



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 444**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01) **C07K 16/30** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **C12N 15/13** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) **C12N 5/20** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) **G01N 33/577** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03761281 .9**

96 Fecha de presentación : **19.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1565489**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54

Título: **Anticuerpos interiorizantes específicos para la diana de superficie celular RAAG10.**

30

Prioridad: **19.06.2002 US 390203 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

73

Titular/es: **RAVEN BIOTECHNOLOGIES, Inc.**
1 Corporate Drive
South San Francisco, California 94080, US

72

Inventor/es: **Mather, Jennie, P.;**
Li, Rong-Hao;
Pan, Zhuangyu y
Roberts, Penelope, E.

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 356 444 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN**CAMPO TÉCNICO**

5 La presente invención se refiere al campo de la biología y la inmunoterapia. Más concretamente, se refiere a una nueva enfermedad y al antígeno asociado al cáncer, RAAG10 (denominado de otro modo B7-H3L), y a una familia de anticuerpos monoclonales que se unen a RAAG10. La invención proporciona además el diagnóstico y/o tratamiento de varias enfermedades y cánceres humanos asociados a RAAG10 utilizando anticuerpos antifamilia RAAG10.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Además de sus utilidades conocidos en el diagnóstico, los anticuerpos han demostrado ser útiles como agentes terapéuticos. Véase, por ejemplo, el documento WO 01/14577 que da a conocer anticuerpos contra B7-4, y Chapoval *et al.*, Nature Immunology 2001; 2(3) 267-274 que da a conocer anticuerpos policlonales contra B7-H3 (forma 2Ig). Como otro ejemplo, la inmunoterapia, o la utilización de anticuerpos con fines terapéuticos se ha utilizado en los últimos años para tratar el cáncer. La inmunoterapia pasiva implica la utilización de anticuerpos monoclonales en tratamientos del cáncer. Véase, por ejemplo, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6ª edición (2001) Cap. 20 págs. 495-508. Estos anticuerpos pueden tener actividad terapéutica biológica inherente tanto por inhibición directa del crecimiento o la supervivencia de las células tumorales como por su capacidad para recuperar la actividad natural de destrucción celular del sistema inmunitario del cuerpo. Estos agentes pueden ser administrados solos o junto con agentes de radiación o quimioterapéuticos. Rituximab y Trastuzumab, aprobados para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano y el cáncer de mama, respectivamente, son dos ejemplos de dichos agentes terapéuticos. Alternativamente, los anticuerpos pueden utilizarse para preparar conjugados de anticuerpos en los que el anticuerpo se une a un agente tóxico y dirige el agente al tumor al unirse específicamente al tumor. Gemtuzumab ozogamicina es un ejemplo de un conjugado de anticuerpos aprobado utilizado para el tratamiento de la leucemia. Los anticuerpos monoclonales que se unen a las células cancerosas y tienen potenciales utilidades para el diagnóstico y la terapia se han dado a conocer en las publicaciones. Véase, por ejemplo, las siguientes solicitudes de patente que dan a conocer, entre otras cosas, algunos pesos moleculares de proteínas diana: patente US nº 6.054.561 (200 kD c-erbB-2 (HER2), y otros antígenos desconocidos de 40 a 200 KD de tamaño) y la patente US nº 5.656.444 (50 kD y 55 kD, proteína oncofetal). Los ejemplos de anticuerpos en ensayos clínicos y/o aprobados para el tratamiento de tumores sólidos son: Trastuzumab (antígeno: 180 kD, HER2/neu), Edrecolomab (antígeno: 40-50 kD, Ep-CAM), glóbulos de la grasa de la leche contra la grasa humana (HMFG1) (antígeno > 200 kD, HMW Mucina), Cetuximab (antígenos: 150 kD y 170 kD, receptor de EGF), Alemtuzumab (antígeno: 21-28 kD, CD52), y Rituximab (antígeno: 35 kD, CD20).

15 Las dianas de antígeno de trastuzumab (receptor HER-2), que se utiliza para tratar el cáncer de mama, y cetuximab (receptor de EGF), que se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de varios tipos de cáncer, están presentes en algún nivel detectable en un gran número de tejidos humanos adultos normales, incluyendo la piel, colon, pulmón, ovario, hígado y páncreas. El margen de seguridad en la utilización de estas terapias es, posiblemente, proporcionado por la diferencia en el nivel de expresión o en el acceso o de la actividad de los anticuerpos en estos sitios.

