, gewährleistet ist. Für Verfahren zur Herstellung von Liposomen siehe z. B. US 4,522,811; 5,374, 548 und 5,399,331. Die Liposome können eine oder mehrere Gruppierungen enthalten, die selektiv in spezifische Zellen oder Organe transportiert werden, und so die angestrebte Arzneistoffabgabe verbessern (siehe z. B. Ranade, V. 1989, J. Clin. Pharmacol. 29: 685).

[0062] Exemplarische Zielgruppierungen umfassen Folat oder Biotin (siehe z. B. US 5,416, 016); Mannoside (Umezawa et al., 1988, Biochem. Biophys. Res. Comm 153: 1038); Antikörper (Bloeman, P. et al., 1995, FEBS Lett. 357: 140; Owais, M. et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); einen oberflächenaktiven Protein A-Rezeptor (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134), von denen verschiedene Spezies die Zusammensetzungen sowie Komponenten des Wirkstoffes umfassen können; psi 20 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090); siehe auch Keinänen, K. & Laukkanen, M., 1994, FEBS Lett. 346: 123; Killion, J. & Fidler, I., 1994, Immunomethods 4: 273. Die Wirkstoffe können in Liposome formuliert werden, stärker bevorzugt umfassen die Liposome eine Zielgruppierung. Am stärksten bevorzugt werden die therapeutischen Wirkstoffe in den Liposomen durch Bolusinjektion in eine Stelle, proximal zum Tumor, abgegeben.

[0063] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die an die topische Verabreichung angepaßt sind, können als Salben, Cremes, Suspensionen, Lotionen, Pulver, Lösungen, Pasten, Gele, imprägnierte Verbände, Sprays, Aerosole oder Öle, transdermale Hilfsmittel, Stäubepulver und dergleichen formuliert werden. Diese Zusammensetzungen können mittels herkömmlicher Verfahren, die den Wirkstoff enthalten, hergestellt werden. Daher können sie auch kompatible herkömmliche Träger und Additive enthalten, wie Konservierungsmittel, Lösungsmittel zur Unterstützung der Arzneistoffpenetration, Feuchthaltemittel in Cremes oder Salben und Ethanol oder Oleylalkohol für Lotionen. Solche Träger können etwa 1 bis etwa 98 % der Zusammensetzung ausmachen. Üblicher machen sie bis zu etwa 80 % der Zusammensetzung aus. Nur zur Veranschaulichung, eine Creme oder eine Salbe wird durch das Mischen ausreichender Mengen von hydrophilem Material und Wasser, enthaltend etwa 5 bis 10 Gew.-% des Wirkstoffes, in zur Erzeugung einer Creme oder Salbe mit der gewünschten Konsistenz ausreichenden Mengen hergestellt.

[0064] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die an die transdermale Verabreichung angepaßt sind, können als einzelne Pflaster, die für einen längeren Zeitraum in innigem Kontakt mit der Epidermis des Empfängers bleiben sollen, angeboten werden. Beispielsweise kann der Wirkstoff durch Iontophorese von dem Pflaster abgegeben werden.

[0065] Für Anwendungen auf externen Geweben, beispielsweise dem Mund und der Haut, werden die Zusammensetzungen bevorzugt als eine topische Salbe oder Creme aufgetragen. Bei der Formulierung in eine Salbe kann der Wirkstoff entweder mit einer paraffinischen oder einer mit Wasser mischbaren Salbengrundlage eingesetzt werden. Alternativ kann der Wirkstoff mit einer Öl-in-Wasser-Cremegrundlage oder einer Wasser-in-Öl-Grundlage in eine Creme formuliert werden.

[0066] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die an die topische Verabreichung in den Mund angepaßt

sind, umfassen Tabletten, Pastillen und Mundwässer.

[0067] Pharmazeutisch Zusammensetzungen, die an die topische Verabreichung durch das Auge angepaßt sind, umfassen Augentropfen, wobei der Wirkstoff in einem geeigneten Träger, insbesondere einem wässrigen Lösungsmittel, gelöst oder suspendiert ist. Sie umfassen ebenso topische Salben oder Cremes wie oben.

[0068] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die zur rektalen Verabreichung geeignet sind, in denen der Träger ein Feststoff ist, werden am stärksten bevorzugt als Einzeldosiszäpfchen angeboten. Geeignete Träger umfassen Kakaobutter oder Glycerid oder andere Materialien, die üblicherweise in der Technik verwendet werden, und die Zäpfchen können günstigerweise durch das Mischen der Kombination mit dem/den weichgemachten oder geschmolzenen Träger(n), gefolgt vom Abkühlen und Formgeben, gebildet werden. Sie können auch als Klistiere verabreicht werden.

[0069] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die an die vaginale Verabreichung angepaßt sind, können als Pessare, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schäume oder Sprayzusammensetzungen angeboten werden. Diese können Feuchthaltemittel oder Grundlagen, wie sie üblicherweise in der Technik verwendet werden, umfassen.

[0070] Es kann die Verwendung von mindestens einem RAIG1-Polypeptid bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verwendung bei der Behandlung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, bereitgestellt werden. Vorzugsweise können rekombinante RAIG1-Polypeptide bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, verwendet werden. Genauer gesagt, wird ein RAIG1-Polypeptid mit einem anderen Polypeptid fusioniert, so daß die Proteintransduktionsdomäne des HIV/Tat-Proteins, die den Eintritt des Fusionsproteins in eine Zelle erleichtert (Asoh, S. et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 17107–17112) zur Verwendung bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, bereitgestellt wird.

[0071] Rekombinante RAIG1-Polypeptide können durch in der Technik allgemein bekannte Verfahren aus genetisch veränderten Wirtszellen, die Expressionssysteme umfassen, hergestellt werden. Demgemäß bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf Expressionssysteme, die ein RAIG1-Polypeptid oder eine RAIG1-Nukleinsäure umfassen, auf Wirtszellen, die mit solchen Expressionssystemen genetisch verändert wurden, und auf die Herstellung von RAIG1-Polypeptiden durch rekombinante Techniken. Zur Produktion rekombinanter Polypeptide können auch Zell-freie Translationssysteme eingesetzt werden (z. B. Kaninchen-Retikulozytlysate, Weizenkeimlysate, SP6/T7 in vitro T & T und RTS 100 E. Coli HY-Transkription und Translationskits von Roche Diagnostics Ltd., Lewes, UK und das TNT Quick coupled-Transkriptions/Translationssystem von Promega, UK, Southampton, UK).

[0072] Für die Produktion von rekombinantem RAIG1-Polypeptid können Wirtszellen zur Einführung von Expressionssystemen oder Teilen davon für RAIG1-Nukleinsäuren genetisch verändert werden. Eine solche Einführung kann unter Verwendung von Verfahren, die in der Technik allgemein bekannt sind, wie Calciumphosphattransfektion, DEAD-Dextranvermittelte Transfektion, Transvektion, Mikroinjektion, kationische Lipid-vermittelte Transfektion, Elektroporation, Transduktion, Scrape Loading, ballistische Einführung oder Infektion durchgeführt werden (siehe z. B. Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, 1986 und Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989).

[0073] Repräsentative Beispiele für Wirtszellen umfassen bakterielle Zellen, z. B. E. Coli-, Streptokokken-, Staphylokokken-, Streptomyces- und Bacillus subtilis-Zellen; Pilzzellen, wie Hefezellen und Aspergillus-Zellen; Insektenzellen wie Drosophila S2- und Spodoptera Sf9-Zellen; Tierzellen wie CHO-, COS-, HeLa-, C127-, 3T3-, HEK 293-, BHK- und Bowes-Melanom-Zellen; und Pflanzenzellen.

[0074] Es können viele Expressionssysteme verwendet werden, wie zum Beispiel und ohne Einschränkung chromosomale, episomale und Virus-abgeleitete Systeme, z. B. Vektoren, die von bakteriellen Plasmiden, von Bakteriophage, von Transposonen, von Hefeepisomen, von Insertionssequenzen, von Hefechromosomenelementen, von Viren wie Bakuloviren, Papovaviren wie SV40, Vakziniaviren, Adenoviren, Geflügelpockenviren, Pseudorabies-Viren und Retroviren abgeleitet sind, und Vektoren, die von Kombinationen davon abgeleitet sind, wie die, die von genetischen Plasmid- und Bakteriophage-Elementen, wie Cosmiden und Phagemiden abge-

leitet sind. Die Expressionssysteme können Kontrollregionen enthalten, die die Expression sowohl regulieren als auch hervorrufen. Im allgemeinen kann jedes System oder jeder Vektor, das/der eine Nukleinsäure zur Erzeugung eines Polypeptids in einem Wirt halten, vermehren oder exprimieren kann, verwendet werden. Die geeignete Nukleinsäuresequenz kann in ein Expressionssystem durch viele allgemein bekannte und routinemäßige Techniken inseriert werden, wie die, die in Sambrook et al. oben angegeben sind. Geeignete Sekretionssignale können in das RAIG1-Polypeptid eingebracht werden, um die Sekretion des translatierten Proteins in den Lumen des endoplasmatischen Retikulums, des Periplasmas oder der extrazelluläre Umgebung zu ermöglichen. Diese Signale können aus dem RAIG1-Polypeptid stammen oder sie können heterologe Signale sein.

[0075] RAIG1-Polypeptide können in isolierter Form bereitgestellt werden und RAIG1-Polypeptide umfassen, die zumindest in einem gewissen Ausmaß gereinigt worden sind. RAIG1-Polypeptide können unter Verwendung rekombinanter Verfahren, synthetisch oder durch eine Kombination aus diesen Verfahren hergestellt werden. Die RAIG1-Polypeptide können in im wesentlichen reiner Form, das heißt im wesentlichen frei von anderen Proteinen, bereitgestellt werden. Daher kann ein RAIG1-Polypeptid in einer Zusammensetzung, in der es die hauptsächliche Komponente ist (d. h. es ist mit einem Niveau von mindestens 50 %; bevorzugt mindestens 75 %, mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 % oder mindestens 95 % vorhanden; bestimmt auf einer Gewicht/Gewicht-Basis, ausschließlich Lösungsmitteln oder Trägern) bereitgestellt werden.

[0076] Soll ein RAIG1-Polypeptid zur Verwendung in Zell-basierenden Screeningassays exprimiert werden, wird das Polypeptid bevorzugt an der Zelloberfläche erzeugt. In diesem Fall können die Zellen vor der Verwendung in dem Screeningassay geerntet werden. Wird das RAIG1-Polypeptid in das Medium sekretiert, kann das Medium zur Isolierung des Polypeptids gewonnen werden. Bei einer intrazellulären Erzeugung müssen die Zellen vor der Gewinnung des RAIG1-Polypeptids zuerst lysiert werden.

[0077] RAIG1-Polypeptide können aus rekombinanten Zellkulturen durch allgemein bekannte Verfahren, einschließlich Ammoniumsulfat- oder Ethanolpräzipitation, Säureextraktion, Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie, Phosphocellulosechromatographie, Affinitätschromatographie, Chromatographie auf Basis hydrophober Wechselwirkungen, Hydroxylapatitchromatographie, Molekularsiebchromatographie, Zentrifugationsverfahren, Elektrophoreseverfahren und Lectinchromatographie, gewonnen und gereinigt werden. Es wird eine Kombination dieser Verfahren verwendet. Alternativ wird Hochdruckflüssigchromatographie verwendet. Alternativ kann ein Antikörper, der spezifisch an ein RAIG1-Polypeptid bindet, zur Abreicherung einer Probe, die ein RAIG1-Polypeptid des Polypeptids umfaßt, oder zur Reinigung des Polypeptids verwendet werden. Zur Rückfaltung können allgemein bekannte Techniken verwendet werden, um so native oder aktive Konformationen der RAIG1-Polypeptide zu regenerieren, wenn die Polypeptide während der Isolierung und/oder Reinigung denaturiert worden sind.

[0078] Es kann die Verwendung mindestens einer RAIG1-Nukleinsäure bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verwendung bei der Behandlung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, bereitgestellt werden.

[0079] Hybridisierende RAIG1-Nukleinsäuremoleküle können als Antisense-Moleküle zur Veränderung der Expression von RAIG1-Polypeptiden durch die Bindung an komplementäre RAIG1-Nukleinsäuren verwendet werden und können bei der Behandlung oder Vorbeugung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, verwendet werden. Eine Antisense-Nukleinsäure umfaßt eine RAIG1-Nukleinsäure, die aufgrund dessen, daß etwas von der Sequenz, die zu einem Teil einer RNA (bevorzugt mRNA) komplementär ist, ein RAIG1-Polypeptid codiert, hybridisieren kann. Die Antisense-Nukleinsäure kann zu einem codierenden/oder nicht-codierenden Bereich einer mRNA, die solch ein Polypeptid codiert, komplementär sein. Am stärksten bevorzugt wird die Expression eines RAIG1-Polypeptids unter Verwendung von Antisense-Nukleinsäuren inhibiert. Daher kann die therapeutische oder prophylaktische Verwendung von Nukleinsäuren, die mindestens acht Nukleotide umfassen, die antisense zu einem Gen oder cDNA sind, die ein RAIG1-Polypeptid codieren, bereitgestellt werden.

[0080] Die Symptome eines Karzinoms können durch die Senkung des Spiegels oder der Aktivität eines RAIG1-Polypeptids unter Verwendung von Gensequenzen, die ein Polypeptid, wie hierin definiert, codieren, in Verbindung mit allgemein bekannten Gen-, „Ausschalt-“, Ribozym- oder Tripelhelix-Verfahren zur Verringerung der Genexpression des Polypeptids gebessert werden. In diesem Ansatz werden Ribozym- oder Tripelhelix-moleküle zur Modulierung der Aktivität, Expression oder Synthese des Gens und somit zur Besserung der Symptome eines Karzinoms verwendet. Solche Moleküle können so konstruiert sein, daß sie die Expression eines Mutanten- oder Nicht-Mutantenzielgens verringern oder inhibieren. Techniken zur Produktion und Ver-

wendung solcher Moleküle sind einem Fachmann allgemein bekannt.

[0081] Die endogene RAIG1-Polypeptid-Expression kann auch durch die Inaktivierung oder das „Ausschalten“ des Gens, das das Polypeptid codiert, oder des Promoters eines solchen Gens unter Verwendung der gezielten homologen Rekombination verringert werden (siehe beispielsweise Smithies, et al., 1985, *Nature* 317: 230–234; Thomas & Capecchi, 1987, *Cell* 51: 503–512; Thompson et al., 1989, *Cell* 5: 313–321; und Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342: 435–438). Beispielsweise kann ein Mutantengen, das ein nicht-funktionales Polypeptid (oder eine völlig unverwandte DNA-Sequenz), flankiert von DNA, die zu dem endogenen Gen homolog ist (entweder die codierenden Bereiche oder die Regulationsbereiche des Gens, das das Polypeptid codiert) codiert, mit oder ohne selektierbaren Marker und/oder einem negativen selektierbaren Marker zur Transfektion von Zellen, die das Zielgen in vivo exprimieren, verwendet werden. Die Insertion des DNA-Konstrukts mittels gezielter homologer Rekombination führt zur Inaktivierung des Zielgens.

[0082] Die Nukleinsäure kann mittels einer Gentherapie verabreicht werden (siehe zum Beispiel 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). Gentherapie bezieht sich auf die Verabreichung einer exprimierten oder exprimierbaren Nukleinsäure an ein Individuum. Jedes Verfahren für eine Gentherapie, das in der Technik verfügbar ist, kann gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden. In einem Aspekt umfaßt die pharmazeutische Zusammensetzung eine RAIG1-Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure ein Teil eines Expressionsvektors ist, der ein RAIG1-Polypeptid oder ein chimäres Protein davon in einem geeigneten Wirt exprimiert. Genauer gesagt, verfügt eine solche Nukleinsäure über einen Promoter, der operabel an den Polypeptid-codierenden Bereich gekoppelt ist, wobei der Promoter induzierbar oder konstitutiv (und gegebenenfalls gewebespezifisch) ist. Alternativ wird ein Nukleinsäuremolekül verwendet, in dem die codierenden Sequenzen und alle anderen gewünschten Sequenzen von Bereichen flankiert werden, die die homologe Rekombination an einer gewünschten Stelle in dein Genom fördern, wodurch die Nukleinsäure intrachromosomal exprimiert wird (Koller & Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932–8935; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342: 435–438).

[0083] Die Abgabe der RAIG1-Nukleinsäure in einen Patienten kann direkt vorgenommen werden, wobei in diesem Fall der Patient der Nukleinsäure oder dem Nukleinsäure-tragenden Vektor direkt ausgesetzt ist; dieser Ansatz ist als in vivo-Gentherapie bekannt. Alternativ kann die Abgabe der Nukleinsäure in den Patienten indirekt vorgenommen werden, wobei in diesem Fall zuerst Zellen mit der Nukleinsäure in vitro transformiert und dann in den Patienten transplantiert werden; dieser Ansatz ist als ex vivo-Gentherapie bekannt.

[0084] RAIG1-Nukleinsäuren können unter Verwendung von Standard-Klon- und Screening-Techniken aus einer cDNA-Bibliothek, abgeleitet von mRNA in menschlichen Zellen, unter Verwendung der Analyse der Expressed Sequence Tags (EST) erhalten werden (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: Suppl: 3–174). RAIG1-Nukleinsäuren können auch aus natürlichen Quellen wie genomischen DNA-Bibliotheken erhalten werden oder können unter Verwendung allgemein bekannter und kommerziell verfügbarer Techniken synthetisiert werden. Die RAIG1-Nukleinsäuren, die eine codierende Sequenz für die oben beschriebenen RAIG1-Polypeptide umfassen, können zur rekombinanten Produktion dieser Polypeptide verwendet werden. Die RAIG1-Nukleinsäuren können die Codierungssequenz für das reife Polypeptid selbst oder die Codierungssequenz für das reife Polypeptid in einem Leseraster mit anderen Codierungssequenzen wie denen, die eine Leader- oder Sekretionssequenz, eine Prä-, Pro- oder Präpro-Proteinsequenz, eine abspaltbare Sequenz oder andere Fusionspeptidteile codieren, wie einen Affinitätsanhang oder eine zusätzliche Sequenz, die während der Produktion des Polypeptids für Stabilität sorgt, umfassen. Bevorzugte Affinitätsanhänger umfassen multiple Histidinreste (siehe beispielsweise Gentz et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821 – 824), einen FLAG-Anhang, HA-Anhang oder myc-Anhang. Die RAIG1-Nukleinsäuren können auch nicht codierende 5'- und 3'-Sequenzen wie transkribierte, nicht-translatierte Sequenzen, Splicing- und Polyadenylierungssignale, Ribosombindungsstellen und Sequenzen, die mRNA stabilisieren, umfassen.

[0085] RAIG1-Polypeptidderivate unter bezug auf Teil b) oben können durch die Einführung einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in die Nukleotidsequenz einer RAIG1-Nukleinsäure erzeugt werden, so daß eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das codierte Protein eingeführt werden. Zur Einführung von Mutationen können Standardtechniken, die einem Fachmann allgemein bekannt sind, einschließlich beispielsweise ortsgerichtete Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, verwendet werden. Bevorzugt werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einem oder mehreren zuvor bestimmten nicht-essenziellen Aminosäureresten vorgenommen.

[0086] Eine RAIG1-Nukleinsäure, die ein RAIG1-Polypeptid codiert, einschließlich Homologa und Orthologa von anderen Spezies als dem Menschen, kann durch ein Verfahren erhalten werden, daß die Schritte des Screenings einer geeigneten Bibliothek unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit einer markierten Sonde mit der Sequenz einer RAIG1-Nukleinsäure, wie in a)–c) oben beschrieben, und des Isolierens von Vollängen-cDNA und genomischen Klonen, die diese Nukleinsäuresequenz enthalten, umfaßt. Solche Hybridisierungstechniken sind in der Technik allgemein bekannt. Ein Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen ist, wo der Hybridisierungsversuch bei einer Temperatur von etwa 35 °C bis etwa 65 °C unter Verwendung einer Salzlösung von etwa 0,9 M durchgeführt wird. Ein Fachmann wird jedoch in der Lage sein, solche Bedingungen nach Bedarf zu variieren, damit auch Variablen wie die Sondenlänge, die Grundzusammensetzung, die Art der vorhandenen Ionen usw. berücksichtigt werden. Für einen hohen Grad an Selektivität werden relativ stringente Bedingungen wie wenig Salz oder eine hohe Temperatur zur Bildung von Doppelsträngen verwendet. Hochstringente Bedingungen umfassen die Hybridisierung an Filter-gebundener DNA in 0,5 M NaHPO₄, 7 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 1 mM EDTA bei 65 °C und Waschen in 0,1 × SSC/0,1 % SDS bei 68 °C (Ausubel F. M. et al., Hrsg., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Bd. I, Green Publishing Associates, Inc., und John Wiley & Sons, Inc., New York, auf S. 2.10.3). Bei einigen Anwendungen sind weniger stringente Bedingungen für die Doppelstrangbildung erforderlich. Weniger stringente Bedingungen umfassen das Waschen in 0,2 × SSC/0,1 % SDS bei 42 °C (Ausubel et al., 1989, *supra*). Die Hybridisierungsbedingungen können auch stringenter gemacht werden, indem steigende Mengen an Formamid zugegeben werden, um den Hybriddoppelstrang zu destabilisieren. So können besondere Hybridisierungsbedingungen ohne weiteres manipuliert werden und werden im allgemeinen nach Bedarf ausgewählt. Im allgemeinen sind günstige Hybridisierungstemperaturen in Gegenwart von 50 %igem Formamid: 42 °C für eine Sonde, die zu 95 bis 100 % mit dem Fragment eines Gens, das ein Polypeptid, wie hierin beschrieben, codiert, identisch ist, 37 °C für eine 90–95 %ige Identität und 32 °C für eine 70–90 %ige Identität.