20 Otro tipo de inmunoterapia es la inmunoterapia activa, o vacunación, con un antígeno presente en un cáncer o cánceres específicos o un montaje de ADN que dirige la expresión del antígeno, que provoca entonces la respuesta inmunitaria en el sujeto, es decir, inducir al sujeto a producir anticuerpos activamente contra su propio cáncer. La inmunización activa no se ha utilizado tan a menudo como la inmunoterapia pasiva o las nmunotoxinas.

25 Se han sugerido varios modelos de la enfermedad (incluyendo el cáncer). Las teorías comprenden desde la etiología por un episodio infeccioso/transformador concreto a la evolución de un tipo de tejido cada vez más "enfermizo" o "canceroso" que conduce en última instancia a uno con capacidad totalmente patógena o maligna. Algunos sostienen que con el cáncer, por ejemplo, un único episodio de mutación es suficiente para producir cáncer, mientras que otros sostienen que las alteraciones posteriores son también necesarias. Otros han sugerido que el aumento de carga de mutación y el grado tumoral son necesarios tanto para el inicio como para la evolución de la neoplasia a través de una continua sucesión de episodios de mutación-selección a nivel celular. Algunas dianas del cáncer se encuentran solamente en los tejidos tumorales, mientras que otras están presentes en tejidos normales y están aumentadas y/o sobreexpresadas en los tejidos tumorales. En tales situaciones, algunos investigadores han sugerido que la sobreexpresión está vinculada a la adquisición del cáncer, mientras que otros sugieren que la sobreexpresión no es más que un indicador de una tendencia a lo largo de una ruta a una enfermedad en aumento.

30 Resultan necesarias nuevas dianas en la superficie de las células enfermas y/o cancerosas que se pueden utilizar para tratar dichas enfermedades y/o tipos de cáncer con anticuerpos y otros agentes que reconocen específicamente las dianas de la superficie celular. Resultan todavía más necesarios, sobre la base de los descubrimientos dados a conocer en la presente memoria, nuevos anticuerpos y otros agentes que reconocen específicamente las dianas en la superficie de las células que pueden modular, ya sea por disminución o aumento, las actividades de RAAG10 que favorecen la enfermedad.

Como se describe con mayor detalle a continuación, se ha descubierto un nuevo antígeno, al que se hace referencia en la presente memoria como RAAG10 y a veces B7-H3L, identificado como la diana de antígeno de los nuevos anticuerpos proporcionados en la presente memoria. Se conocen polipéptidos similares. Véase, por ejemplo, Sun *et al.*, *J. Immunol.* 2002, 168: 6294-6297, que describe la identificación de un homólogo B7-H3 de ratón, y caracteriza el gen B7-H3 humano como se muestra para mediar la proliferación de linfocitos T y la producción de IFN-gamma.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención describe anticuerpos monoclonales que se unen a RAAG10 (B7-H3L), que se expresa en varios cánceres humanos. En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de inmunoglobulina sustancialmente purificado o un fragmento del mismo que se une al antígeno, que se une a un fragmento de B7-H3L que está expuesto en la superficie de una célula viva *in vitro* o *in vivo*, y puede interiorizarse para administrar un agente terapéutico o un marcador detectable en una célula cancerosa que expresa dicha fracción expuesta de B7-H3L. La invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina o el fragmento que se une al antígeno de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización, la célula cancerosa es una célula cancerosa de tumor de las glándulas suprarrenales, de cáncer asociado al SIDA, de sarcoma alveolar de partes blandas, de tumor astrocítico, de cáncer de vejiga, de cáncer de huesos, de cáncer cerebral y médula espinal, de tumor cerebral metastásico, de cáncer de mama, de tumor del cuerpo carotídeo, de cáncer de cuello de útero, de condrosarcoma, de cordoma, de carcinoma renal de células cromóforas, de carcinoma de células claras, de cáncer de colon, de cáncer colorrectal, de histiocitoma fibroso cutáneo benigno, de tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, de endimoma, de tumor de Ewing, de condrosarcoma mixoide extraesquelético, de fibrogénesis imperfecta ossium, de displasia fibrosa del hueso, de vesícula biliar y de cáncer del conducto biliar, de enfermedad de gestación trofoblástica, de tumores de células germinales, de cáncer de cabeza y cuello, de insulinomas, de Sarcoma de Kaposi, de cáncer renal, de leucemia, de lipoma o tumor benigno lipomatoso, de liposarcoma o tumor maligno lipomatoso, de cáncer de hígado, de linfoma, de cáncer pulmonar, de meduloblastoma, de melanoma, de meningioma, de neoplasia endocrina múltiple, de mieloma múltiple, de síndrome mielodisplásico, de neuroblastoma, de tumor neuroendocrino, de cáncer de ovario, de cáncer pancreático, de carcinoma papilar de tiroides, de tumor paratiroideo, de cáncer pediátrico, de tumor de la vaina del nervio periférico, de feocromocitoma, de tumor de la hipófisis, de cáncer de próstata, de melanoma uveal posterior, del trastorno hematológico raro, de cáncer renal metastásico, de tumor rabdoide, de rhabdomyosarcoma, de sarcoma, de cáncer de piel, de sarcoma de tejido blando, de cáncer epidermoide, de cáncer de estómago, de sarcoma sinovial, de cáncer testicular, de carcinoma tímico, de timoma, de cáncer metastásico del tiroides y de cáncer de útero.