[0087] Einem Fachmann wird verständlich sein, daß in vielen Fällen eine isolierte cDNA-Sequenz dahingehend unvollständig sein wird, daß der Bereich, der für das Polypeptid codiert, kurz vor dem 5'-Ende der cDNA geschnitten ist. Dies ist die Folge einer Umkehrtranskriptase, einem Enzym mit einer inhärent niedrigen Verarbeitbarkeit (ein Maß für die Fähigkeit des Enzyms, während der Polymerisationsreaktion an der Matrix haften zu bleiben), die eine DNA-Kopie der mRNA-Matrix während der Synthese des ersten cDNA-Stranges nicht vervollständigen kann. Verfahren zum Erhalt von Vollängen-cDNAs oder zur Erweiterung kurzer cDNAs sind in der Technik allgemein bekannt, zum Beispiel RACE (rasche cDNA-Enden-Amplifikation; z. B. Frohman et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998–9002). Neue Modifikationen der durch die Marathon-Technologie (Ciontech Laboratories Inc.) exemplarisch dargestellten Technik haben die Suche nach längeren cDNAs signifikant vereinfacht. Diese Technologie nutzt cDNAs, hergestellt aus mRNA, extrahiert aus einem ausgewählten Gewebe, gefolgt von der Ligatur einer Adaptorsequenz an jedem Ende. Dann wird zur Amplifikation des fehlenden 5'-Endes der cDNA die PCR unter Verwendung einer Kombination aus genspezifischen und adaptorspezifischen Oligonukleotidprimern durchgeführt. Die PCR-Reaktion wird dann unter Verwendung von Nested-Primern (interne Primer), die so konstruiert sind, daß sie mit dem amplifizierten Produkt hybridisieren, typischerweise mit einem adaptorspezifischen Primer, der ferner 3' in der Adaptorsequenz hybridisiert, und einem genspezifischen Primer, der ferner 5' in der bekannten Gensequenz hybridisiert, wiederholt. Die Produkte dieser Reaktion können dann durch DNA-Sequenzierung und eine Vollängen-cDNA, die entweder durch die Verbindung des Produktes direkt mit der existierenden cDNA zum Erhalt einer vollständigen Sequenz, oder Durchführung einer separaten Vollängen-PCR unter Verwendung der neuen Sequenzinformation zur Gestaltung des 5'-Primers konstruiert wurde, analysiert werden.

[0088] Es kann eine Impfstoffzusammensetzung, die zur Behandlung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, nützlich ist, bereitgestellt werden. Ein RAIG1-Polypeptid oder eine -Nukleinsäure, wie oben beschrieben, kann bei der Herstellung von Impfstoffen zur Behandlung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, verwendet werden. Ein solches Material kann antigen und/oder immunogen sein. Antigene Materialien umfassen ein Protein oder eine Nukleinsäure, die zur Steigerung von Antikörpern verwendet werden kann oder tatsächlich in der Lage ist, eine Antikörperreaktion in einem Individuum zu induzieren. Immunogenes Material umfaßt ein Protein oder eine Nukleinsäure, das/die eine Immunantwort in einem Individuum hervorrufen kann. Daher kann im letzteren Fall das Protein oder die Nukleinsäure nicht nur eine Antikörperreaktion sondern überdies eine nicht auf Antikörpern basierende Immunantwort erzeugen, das heißt, eine zelluläre oder humorale Antwort. In der Technik ist allgemein bekannt, daß die Bereiche eines antigenen oder immunogenen Polypeptids, die für die Antigenität oder die Immunogenität des Polypeptids verantwortlich sind, das heißt, Epitop oder Epitope, identifiziert werden können. Zur Vorhersage des Antigenindex (ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, das ein Bereich antigen ist) eines RAIG1-Polypeptids können die einem Fachmann allgemein bekannten Aminosäure- und Peptidmerkmale verwendet wer-

den. Beispielsweise, aber ohne Einschränkung, können das „Peptidstruktur“-Programm (Jameson und Wolf, 1988, CABIOS, 4(1): 181) und eine als „Threading“ bekannte Technik (Altuvia Y. et al., 1995, J. Mol. Biol. 249: 244) verwendet werden. Daher können die RAIG1-Polypeptide eines oder mehrere dieser Epitope umfassen oder solchen Bereichen ausreichend ähneln, damit ihre antigenen/immunogenen Eigenschaften aufrechterhalten bleiben.

[0089] Da ein Polypeptid oder eine Nukleinsäure im Magen zerbrochen werden können, kann die Impfstoffzusammensetzung bevorzugt parenteral (z. B. subkutan, intramuskulär, intravenös oder durch intradermale Injektion) verabreicht werden.

[0090] Demgemäß können:

- a) die Verwendung eines solchen Impfstoffes bei der Induzierung einer Immunantwort in einem Individuum; und
- b) ein Verfahren zur Behandlung eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, in einem Individuum oder zur Impfung eines Individuums gegen ein Karzinom, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, umfassend den Schritt der Verabreichung einer wirksamen Menge eines RAIG1-Polypeptids oder einer -Nukleinsäure, bevorzugt als ein Impfstoff,

bereitgestellt werden.

[0091] Es kann ein Verfahren zur Behandlung von Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom in einem Individuum, umfassend die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge von mindestens einem Antikörper, der spezifisch an ein RAIG1-Polypeptid bindet, wobei der Antikörper an eine therapeutische oder Arzneistoffgruppierung konjugiert ist, bereitgestellt werden. Antikörper, die spezifisch an RAIG1-Polypeptide binden, können zur Inhibierung der Aktivität der Polypeptide verwendet werden.

[0092] Demgemäß wird die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch ein RAIG1-Polypeptid erkennt, zur Verwendung bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verwendung bei der Behandlung von Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, wobei der Antikörper an eine therapeutische oder Arzneistoffgruppierung konjugiert ist, bereitgestellt.

[0093] Ein Antikörper, der an eine therapeutische Gruppierung konjugiert ist, kann als eine therapeutische Zusammensetzung verwendet werden, die allein oder in Kombination mit einem oder mehreren zytotoxischen Faktoren) und/oder Zytokin(en) verabreicht wird. Genauer gesagt, können die Antikörper der Erfindung an ein therapeutisches Mittel oder eine Arzneistoffgruppierung konjugiert werden, um eine gegebene biologische Antwort zu modifizieren. Das therapeutische Mittel oder die Arzneistoffgruppierung ist nicht auf die klassischen chemischen therapeutischen Mittel beschränkt. Beispielsweise kann die Arzneistoffgruppierung ein Protein oder Polypeptid mit der gewünschten biologischen Aktivität sein. Solche Gruppierungen können beispielsweise und ohne Einschränkung ein Toxin wie Abrin, Rizin A, Pseudomonasexotoxin oder Diphtherietoxin; ein Protein wie Tumor-Nekrose-Faktor, α -Interferon, β -Interferon, Nervenwachstumsfaktor, aus Blutplättchen gewonnener Wachstumsfaktor, Gewebe-Plasminogenaktivator, ein Thrombosemittel oder ein antiangiogenes Mittel, z. B. Angiostatin oder Endostatin; oder einen Modifikator für die biologische Antwort wie ein Lymphokin, Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6), einen Granulozytmakrophagenkolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), einen Granulozytenkoloniestimulierenden Faktor (G-CSF), einen Nervenwachstumsfaktor (NGF) oder einen anderen Wachstumsfaktor umfassen. Andere therapeutische Gruppierungen können Radionuklide wie ^{111}In und ^{90}Y ; Antibiotika, z. B. Calicheamicin; oder Arzneistoffe wie zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, Alkylphosphocholine, Topoisomerase I-Inhibitoren, Taxoide und Suramin umfassen.

[0094] Techniken zur Konjugierung solcher therapeutischer Gruppierungen an Antikörper sind in der Technik allgemein bekannt (siehe z. B. Arnon et al., „Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy“, in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. Hrsg., 1985, S. 243–56, Hrsg. Alan R. Liss, Inc; Hellstrom et al., „Antibodies For Drug Delivery“, in Controlled Drug Delivery, 2. Auf., Robinson et al. Hrsg., 1987, S. 623–53, Marcel Dekker, Inc.; Thorpe, „Antibodies Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review“, in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications; Pinchera et al., 1985, Hrsg, S. 475–506; „Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabelled Antibodies In Cancer Therapy“, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (Hrsg.), 1985, S. 303–16, Academic Press; Thorpe et al., 1982 „The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibodies-Toxin Conjugates“, Immunol. Rev., 62: 119–58, und Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67–123).

[0095] Ein Antikörper kann an einen zweiten Antikörper unter Bildung eines Antikörperheterokonjugats konjugiert werden (siehe US 4,676,980).

[0096] Es können Fusionsproteine der Antikörper (oder funktional aktive Fragmente davon), zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, wenn der Antikörper oder dessen Fragment mittels einer kovalenten Bindung (z. B. einer Peptidbindung), gegebenenfalls am N-Terminus oder C-Terminus an eine Aminosäuresequenz eines anderen Proteins (oder eines Teils davon; bevorzugt mindestens einem 10-, 20- oder 50-Aminosäureteil des Proteins) konjugiert wird, bereitgestellt werden. Bevorzugt wird der Antikörper oder ein Fragment davon mit dem anderen Protein am N-Terminus der konstanten Domäne des Antikörpers verknüpft. Wie oben angegeben, können Fusionsproteine die Abreicherung oder Reinigung eines der hierin beschriebenen Polypeptide erleichtern, die Halbwertszeit in vivo verlängern und die Abgabe eines Antigens durch eine Epithelsperre hindurch in das Immunsystem verbessern.

[0097] RAIG1-Polypeptide oder Zellen, die diese exprimieren, können zur Erzeugung von Antikörpern, die beispielsweise spezifisch diese RAIG1-Polypeptide erkennen, verwendet werden.

[0098] Die spezifische Erkennung oder Bindung bedeutet insbesondere, daß die Antikörper eine größere Affinität zu RAIG1-Polypeptiden als zu anderen Polypeptiden haben. Antikörper, die gegen RAIG1-Polypeptid erzeugt wurden, können durch die Verabreichung der Polypeptide an einen Säuger, bevorzugt einen nicht-menschlichen Säuger, unter Verwendung allgemein bekannter und routinemäßiger Protokolle erhalten werden.

[0099] In einer weiteren Ausführungsform liefert die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an mindestens ein RAIG1-Polypeptid bindet, zum Screening auf Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom in einem Individuum oder zur Überwachung der Wirksamkeit einer Anti-Brustkrebs-, Anti-Darmkrebs- und/oder Anti-Osteosarkom-Therapie.

[0100] RAIG1-Antikörper können unter anderem zur Diagnose eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, durch den Nachweis der RAIG1-Expression in menschlichem Gewebe und/oder in Unterfraktionen davon, zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, Membran-, Zytosol- oder nuklearen Unterfraktionen, verwendet werden.

[0101] RAIG1-Antikörper umfassen funktional aktive Fragmente, Derivate oder Analoga und können polyklonale, monoklonale, bispezifische, humanisierte oder chimäre Antikörper, Einzelketten-Antikörper, Fab-Fragmente und F(ab')-Fragmente, Fragmente, erzeugt durch eine Fab-Expressionsbibliothek, anti-idiotypische (anti-Id-) Antikörper und Epitop-bindende Fragmente von irgendeinem der obigen sein, sind aber nicht darauf beschränkt. Humanisierte Antikörper sind Antikörpermoleküle von nicht-menschlichen Spezies mit einem oder mehreren komplementäritätsbestimmenden Bereichen (CDRs) von der nicht-menschlichen Spezies und einer Gerüstregion aus einem menschlichen Immunglobulinmolekül (siehe beispielsweise US 5,585,089). Antikörper umfassen Immunglobulinmoleküle und immunologisch aktive Teile von Immunglobulinmolekülen, d. h. Molekülen, die eine Antigenbindungsstelle aufweisen, die spezifisch ein Antigen bindet. Die Immunglobulinmoleküle der Erfindung können aus jeder Klasse (z. B. IgG, IgE, IgM, IgD und IgA) oder einer Unterklasse von Immunglobulinmolekülen stammen.

[0102] Monoklonale Antikörper können durch irgendein in der Technik bekanntes Verfahren wie die Hybridomtechnik (Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495–497), die Triomtechnik, die humane B-Zellen-Hybridom-Technik (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4: 72) und die EBV-Hybridom-Technik (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, S. 77–96, Alan R Liss, Inc., 1985) hergestellt werden.

[0103] Chimäre Antikörper sind die Antikörper, die durch Immunglobulingene codiert sind, die genetisch so verändert wurden, daß die leicht- und schwerkettigen Gene aus Immunglobulingensegmenten bestehen, die unterschiedlichen Spezies angehören. Diese chimären Antikörper sind wahrscheinlich weniger antigen. Bispezifische Antikörper können durch in der Technik bekannte Verfahren hergestellt werden (Milstein et al., 1983, *Nature* 305: 537 – 539; WO 93/08829, Trautwein et al., 1991, *EMBO J.* 10: 3655–3659).

[0104] Die Antikörper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können ebenfalls unter Verwendung verschiedener Phagedisplay-Verfahren hergestellt werden, die in der Technik bekannt sind, und umfassen diejenigen, die von Brinkman et al. (in *J. Immunol. Methods*, 1995, 182: 41–50), Ames et al. (in *J. Immunol. Methods*, 1995, 184: 177–186), Kettleborough et al. (in *Eur. J. Immunol.* 1994, 24: 952–958), Persic et al. (*Gene*, 1997, 187: 9–18), Burton et al., (in *Advances in Immunology*, 1994, 57: 191–280) und in WO 90/02809; WO 91/10737;

WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; und US 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 und 5,969,108 offenbart werden. Techniken zur Herstellung von Einzelketten-Antikörpern wie denen, die in US 4,946,778 beschrieben sind, können auch an die Produktion von Einzelketten-Antikörpern gegen NKCC1-Polypeptide angepaßt werden. Auch transgene Mäuse oder andere Organismen, einschließlich anderer Säuger, können zur Expression humanisierter Antikörper verwendet werden.

[0105] Der Nachweis der Wechselwirkung eines Antikörpers mit einem Antigen kann durch die Kopplung des Antikörpers an eine nachweisbare Substanz, zum Beispiel, aber ohne Einschränkung, ein Enzym (wie Meerrettichperoxidase, Alkaliphosphatase, beta-Galactosidase, Acetylcholinesterase), eine prosthetische Gruppe (wie Streptavidin, Avidin, Biotin), ein fluoreszierendes Material (wie Umbelliferone, Fluorescein, Fluoresceinisothoniocyanat, Rhodamin, Dichlortriazinylaminfluorescein, Dansylchlorid, Phycoerythrin), ein lumineszierendes Material (wie Luminol), ein biolumineszierendes Material (wie Luciferase, Luciferin, Aequorin), ein radioaktives Nuklid (wie ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{99}Tc), ein Positronen emittierendes Metall oder ein nicht-radioaktives paramagnetisches Metallion (siehe US 4,741,900), erleichtert werden.

[0106] Die Antikörper der Erfindung umfassen Analoga und Derivate, die beispielsweise, aber ohne Einschränkung, durch kovalente Anlagerung irgendeiner Molekülart modifiziert sind. Bevorzugt beeinträchtigt diese Anlagerung die immunospezifische Bindung nicht.

[0107] Zusammengefaßt liefert die Erfindung ferner:

- (iv) die Verwendung eines an ein RAIG1-Polypeptid spezifisch bindenden Antikörpers bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, wobei der Antikörper an eine therapeutische oder Arzneistoffgruppierung konjugiert ist.

[0108] Die Erfindung wird nunmehr anhand der folgenden Beispiele, die nur zur Veranschaulichung sind und den Umfang der vorliegenden Erfindung in keinsten Weise einschränken sollen, beschrieben. Die Beispiele beziehen sich auf die Figuren, worin:

[0109] [Fig. 1](#) die Proteinsequenz von RAIG1 (RAIG1; AAC98506/O95357), SEQ ID NO: 1 zeigt. Die Tandemmassenspektrum-Peptide sind fett und unterstrichen, die Peptide der MALDI-Massenspektren sind fett;

[0110] [Fig. 2](#) die Nukleinsäuresequenz von RAIG1 (RAIG1; AF095448), SEQ ID NO: 2 zeigt;

[0111] [Fig. 3](#) die Verteilung der RAIG1-mRNA in Patienten-abgeglichenem benachbartem normalem (eine Zahl, gefolgt von dem Buchstaben N) und Tumor-Brustgewebe (eine Zahl, gefolgt von dem Buchstaben T) zeigt; die mRNA-Spiegel wurden durch Echtzeit-RT-PCR quantifiziert und als Anzahl an Kopien, ng^{-1} cDNA, ausgedrückt;

[0112] [Fig. 4](#) die Verteilung der RAIG1-mRNA in abgeglichenem normalem (eine Zahl, gefolgt von dem Buchstaben N) und Tumor-Darmgewebe (eine Zahl, gefolgt von dem Buchstaben T) zeigt; die mRNA-Spiegel wurden durch Echtzeit-RT-PCR quantifiziert und als Anzahl an Kopien, ng^{-1} cDNA, ausgedrückt;

[0113] [Fig. 5](#) die Verteilung der RAIG1-mRNA in 3 abgeglichenen normalen (norm) und 8 Pankreastumorgebepben zeigt; die mRNA-Spiegel wurden durch Echtzeit-RT-PCR quantifiziert und als Anzahl an Kopien, ng^{-1} cDNA, ausgedrückt;

[0114] [Fig. 6](#) die Verteilung von RAIG1-mRNA in Brusttumorgeweben zeigt. Es wurden 40 Tumorproben von Patienten mit (schwarze Balken) oder ohne (weiße Balken) Lymphknotenmetastasen erhalten, ebenso werden 2 normale Brustgewebepben gezeigt (graue Balken). Die mRNA-Spiegel wurden durch Echtzeit-RT-PCR quantifiziert und als Anzahl an Kopien, ng^{-1} cDNA, ausgedrückt;

[0115] [Fig. 7](#) die Verteilung von RAIG1-mRNA in normalem Lungengewebe und 6 Lungenkrebsproben zeigt; die mRNA-Spiegel wurden durch Echtzeit-RT-PCR quantifiziert und als Anzahl an Kopien, ng^{-1} cDNA, ausgedrückt;

[0116] [Fig. 8](#) die Verteilung von RAIG1-mRNA in normalem Eierstock- und Knochenmarksgewebe, Eierstock- und Osteosarkom-Zelllinien, 5 Eierstock-serösen Zystadenokarzinom-Proben, 6 Eierstock-Adenokarzinom-Proben und 3 Osteosarkomproben zeigt; mRNA-Spiegel wurden durch Echtzeit-RT-PCR quantifiziert und als Anzahl an Kopien, ng^{-1} cDNA, ausgedrückt.

Beispiel 1 – Isolierung des RAIG1-Proteins aus Brust-, Nieren-, Pankreas- und Leber-Zelllinien:

[0117] Proteine in Brust-, Nieren-, Pankreas- und Leberkrebs-Zelllinienmembranen wurden durch SDS-PAGE abgetrennt und analysiert.

Rohfraktionierung von Zelllinien

1a – Zellkultur

[0118] Die Pankreastumorzelllinie HPAFII wurde in EMEM + 2 mM Glut + 1 mM NaPyr + 1 % NEAA + 10 % FBS + 1,5 g/l NaBicarb kultiviert. Die Pankreastumorzelllinie Capan2 wurde in McCoy's + 2 mM Glutamin + 10 % FBS + 1,5 g/l NaBicarb kultiviert (Capan2).

[0119] Die Brustkrebszelllinien T47D und MCF7pool wurden in DMF12-Medien, die 10 % fetales Kälberserum, 2 mM Glutamin und 1 % Penizillin/Streptomycin enthielten, kultiviert.

[0120] Die Leberkrebszelllinien SK 3B2.1-7 und SKHep1pool) wurden in EMEM + 2 mM Glut + 1 mM NaPyr + 1 % NEAA + 10 % FBS kultiviert.

[0121] Verwendete Nierenkrebszelllinien waren CAK12 + A498 + SW839 + CAKI2pool. CAKI2 wurde in McCoy's + 2 mM Glut + 10 % FBS kultiviert, A498- und SW839-Zellen wurden in DMEM + 2 mM Glut + 10 % FBS kultiviert. Alle Zellen konnten bei 37 °C in feuchter Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % Kohlendioxid wachsen.

1b – Zellfraktionierung und Plasmamembranerzeugung

[0122] Gereinigte Membranpräparate wurden aus den Zelllinien isoliert. Adhärenzte Zellen (2×10^8) wurden dreimal mit PBS gewaschen und unter Verwendung eines Kunststoff-Zellmitnehmers abgekratzt. Die Zellen wurden bei $1000 \times g$ 5 min bei 4 °C zentrifugiert, und das Zellpellet wurde in Homogenisierungspuffer (250 mM Saccharose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM Vanadat und 0,02 % Azid, Proteaseinhibitoren) wieder suspendiert. Die Zellen wurden unter Verwendung eines Kugellagerhomogenisators (8,002 mm Kugel, HGM Laborausüstung) fraktioniert, bis ungefähr 95 % der Zellen aufgeschlossen waren. Die Membranen wurden unter Verwendung der von Pasquali, C. et al. (1999, J. Chromatography 722: S. 89–102) beschriebenen Verfahren fraktioniert. Die fraktionierten Zellen wurden bei $3000 \times g$ 10 min bei 4 °C zentrifugiert, und der postnukleare Überstand wurde auf ein 60 %iges Saccharosekissen geschichtet und bei $100\,000 \times g$ 45 min zentrifugiert. Die Membranen wurden unter Verwendung einer Pasteurpipette gesammelt und auf einen zuvor gebildeten 15 bis 60 %igen Saccharosegradienten geschichtet und bei $100\,000 \times g$ 17 Stunden geschleudert. Die Proteine aus dem fraktionierten Saccharosegradienten wurden auf einem 4–20 %igen 1D-Gel (Novex) laufengelassen und dem Western-Blotting unterzogen; die Fraktionen, die Alkaliphosphatase- und Transferrinimmunreaktivität, aber keine Oxidoreduktase II- oder Calnexinimmunreaktivität enthielten, wurden gesammelt und stellten die Plasmamembranfraktion dar.

1.c – Herstellung von Plasmamembranfraktionen für die 1D-Gelanalyse

[0123] Plasmamembranfraktionen, die Transferrinimmunreaktivität, aber keine Oxidoreduktase II- oder Calnexinimmunreaktivität aufwiesen, wurden identifiziert. Diese Saccharosefraktionen wurden gesammelt und mindestens viermal mit 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM Vanadat, 0,02 % Azid verdünnt. Die verdünnte Saccharosefraktion wurde in eine SW40- oder SW60-Röhre gegeben und bei $100\,000 \times g$ 45 min unter langsamer Beschleunigung und Abbremsung zentrifugiert. Der Überstand wurde von dem Membranpellet entfernt, und das Pellet wurde dreimal mit PBS-CM gewaschen. Das Membranpellet wurde in 2 % SDS in 63 mM TrisHCl, pH 7,4, solubilisiert. Es wurde ein Proteinassay durchgeführt, gefolgt von der Zugabe von Mercaptoethanol (2 % Endkonzentration), Glycerol (10 %) und Bromphenol Blau (0,0025 % Endkonzentration). Die endgültige Proteinkonzentration von 1 µg/µl wurde zur 1D-Gelbeladung verwendet.