La invención proporciona asimismo una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica el polipéptido de inmunoglobina o un fragmento de fijación al antígeno del mismo expresado por una estirpe celular, en el que la estirpe celular es un hibridoma seleccionado de entre ATCC nº PTA-4217, ATCC nº PTA-4218, ATCC nº PTA-4244 y ATCC nº PTA-4245. En una forma de realización el ácido nucleico de la invención está operativamente unido a un activador. Preferentemente el activador y el ácido nucleico están contenidos en un vector de expresión. La invención también proporciona una estirpe celular aislada seleccionada de entre ATCC nº PTA-4217, ATCC nº PTA-4218, ATCC nº PTA-4244 y ATCC nº PTA-4245 o la descendencia de las mismas.

La invención proporciona un procedimiento para producir un polipéptido de inmunoglobulina sustancialmente purificado o un fragmento del mismo que se une al antígeno, que comprende:

- (a) cultivar una estirpe celular transformada con el ácido nucleico de cualquiera de la invención en condiciones en las que se expresa el polipéptido de inmunoglobulina o el fragmento que se une al antígeno; y
- (b) recolectar el polipéptido o el fragmento de inmunoglobulina expresado.

La invención proporciona asimismo una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina purificada o del fragmento que se une al antígeno de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal o de un fragmento del mismo que se une al antígeno, que se une a un fragmento de B7-H3L que está expuesto en la superficie de una célula viva *in vitro* o *in vivo*, y puede interiorizarse para administrar un agente terapéutico o un marcador detectable a una célula cancerosa que expresa dicha fracción expuesta de B7-H3L; junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización la composición comprende un resto terapéutico adicional.

La invención proporciona además un procedimiento para administrar un agente quimioterapéutico a una célula cancerosa *in vitro* que comprende administrar a dichas células una composición que comprende un

anticuerpo anti-B7-H3L asociado al agente quimioterapéutico, en el que dicha célula cancerosa expresa B7-H3L, y una parte de dicho B7-H3L está expuesta sobre la superficie de dicha célula; dicho anticuerpo anti-BH-3L se une a dicha parte de B7-H3L que está expuesta sobre la superficie de dicha célula y puede interiorizarse para administrar dicho agente quimioterapéutico a dicha célula cancerosa; y dicha célula cancerosa es una de cualquiera de los cánceres o tumores mencionados anteriormente.

La invención proporciona además un anticuerpo anti-B7-H3L asociado al agente quimioterapéutico para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células cancerosas *in vitro* o en un sujeto, en el que dicha célula cancerosa expresa B7-H3L, y una parte de dicho B7-H3L está expuesta sobre la superficie de dicha célula; dicho anticuerpo anti-BH-3L se une a dicha parte de B7-H3L que está expuesta sobre la superficie de dicha célula y tiene capacidad para administrar dicho agente quimioterapéutico a dicha célula cancerosa; y dicha célula cancerosa es una de cualquiera de los cánceres o tumores mencionados anteriormente.

La invención proporciona además un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una célula un sujeto que comprende poner en contacto las células del sujeto con un anticuerpo anti-B7-H3L *in vitro* y detectar un complejo de B7-H3L de las células y el anticuerpo, si existe, en el que dicha célula cancerosa expresa B7-H3L, y una parte de dicho B7-H3L está expuesta sobre la superficie de dicha célula; dicho anticuerpo anti-BH-3L se une a dicha parte de B7-H3L que está expuesta sobre la superficie de dicha célula y tiene capacidad para suministrar dicho agente quimioterapéutico a dicha célula cancerosa; y dicha célula cancerosa es una de cualquiera de los cánceres o tumores mencionados anteriormente.

En otro aspecto, la invención describe un anticuerpo monoclonal anti-RAAG10 que es producido por cualquiera de las estirpes celulares del hospedador depositadas el 9 de abril de 2002 y el 23 de abril de 2002 en el American Type Culture Collection con las denominaciones de depósito de patente PTA-4217, PTA-4218, PTA-4244 y PTA-4245.