1d – 1D-Geltechnologie

[0124] Die Protein- oder Membranpellets wurden in 1D-Probenpuffer (ungefähr 1 mg/ml) solubilisiert, und das Gemisch wurde für 5 min auf 95 °C erwärmt.

[0125] Die Proben wurden unter Verwendung der 1D-Gelelektrophorese auf vorgegossenen 8 bis 16 %igen Gradientengelen, gekauft von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK) getrennt. Eine Probe,

enthaltend 30–50 Mikrogramm der Proteingemische, erhalten aus einem Reinigungsmittel-extrakt, wurde unter Verwendung einer Mikropipette auf die gestapelten Gellöcher aufgetragen. Für die Kalibrierung wurde ein Loch, das Molekulargewichtsmarker enthielt (10, 1.5, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa) durch Interpolation des abgetrennten Gels nach der Bildgebung einbezogen. Die Trennung der Proteine wurde durch das Anlegen eines Stroms von 30 mA an das Gel für ungefähr 5 Stunden oder so lange, bis der Bromphenol Blau-Markerfarbstoff den Boden des Gels erreicht hat, durchgeführt.

[0126] Nach der Elektrophorese wurden die Gelplatten aufgebrochen, das Gel in einer Schale mit Fixiermittel (10 % Essigsäure, 40 % Ethanol, 50 % Wasser) plaziert und über Nacht geschüttelt. Das Gel wurde dann 30 Minuten durch Schütteln in einer Primerlösung (7,5 % Essigsäure, 0,05 % SDS in Milli-Q-Wasser) immunologisch aktiviert, gefolgt von der Inkubation mit einem fluoreszierenden Farbstoff (0,06 % OGS-Farbstoff in 7,5 % Essigsäure) unter Schütteln für 3 h. Ein bevorzugter fluoreszierender Farbstoff wird in US 6,335,446 offenbart. Sypro Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) ist ein geeigneter alternativer Farbstoff für diesen Zweck.

[0127] Ein digitales Bild des gefärbten Gels wurde durch das Scannen auf einem Storm-Scanner (Molecular Dynamics Inc, USA) im Blaufluoreszenzmodus erhalten. Das eingefangene Bild wurde zur Bestimmung der Fläche des Gels verwendet, die für die In-Gel-Proteolyse ausgeschnitten werden soll.

1e – Gewinnung und Analyse selektierter Proteine

[0128] Es wurde eine vertikale Spur des Gels, die 77 kDa entsprach, entweder unter Verwendung einer Edelstahl-Skalpellklinge oder eines PEEK-Gel-Schneiders (OGS), der sequentiell an der Gelspur herunter schneidet, ohne den Versuch, spezifische Proteinbanden zu sammeln, ausgeschnitten.

[0129] Unter Verwendung der In-Gel-Digestion mit Trypsin (modifiziertes Trypsin, Promega, Wisconsin, USA) wurden zur Erzeugung von tryptischen Digestionspeptiden Proteine verarbeitet. Die gewonnen Proben wurden zweigeteilt. Vor der MALDI-Analyse wurden die Proben entsalzt und unter Verwendung von C18-Zip-Tips™ (Millipore, Bedford, MA) konzentriert. Die Proben für die Tandemmassenspektrometrie wurden unter Verwendung eines Nano-LC-Systems (LC Packings, Amsterdam, Niederlande), das C18 SPE-Material einsetzt, gereinigt. Die gewonnen Peptidpools wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Voyager STR, Applied Biosystems, Framingham, MA) unter Verwendung eines Lasers mit einer Wellenlänge von 337 nm zur Desorption und des Reflektoranalysemodus analysiert. Die Pools wurden ebenso unter Verwendung der Nano-LC-Tandemmassenspektrometrie (LC/MS/MS) unter Verwendung eines Micromass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF)-Massenspektrometers (Micromass, Altrincham, UK) analysiert. Für eine teilweise Aminosäuresequenzierung und Identifizierung von Leber- und Lungenkrebszellmembranproteinen wurden nicht-interpretierte Tandemmassenspektren tryptischer Peptide mit einer Datenbank für Public-Domain-Proteine, konstruiert aus Proteinzugängen in der nicht-redundanten Datenbank, verwaltet vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI), das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> zugänglich ist, unter Verwendung des SEQUEST-Suchprogramms (Eng et al., 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5: 976–989), Version v.C.1, abgeglichen. Kriterien für die Datenbankidentifizierung umfaßten: die Spaltungsspezifität von Trypsin und den Nachweis einer Gruppe von a-, b- und y-Ionen in Peptiden, die aus der Datenbank zurückerhalten wurden. Nach der Identifizierung der Proteine durch Spektral-Spektral-Korrelation unter Verwendung des SEQUEST-Programms wurden die Massen, die in den MALDI-TOF-Massenspektren nachgewiesen wurden, tryptischen Digestionspeptiden innerhalb der identifizierten Proteine zugewiesen. In Fällen, wo keine Aminosäuresequenzen durch den Abgleich mit nicht interpretierten MS/MS-Spektren von tryptischen Digestionspeptiden unter Verwendung des SEQUEST-Programms identifiziert werden konnten, wurden die Tandemmassenspektren der Peptide manuell unter Verwendung von Verfahren, die in der Technik bekannt sind, interpretiert. (Im Falle der Interpretation von energiearmen Fragmentierungs-Massenspektren von Peptidionen siehe Gaskell et al., 1992, Rapid Commun. Mass Spectrom. 6: 658–662). Die in WO 02/21139 beschriebenen Verfahren können zur Interpretation der Massenspektren auch verwendet werden.

[0130] Es wurde herausgefunden, daß zwei Tandemspektren (in [Fig. 1](#) fett und unterstrichen) und 1 Massenübereinstimmung (in [Fig. 1](#) fett) mit den GenBank-Zugriffszahlen (AF095448 und AAC98506 und SwissProt 095357) übereinstimmen.

Beispiel 2: Normale Gewebeverteilung, und Heraufreulierung von RAIG1 in krankem Gewebe unter Verwendung-quantitativer RT-PCR (Tagman)-Analyse

[0131] Zur quantitativen Messung der RAIG1-Expression im Bereich von Tumorgeweben und abgeglichenen

Kontrollen wurde die Echtzeit-RT-PCR verwendet. Die ethische Zulassung für normale und Brusttumorgewebeprobe wurde in der Chirurgie erhalten (University of Oxford, UK). Das Darm-, Lungen-, Eierstock-seröse Zystadenokarzinom, Eierstock-Adenokarzinom-Proben, das metastatische Osteosarkom und Pankreastumoren waren von Ardais Corp., Peterborough Tissue Bank, Human Research Tissue Bank, Peterborough District Hospital, UK, und Clinomics Biosciences Inc., MD, erhältlich. Die Primer, die für die PCR verwendet wurden, waren die folgenden:

Sense, 5'-ctcgtgaagaagagctatggtc-3', (SEQ ID NO: 3)

Antisense, 5'-cactcttcaggacagagtagc-3' (SEQ ID NO: 4)

[0132] Reaktionen, die 5 ng cDNA, SYBR-Grün-Sequenznachweisreagenzien (PE Biosystems) und Sense- und Antisenseprimer enthielten, wurden auf einem AB17700-Sequenznachweissystem (PE Biosystems) bewertet. Die PCR-Bedingungen waren 1 Zyklus bei 50 °C für 2 min, 1 Zyklus bei 95 °C für 10 min und 40 Zyklen bei 95 °C für 15 s, 65 °C für 1 min. Die Akkumulation des PCR-Produkts wurde in Echtzeit als das Ansteigen der SYBR-Grünfluoreszenz gemessen, und die Daten wurden unter Verwendung des Sequenznachweis-Programms v1.6.3 (PE Biosystems) analysiert. Standardkurven, die sich auf die anfängliche Anzahl der Matrizenkopien im Fluoreszenz- und Amplifikationszyklus beziehen, wurden unter Verwendung des amplifizierten PCR-Produktes als eine Matrix erzeugt und zur Berechnung der Anzahl an RAIG1-Kopien in jeder Probe verwendet.

[0133] In normalen Geweben waren relativ niedrige Expressionsspiegel von RAIG1 zu sehen ([Fig. 3-Fig. 8](#); wobei anzumerken ist, daß die Maßstäbe der Figuren unterschiedlich sind).

[0134] Im Gegensatz dazu waren die Spiegel der RAIG1-Expression in Brusttumorenproben, bezogen auf ihre entsprechenden Kontrollen, höher, wobei 5/7 Tumorenproben einen enormen Anstieg der Expressionsspiegel pro ng cDNA zeigten ([Fig. 3](#)).

[0135] Die Expression der RAIG1-Expression wurde in dreizehn Darmtumorenproben überprüft, und es war eine erhöhte Expression in zehn Proben, bezogen auf eine Kontrollprobe aus normalem Darm, zu erkennen, wobei zwei eine leichte Veränderung und eine Tumorenprobe einen kleinen Rückgang zeigten ([Fig. 4](#)). In Pankreas tumorenproben war eine Erhöhung der RAIG1-mRNA-Expression in sechs von acht Tumorenproben, bezogen auf qPankreaskontrollgewebe, zu erkennen ([Fig. 5](#)). In Lungentumorenproben zeigten 4/6 Proben eine erhöhte RAIG1-Expression, bezogen auf eine Lungengewebskontrollprobe ([Fig. 7](#)).

[0136] Überdies wurde die Expression von RAIG1 in Brustgewebeprobe von 20 Patienten mit Lymphknotenmetastasen und 20 Patienten ohne Lymphknotenmetastasen untersucht. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu beobachten, obgleich ein Vergleich mit normalen Brustgewebeprobe zeigte, daß RAIG1 bei einigen Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu Kontrollen heraufreguliert war ([Fig. 6](#)).

[0137] Die Expression von RAIG1-mRNA wurde in 5 Proben von Eierstock-serösem Zystadenokarzinom, 6 Eierstock-Adenokarzinom-Proben, 3 metastatischen Osteosarkom-Proben und in Kontrollgewebe und -zelllinien überprüft. Bei 2/6 der Eierstock-Adenokarzinom-Proben und 2/3 der metastatischen Osteosarkom-Proben war eine Erhöhung 2/3 der metastatischen Osteosarkom-Proben war eine Erhöhung der RAIG1-mRNA-Expressionsspiegel zu erkennen, bei den Proben von Eierstock-serösem Zystadenokarzinom war jedoch keine Erhöhung zu erkennen ([Fig. 8](#)).