En otro aspecto todavía, la invención describe un procedimiento de generación del anticuerpo monoclonal anti-RAAG10 reactivo con las células enfermas y/o cancerosas que comprende las etapas siguientes:

- (a) inmunización de un mamífero hospedador con un inmunógeno; (b) extracción de los linfocitos del mamífero; (c) fusión de los linfocitos B con una estirpe celular de mieloma para producir un hibridoma; (d) el cultivo del hibridoma de (c) para producir anticuerpos monoclonales; y (e) detección de los anticuerpos para seleccionar sólo los anticuerpos que se unen a las células enfermas y/o cancerosas o a estirpes celulares, pero no se unen a células no cancerosas o normales o a estirpes celulares, o se unen a las células normales en un nivel inferior o de una manera diferente.

En la presente memoria se describe un procedimiento para generar un anticuerpo anti-familia RAAG10 que comprende el cultivo de una célula hospedadora que codifica dicho anticuerpo o su descendencia en condiciones que permiten la producción del anticuerpo, y purificar el anticuerpo anti-RAAG10.

En la presente memoria se describe un procedimiento de generación de cualquiera de los anticuerpos (o polipéptidos) descritos en la presente memoria expresando uno o más polinucleótidos que codifican los anticuerpos (que pueden ser expresados por separado como una sola cadena ligera o pesada, o tanto una cadena ligera como una pesada se expresan en un vector) en una célula adecuada, generalmente seguida de la recuperación y/o aislamiento del anticuerpo o los polipéptidos de interés.

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti-RAAG10 o un polipéptido (que puede o no ser un anticuerpo) que inhibe competitivamente la unión preferida de un anticuerpo anti-RAAG10 a RAAG10. En algunas formas de realización, la invención es un anticuerpo o un polipéptido (que puede o no puede ser un anticuerpo) que se une preferentemente a los mismos o diferentes epítopos en RAAG10 como otros anticuerpos anti-RAAG10. En la presente memoria se describe una composición que comprende RAAG10 unido por un anticuerpo específico para un epítipo de RAAG10. En una realización, el anticuerpo es anti-RAAG10. En otras formas de realización, se administran dos o más anticuerpos anti-RAAG10, cartografiando dichos anticuerpos para dos o más epítopos diferentes de RAAG10. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-RAAG10 está ligado a un agente terapéutico o un marcador detectable.

En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende un fragmento o una región de un anticuerpo anti-RAAG10. En una forma de realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo. En otra forma de realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo. En otra forma de realización aún, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o de una cadena pesada del anticuerpo. En otra forma de realización aún, el fragmento contiene una o más regiones determinantes de complementariedad (RDC) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo.

En la presente memoria se describen polipéptidos (que pueden o no ser anticuerpos) que comprenden alguno de los siguientes: a) uno o más CDR (o fragmentos de los mismos) de la cadena ligera o pesada; b) tres RDC de la cadena ligera; c) tres RDC de la cadena pesada; d) tres RDC de la cadena ligera y tres RDC de la

cadena pesada; e) la región variable de la cadena ligera; f) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-RAAG10.

5 En la presente memoria se describe un anticuerpo humanizado. En algunas formas de realización, el anticuerpo humanizado comprende uno o más RDC de un anticuerpo anti-RAAG10 no humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo humanizado se une al mismo o diferente(s) epítipo(s) como otros anticuerpos anti-RAAG10. Generalmente, un anticuerpo humanizado de la invención comprende uno o más (uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o fragmentos de los mismos) RDC que son los mismos y/o derivados de los RDC(s) del anticuerpo anti-RAAG10 original no humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo humano se une al mismo o
10 diferente(s) epítipo(s) como otros anticuerpos anti-RAAG10. El anticuerpo puede ser un anticuerpo híbrido que comprende las regiones variables procedentes de las regiones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo anti-RAAG10 no humano y las regiones constantes procedentes de las regiones constantes de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano.

15 En la presente memoria se describe un polinucleótido aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos LUCA1, BLA8, PA20, o SKIN2 que es producido por una célula hospedadora con un número de depósito de la ATCC nº PTA-4217, PTA-4218, PTA-4244, o PTA-4245, respectivamente, o de los descendientes de los mismos. Se describen también polipéptidos de anticuerpo que tienen actividades de unión o biológicas inherentes de cualquiera de los anticuerpos especificados anteriormente. En otro aspecto, se describen en la presente memoria se describen polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo cualquiera de los fragmentos de anticuerpo), así como algunos otros polipéptidos.