[0138] Diese Daten demonstrieren, daß RAIG1 in vielen tumorbildenden Zelllinien, einschließlich Brust-, Leber- und Pankreaszelllinien, exprimiert wird und daß es sich bei einer bestimmten Auswahl an Karzinomen, einschließlich Brustkrebs, Darmkrebs, Eierstock-Adenokarzinom, Osteosarkom, Lungenkrebs und Pankreaskrebs, erhöht, was ein Anzeichen dafür ist, daß RAIG1 wahrscheinlich als ein Karzinomtarget von Nutzen ist. Diese Erkenntnis war aus früher berichteten Erkenntnissen über die Expression von RAIG1-mRNA-Spiegeln nicht vorherzusagen, RAIG1 wurde anfänglich unter Verwendung von Differential Display als die cDNA eines neuen Gens mit hohen mRNA-Expressionsspiegeln in fetalen und adulten Lungengewebe identifiziert (Cheng, Y. & Lotan, R., 1998, J. Biol. Chem. 273: 35008–35015). Es ist berichtet worden, daß seine Expression von all-trans-Retinsäure (ATRA) induziert wird. Drei von fünf Kopf- und Hals- und vier Lungenkrebszelllinien mit niedrigen RAIG1-mRNA-Spiegeln zeigten erhöhte mRNA bei der Behandlung mit ATRA (Cheng & Lotan, oben), die Expressionsspiegel von RAIG1, die von diesen Autoren demonstriert wurden, waren jedoch sehr variabel (von nicht nachweisbaren bis hohen Expressionsspiegeln). Eine andere Gruppe hat berichtet, daß RAIG1 eingeschränktes Expressionsmuster mit der höchsten Häufigkeit in Lungengewebe zeigt (Brauner-Osbourne, H. & Krosgaard-Larsen, P. 2000, Genomics, 65: 121–128), wobei wir im Gegensatz dazu, obgleich

wir in Kontrollgewebeproben niedrige Expressionsspiegel fanden, keine höhere Expression von RAIG1-mRNA in normalem Lungengewebe fanden, insbesondere im Vergleich zu den Spiegeln, die Tumorproben zeigten. So zeigen diese Ergebnisse deutlich eine erhöhte Expression von RAIG1-mRNA bei zahlreichen Karzinomarten, was ein Anzeichen für deren Nützlichkeit bei der Diagnose, Behandlung und/oder Prophylaxe eines Karzinoms, z. B. Brustkrebs, Pankreaskrebs, Lungenkrebs, Leberkrebs, Eierstockkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, ist, die aus der Literatur bisher nicht ersichtlich gewesen ist.

Sequenzprotokoll

<110> Oxford GlycoSciences (UK) Ltd
Terrett, Jonathan A

<120> An Carconomen beteiligtes Protein

<130> P0180-W001

<150> GB0208331.9

<151> 2002-04-11

<150> GB0221538.2

<151> 2002-09-17

<160> 4

<170> PatentIn Version 3.1

<210> 1

<211> 357

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Thr Thr Val Pro Asp Gly Cys Arg Asn Gly Leu Lys Ser Lys
1 5 10 15

Tyr Tyr Arg Leu Cys Asp Lys Ala Glu Ala Trp Gly Ile Val Leu Glu
20 25 30

Thr Val Ala Thr Ala Gly Val Val Thr Ser Val Ala Phe Met Leu Thr
35 40 45

Leu Pro Ile Leu Val Cys Lys Val Gln Asp Ser Asn Arg Arg Lys Met
50 55 60

Leu Pro Thr Gln Phe Leu Phe Leu Leu Gly Val Leu Gly Ile Phe Gly
65 70 75 80

Leu Thr Phe Ala Phe Ile Ile Gly Leu Asp Gly Ser Thr Gly Pro Thr
85 90 95

Arg Phe Phe Leu Phe Gly Ile Leu Phe Ser Ile Cys Phe Ser Cys Leu			
100	105	110	
Leu Ala His Ala Val Ser Leu Thr Lys Leu Val Arg Gly Arg Lys Pro			
115	120	125	
Leu Ser Leu Leu Val Ile Leu Gly Leu Ala Val Gly Phe Ser Leu Val			
130	135	140	
Gln Asp Val Ile Ala Ile Glu Tyr Ile Val Leu Thr Met Asn Arg Thr			
145	150	155	160
Asn Val Asn Val Phe Ser Glu Leu Ser Ala Pro Arg Arg Asn Glu Asp			
	165	170	175
Phe Val Leu Leu Leu Thr Tyr Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe			
	180	185	190
Leu Met Ser Ser Phe Thr Phe Cys Gly Ser Phe Thr Gly Trp Lys Arg			
	195	200	205
His Gly Ala His Ile Tyr Leu Thr Met Leu Leu Ser Ile Ala Ile Trp			
	210	215	220
Val Ala Trp Ile Thr Leu Leu Met Leu Pro Asp Phe Asp Arg Arg Trp			
225	230	235	240
Asp Asp Thr Ile Leu Ser Ser Ala Leu Ala Ala Asn Gly Trp Val Phe			
	245	250	255
Leu Leu Ala Tyr Val Ser Pro Glu Phe Trp Leu Leu Thr Lys Gln Arg			
	260	265	270
Asn Pro Met Asp Tyr Pro Val Glu Asp Ala Phe Cys Lys Pro Gln Leu			
	275	280	285
Val Lys Lys Ser Tyr Gly Val Glu Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Glu Glu			
	290	295	300
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			

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> 2302

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

ccaaggtctc cccagcact gaggagctcg cctgctgcc tcttgccgc gggaagcagc    60
accaagttca cggccaacgc cttggcacta gggctcagaa tggctacaac agtccctgat    120
ggttgccgca atggcctgaa atccaagtac tacagacttt gtgataaggc tgaagcttgg    180
ggcatcgtec tagaaacggg ggccacagcc ggggttgtga cctcgggtggc cttcatgctc    240
actctccgga tctcgtctg caaggtgcag gactccaaca ggcgaaaaat gctgcctact    300
cagtttctct tctcctggg tgtgttggg atctttggc tcaccttcgc cttcatcatc    360
ggactggacg ggagcacagg gccacacgc ttcttctct ttgggatcct cttttccatc    420
tgcttctcct gctgctggc tcatgctgtc agtctgacca agctcgtccg ggggaggaag    480
cccctttccc tgttggtgat tctgggtctg gccgtgggct tcagcctagt ccaggatgtt    540
atcgctattg aatatattgt cctgaccatg aataggacca acgtcaatgt cttttctgag    600
ctttccgctc ctgctcgcaa tgaagacttt gtcctcctgc tcacctacgt cctcttcttg    660
atggcgctga cttcctcat gtcctccttc accttctgtg gttccttcac gggctggaag    720
agacatgggg ccacatcta cctcacgatg ctctctcca ttgccatctg ggtggcctgg    780
atcacccctg tcatgcttcc tgactttgac cgcagggtgg atgacaccat cctcagctcc    840
gccttggtctg ccaatggctg ggtgttctct ttggcttatg ttagtcccga gttttggctg    900
ctcaciaaagc aacgaaaccc catggattat cctgttgagg atgctttctg taaacctcaa    960
ctcgtgaaga agagctatgg tgtggagaac agagcctact ctcaagagga aatcactcaa   1020
ggttttgaag agacagggga cacgtcttat gcccctatt ccacacattt tcagctgcag   1080
aaccagcctc cccaaaagga attctccatc ccacgggccc acgcttggcc gagcccttac   1140
aaagactatg aagtaaagaa agagggcagc taactctgtc ctgaagagtg ggacaaatgc   1200
agccggggcg cagatctagc gggagctcaa agggatgtgg gcgaaatctt gagtcttctg   1260
agaaaactgt acaagacact acgggaacag tttgcctccc tcccagcctc aaccacaatt   1320
cttccatgct ggggctgatg tgggctagta agactccagt tcttagaggc gctgtagtat   1380
tttttttttt ttgtctcatc ctttgataac ttcttttaag tgggagtctc aggcaactca   1440
agtttagacc ctactcttt ttgtttgttt tttgaaacag gatcttgctc tgtcaccag   1500
gcttgagtgc agtggtgcga tcacagccca gtgcagcctc gaccacctgt gctcaagcaa   1560
tctcccacat tccatctccc aaagtgtgg gatgacaggg gtgagccaca gctcccagcc   1620
taggccctta atcttgctgt tattttccat ggactaaagg tctggtcacg tgagctcacg   1680
ctggctcaca cagctctagg ggcctgctcc tctaactcac agtgggtttt gtgaggctct   1740
gtggcccaga gcagacctgc atatctgagc aaaaatagca aaagcctctc tcagcccact   1800

```



```

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

```

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Primer

<400> 3
 ctcgtgaaga agagctatgg tc 22

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Primer

<400> 4
 cactcttcag gacagagtta gc 22

Patentansprüche

1. Verfahren zum Screening auf Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom in einem Individuum und/oder zur Überwachung der Wirksamkeit einer Anti-Brustkrebs-, Anti-Darmkrebs- und/oder Anti-Osteosarkom-Therapie, wobei man in dem Verfahren in einer dem Individuum entnommenen biologischen Probe ein RAIG1-Polypeptid, das die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:1 umfaßt oder daraus besteht, nachweist und/oder quantifiziert, wobei das RAIG1-Polypeptid unter Verwendung eines an das RAIG1-Polypeptid spezifisch bindenden Antikörpers nachgewiesen und/oder quantifiziert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Spiegel des Polypeptids mit einem zuvor bestimmten Referenzbereich bzw. einer zuvor bestimmten Referenzkontrolle verglichen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Antikörper auf einer Festphase immobilisiert ist.

4. Verwendung eines an ein RAIG1-Polypeptid spezifisch bindenden Antikörpers mit der in Anspruch 1 angegebenen Bedeutung bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom, wobei der Antikörper an eine therapeutische oder Arzneistoffgruppierung konjugiert ist.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei es sich bei dem Antikörper um einen polyklonalen, monoklonalen, chimärischen, humanisierten oder bispezifischen Antikörper oder ein epitopbindendes Fragment eines dieser Antikörper handelt.

6. Verwendung nach Anspruch 4 oder 5, wobei es sich bei der therapeutischen oder Arzneistoffgruppierung um ein Radionuklid oder ein Toxin handelt.

7. Verfahren zum Screening auf Brustkrebs, Darmkrebs und/oder Osteosarkom in einem Individuum und/oder zur Überwachung der Wirksamkeit einer Anti-Brustkrebs-, Anti-Darmkrebs- und/oder Anti-Osteosarkom-Therapie, wobei man in dem Verfahren in einer dem Individuum entnommenen biologischen Probe eine Nukleinsäure nachweist, die:

- a) die DNA-Sequenz der SEQ ID NO:2 oder deren RNA-Äquivalent umfaßt oder daraus besteht;
- b) eine Sequenz aufweist, die zu einer Sequenz aus a) komplementär ist; oder
- c) eine Sequenz aufweist, die für ein Polypeptid mit der in Anspruch 1 angegebenen Bedeutung codiert.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Spiegel der Nukleinsäure mit einem zuvor bestimmten Referenzbereich bzw. einer zuvor bestimmten Referenzkontrolle verglichen wird.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1

1 MATTVPDGCR NGLKSKYYRL CDKAEAWGIV LETVATAGVV TSVAFMLTLP ILVCKVQDSN
61 RRKMLPTQFL FLLGVLGIFG LTFAFIIGLD GSTGPTRFFL FGILFSICFS CLLAHAVSLT
121 KLVRGRKPLS LLVILGLAVG FSLVQDVIAI EYIVLTMNRT NVNVFSELSA PRNEDFVLL
181 LTYVLFLMAL TFLMSSFTFC GSFTGWKRHG AHIYLTMLLS IAIWVAWITL LMLPDFDRRW
241 DDTILSSALA ANGWFLLAY VSPEFWLLTK QRNPMDYPVE DAFCKPQLVK KSYGVENRAY
301 SQEEITQGFE ETGDTLYAPY STHFQLQNQP PQKEFSIPRA HAWSPYKDY EVKKEGS

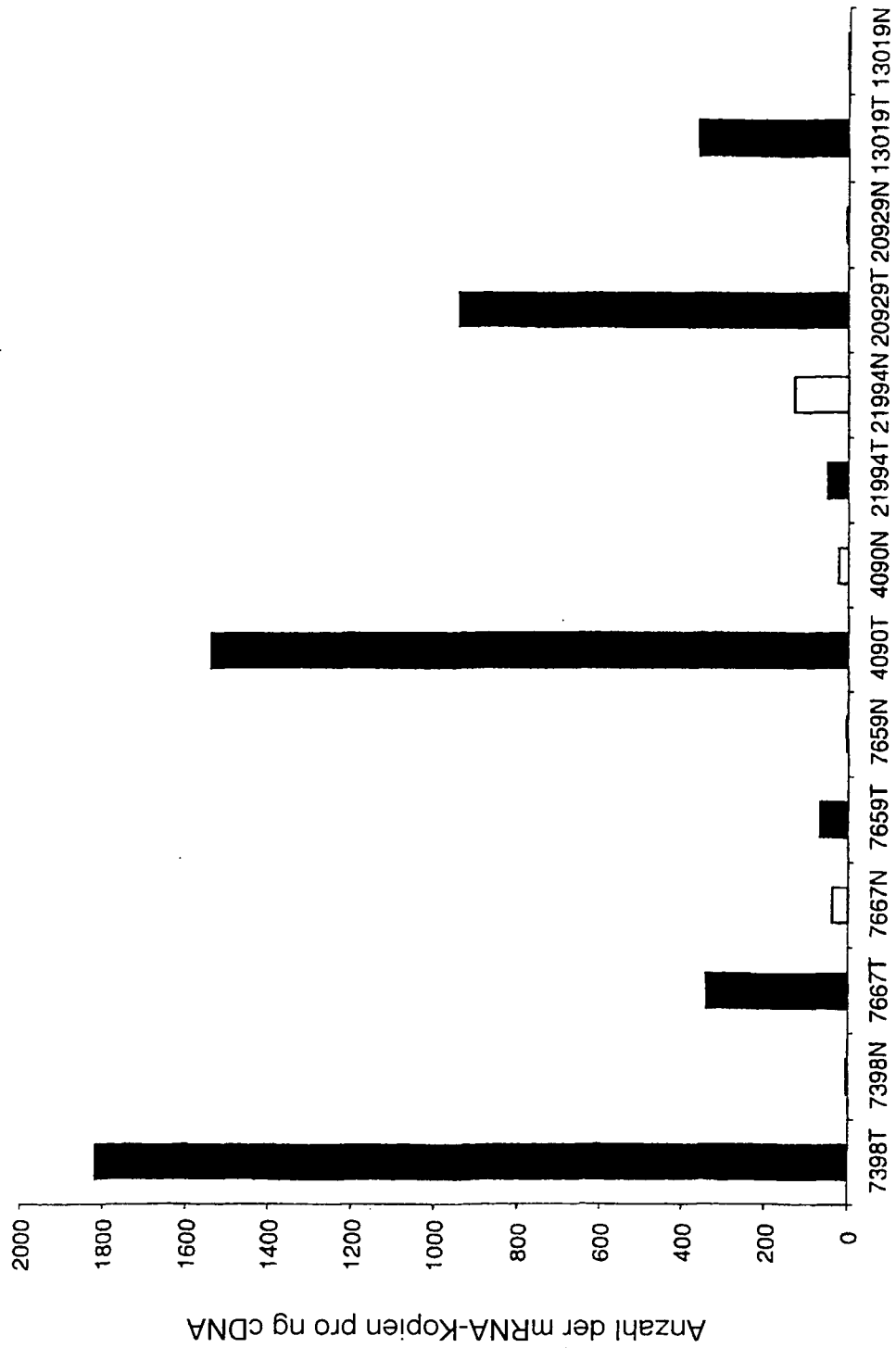
Figur 2

```

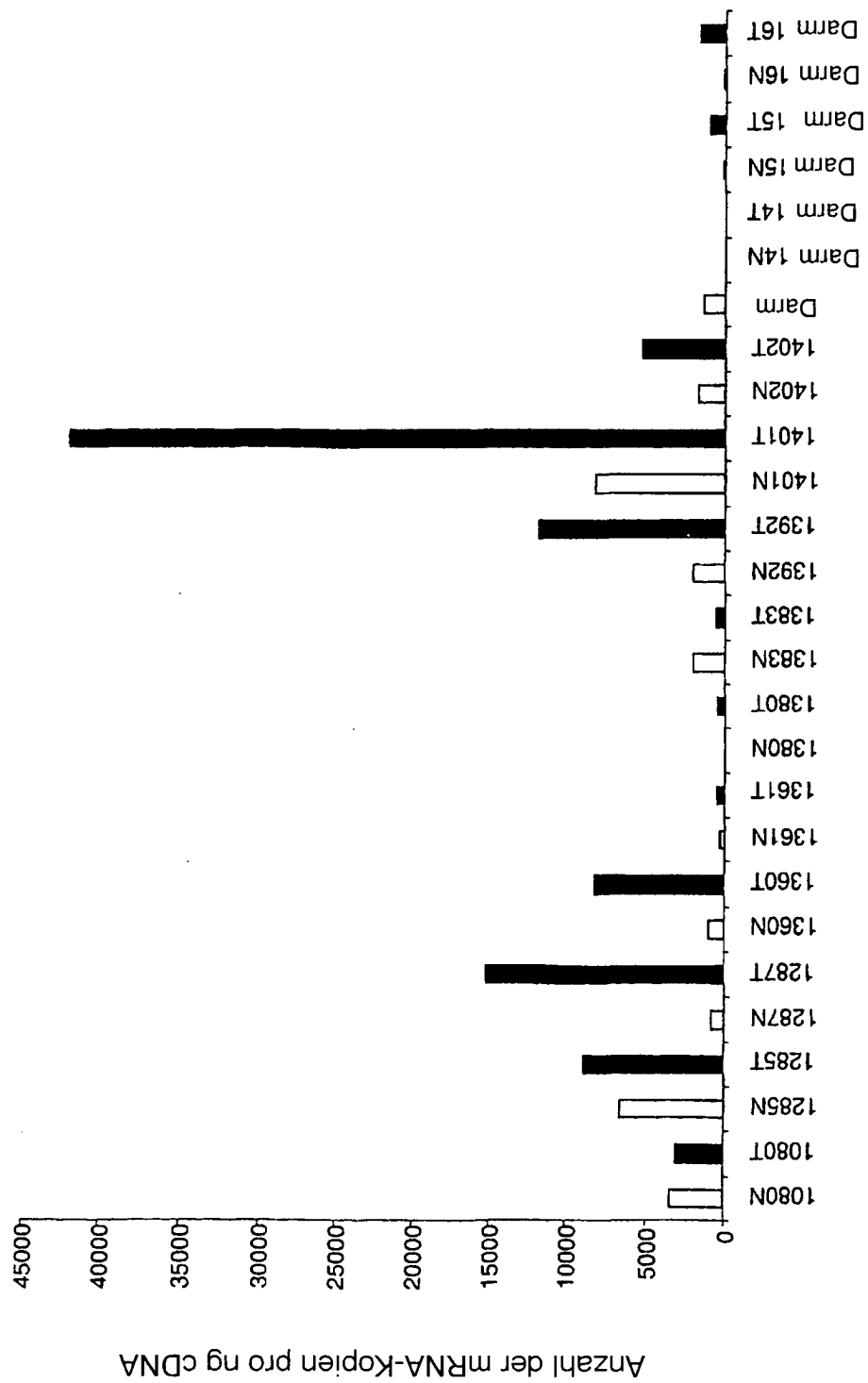
1 ccaaggtctc cccagcact gaggagctcg cctgctgccc tcttgcgcg cgggaagcagc
61 accaagttca cggccaacgc cttggcacta ggggtccagaa tggctacaac agtccctgat
121 gggttgcgca atggcctgaa atccaagtac tacagacttt gtgataaggc tgaagcttgg
181 ggcatcgtcc tagaaacggg ggcacagcc ggggttggtga cctcggtggc cttcatgctc
241 actctcccga tctcgtctg caaggtgcag gactccaaca ggcgaaaaat gctgcctact
301 cagtttctct tctcctggg tgtgttgggc atctttggcc tcaccttcgc cttcatcctc
361 ggactggacg ggagcacagg gccacacgc ttcttctct ttgggaccc cttttccatc
421 tgcttctcct gcctgctggc tcctgctgtc agtctgacca agctcgtccg ggggaggaag
481 cccctttccc tgttggtgat tctgggtctg gccgtgggct tcagcctagt ccaggatggt
541 atcgtctatt aatatattgt cctgaccatg aataggacca acgtcaatgt cttttctgag
601 ctttccgctc ctctcgtcaa tgaagacttt gtcctcctgc tcacctacgt cctcttcttg
661 atggcgctga ctttctcat gtctccttc accttctgtg gttccttcac gggctggaag
721 agacatgggg ccacatcta cctcacgatg ctctctcca ttgccatctg ggtggcctgg
781 atcacctgc tcctgcttcc tgactttgac cgcaggtggg atgacacccat cctcagctcc
841 gccttggttg ccaatggctg ggtgttcctg ttggcttatg ttagtcccga gttttggctg
901 ctcaaaaagc aacgaaaccc catggattat cctgttgagg atgcttctg taaacctcaa
961 ctctgaaga agagctatgg tgtggagaac agagcctact ctcaagagga aatcactcaa
1021 ggttttgaag agacagggga cacgtctat gccccctatt ccacacattt tcagctgcag
1081 aaccagcctc cccaaaagga atttccatc ccacggggcc acgcttggcc gagcccttac
1141 aaagactatg aagtaaagaa agagggcagc taactctgtc ctgaagagtg ggacaaatgc
1201 agccggggcg cagatctagc gggagctcaa agggatgtgg gcgaaatctt gagtcttctg
1261 agaaaactgt acaagacact acgggaacag tttgcctccc tcccagcctc aaccacaatt
1321 cttccatgct ggggctgatg tgggctagta agactccagt tcttagaggc gctgtagtat
1381 tttttttttt ttgtctcatc ctttggatac ttcttttaag tgggagtctc aggcaactca
1441 agtttagacc cttactcttt ttgtttgttt tttgaaacag gatcttgctc tgtcaccag
1501 gcttgagtgc agtggtgcga tcacagccca gtgcagcctc gaccacctgt gctcaagcaa
1561 tcctcccatc tccatctccc aaagtgtctg gatgacaggc gtgagccaca gctccagcc
1621 taggccctta atcttgctgt tattttccat ggactaaagg tctggtcatc tgagctcacg
1681 ctggctcaca cagctctagg ggctgctcc tctaactcac agtgggtttt gtgaggctct
1741 gtggcccaga gcagacctgc atatctgagc aaaaatagca aaagcctctc tcagccact
1801 ggctgaatc tacactggaa gccaacttgc tggcaccccc gctccccaac cttcttgcc
1861 tgggtaggag aggctaaaga tcaccctaaa ttactcatc tctctagtgc tgcctcatc
1921 tgggcctcag cagctcccca gcaccaatc acaggtcacc cctctcttct tgactgtcc
1981 ccaaacttgc tgtcaattcc gagatctaat cccccctac gctctgccag gaattcttcc
2041 agacctcact agcacaagcc cggttgctcc ttgtcaggag aattttaga tcattctcac
2101 ttcaaattcc tgggctgat acttctctca tcttgacccc caacctctgt aaatagattt
2161 accgcattta cggctgcatt ctgtaagtgg gcatggtctc ctaatggagg agtgttcatt
2221 gtataataag ttattcacct gagtatgcaa taaagatgtg gtggccactc tttcatggtg
2281 gtggcagcaa aaaaaaaaaa aa

```

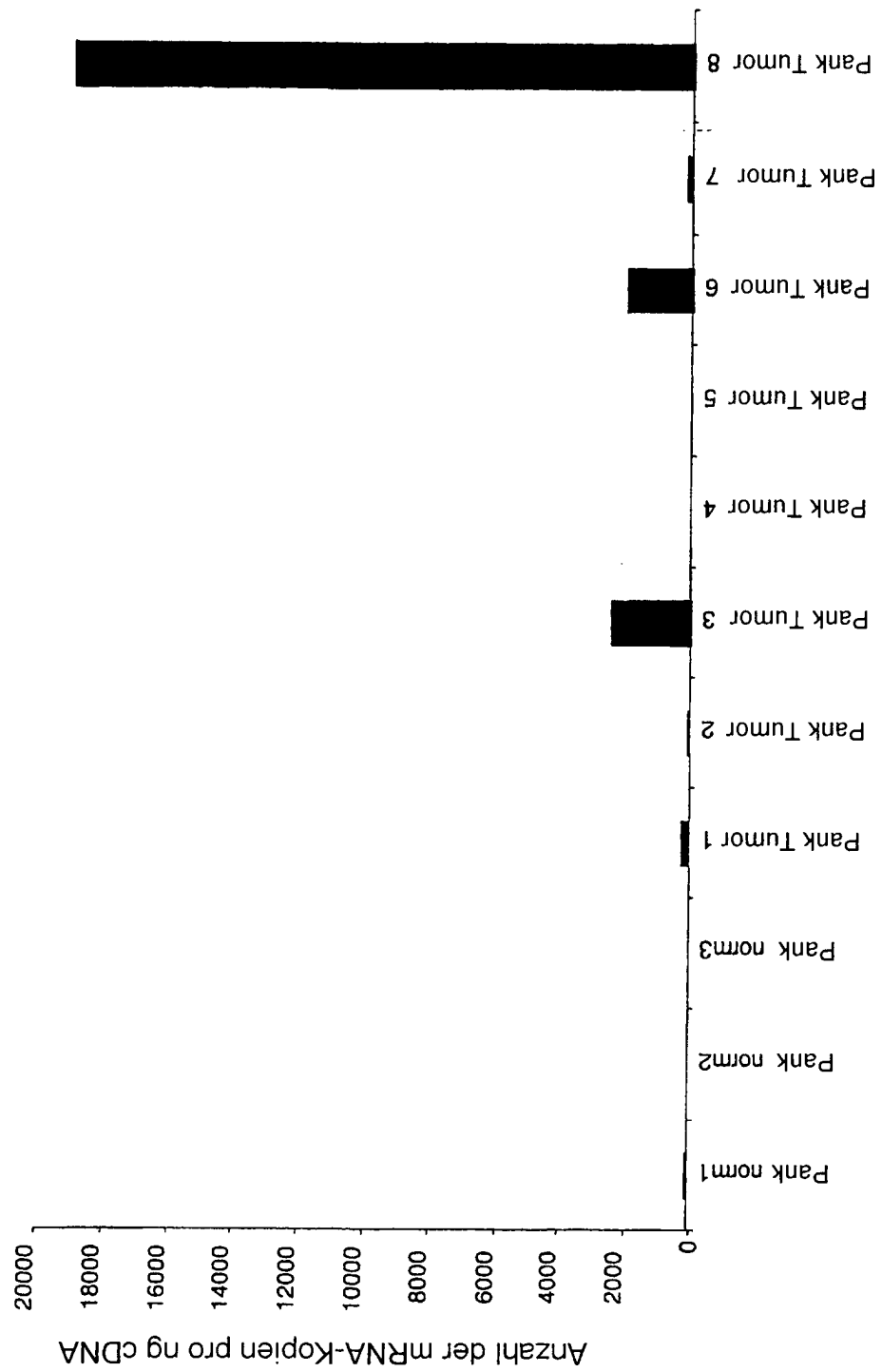
Figur 3



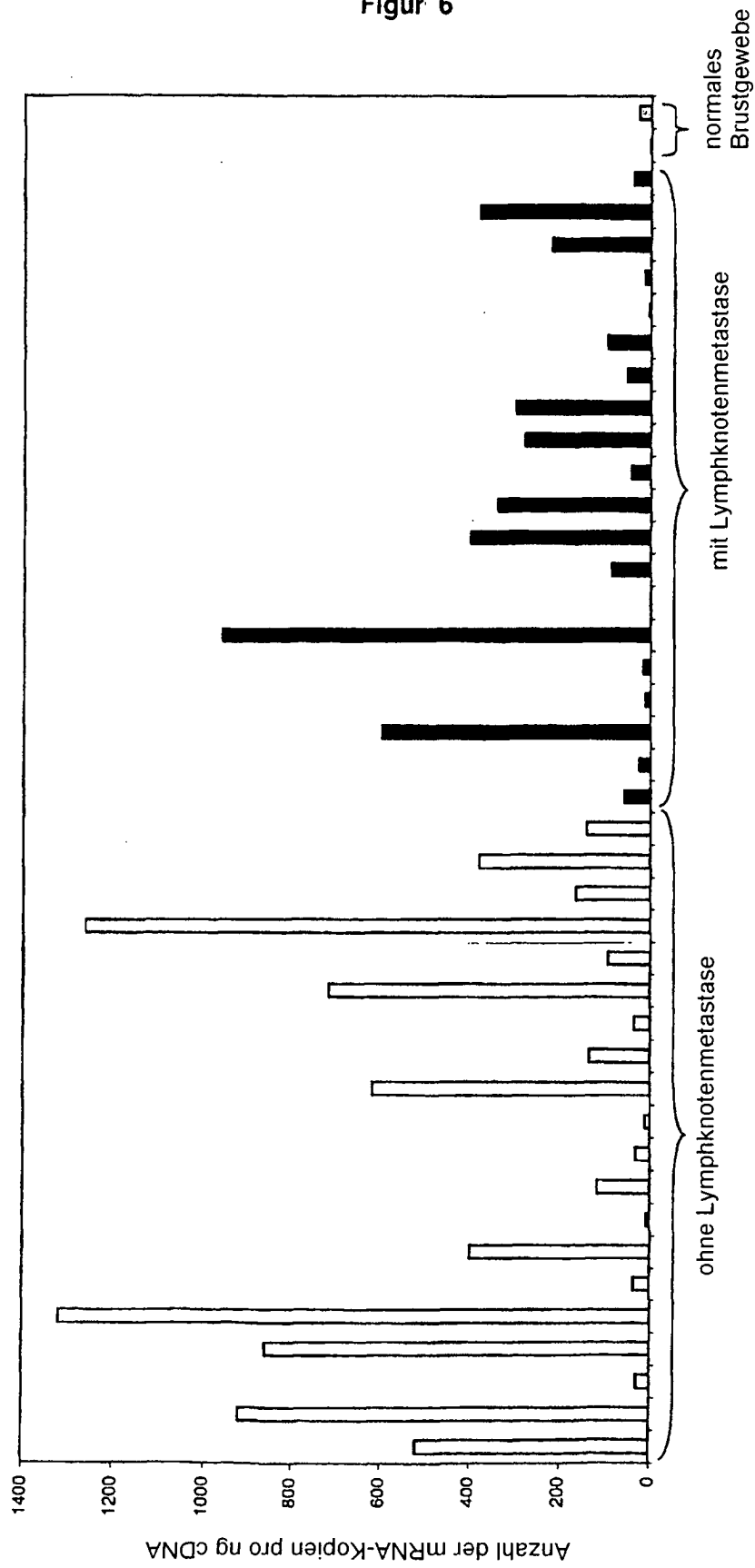
Figur 4



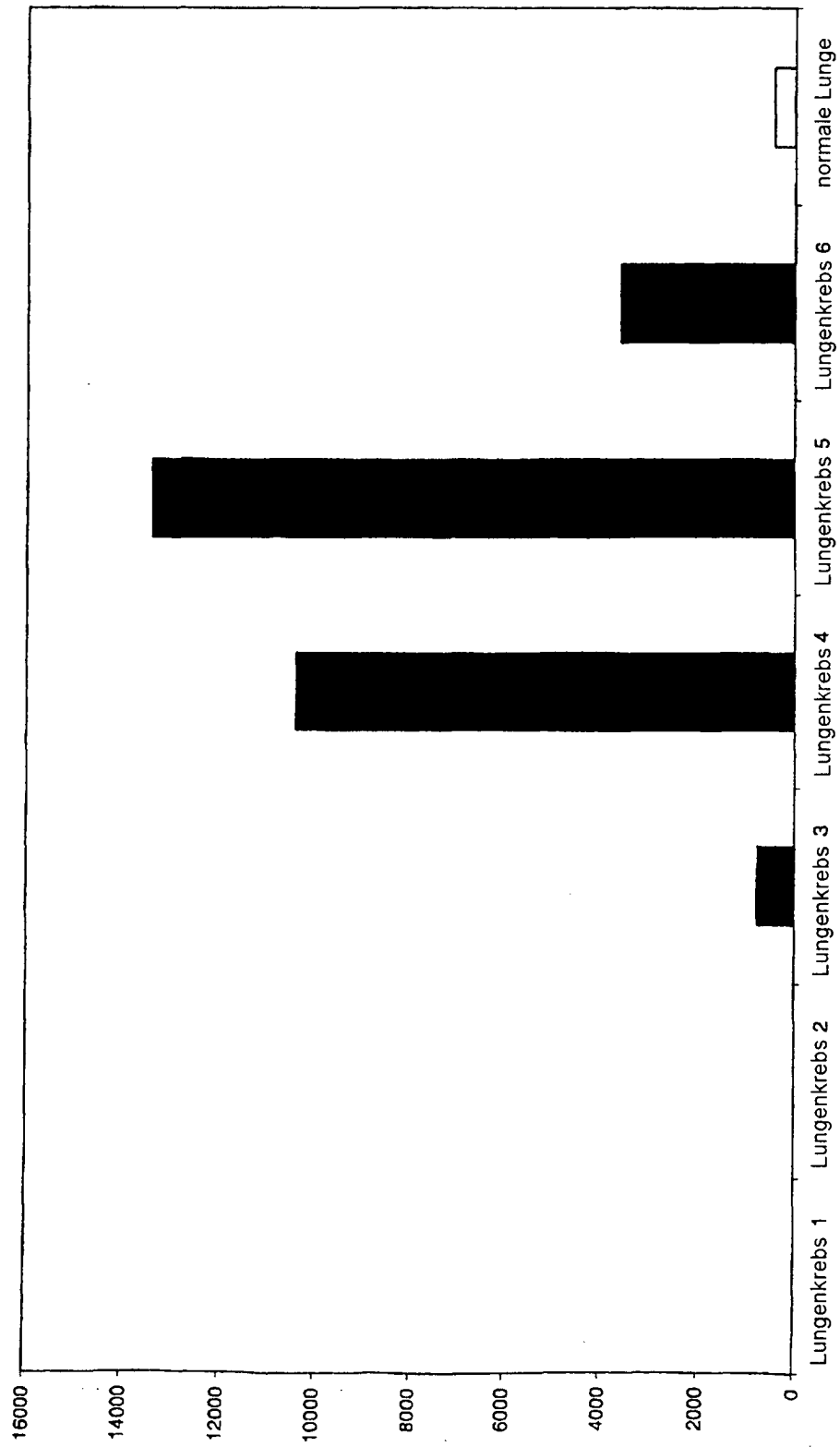
Figur 5



Figur 6



Figur 7



Figur 8