20 En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los polipéptidos (incluyendo cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria) o polinucleótidos descritos en la presente memoria, tales como composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-RAAG10 unido a un agente quimioterapéutico, un anticuerpo que comprende un fragmento de un anticuerpo anti-RAAG10, un anticuerpo humanizado de un anticuerpo anti-RAAG10 no humano, un anticuerpo híbrido que comprende las regiones variables derivadas de las regiones variables de un anticuerpo anti-RAAG10 no humanos y las regiones constantes procedentes de las regiones constantes de un anticuerpo humano, o un anticuerpo humano con una o
25 más propiedades de un anticuerpo anti-RAAG10 no humano, o cualquiera de los anticuerpos anti-RAAG10 descritos en la presente memoria unidos a un agente quimioterapéutico (tal como un resto radiactivo) y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 En la presente memoria se describe una composición que comprende un anticuerpo anti-RAAG10 unido a RAAG10 presente en una célula enferma o cancerosa. En las formas de realización preferidas, la célula cancerosa se selecciona de entre el grupo constituido por células cancerosas de ovario, pulmón, próstata, pancreática, colon y de mama. En algunas formas de realización, la célula cancerosa está aislada. En algunas formas de realización, la célula cancerosa se encuentra en una muestra biológica. Generalmente, la muestra biológica es de un sujeto, tal como un ser humano.

35 En la presente memoria se describe un procedimiento de diagnóstico de la enfermedad en una persona mediante la detección de RAAG10 en las células de la persona, en particular las enfermedades o trastornos asociados a respuestas inflamatorias o autoinmunitarias en las personas. Se describen también, procedimientos para modular las respuestas inflamatorias o autoinmunitarias en las personas. Las enfermedades y dolencias resultantes de la inflamación y de los trastornos autoinmunitarios que pueden ser objeto de tratamiento con las composiciones y métodos de la invención comprenden de manera ilustrativa y no limitativa, la esclerosis múltiple, la meningitis, encefalitis, ictus, otros traumatismos cerebrales, enfermedad intestinal inflamatoria incluyendo la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, miastenia grave, lupus, artritis reumatoidea, el asma, la diabetes juvenil aguda, demencia por SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia de miocardio y la lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos.

40 No obstante otras indicaciones para la utilización terapéutica de los anticuerpos y otros agentes terapéuticos descritos en la presente memoria incluyen la administración a las personas en riesgo del órgano o de rechazo del injerto. En los últimos años se ha producido una considerable mejora en la eficiencia de las técnicas quirúrgicas para el trasplante de tejidos y órganos como la piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Tal vez el problema principal pendiente es la falta de agentes satisfactorios para inducir inmunotolerancia en el receptor al alotrasplante u órgano trasplantado. Cuando células u órganos alogénicos son trasplantados en un hospedador (es decir, el donante y el receptor son personas diferentes de la misma especie), el sistema inmunitario del hospedador es probable que monte una respuesta inmunitaria para antígenos extraños en el trasplante (enfermedad de hospedador contra injerto) que conduce a la destrucción del tejido trasplantado.

45 En la presente memoria se describe un procedimiento para diagnosticar si una persona tiene cáncer, que comprende determinar si existe expresión de RAAG10 en las células seleccionadas de la persona, en la que la expresión de RAAG10 en dichas células es indicativo de dicho cáncer. En algunas formas de realización, la expresión de RAAG10 se determina utilizando un anticuerpo anti-RAAG10. En algunas formas de realización, el método consiste en detectar el nivel de expresión RAAG10 de las células. El término "detección" como se utiliza en
50
55
60
65

la presente memoria incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control.

5 En la presente memoria se describe un procedimiento de diagnóstico de cáncer en un sujeto mediante la detección de RAAG10 sobre o liberada por las células del sujeto, en donde el cáncer se selecciona de entre el grupo, que comprende de manera no limitativa tumores de la glándula suprarrenal, cánceres asociados al SIDA, sarcoma alveolar de partes blandas, tumores astrocíticos, cáncer de vejiga (carcinoma epidermoide y el carcinoma de células de transición), cáncer de hueso (adamantinoma, quistes aneurismáticos del hueso, osteocondroma, osteosarcoma), cánceres de cerebro y de médula espinal, tumores cerebrales metastásicos, cáncer de mama, tumores del cuerpo carotídeo, cáncer de cuello de útero, condrosarcoma, cordoma, carcinoma renal de células cromóforas, carcinoma de células claras, cáncer de colon, cáncer colorrectal, histiocitoma cutáneo fibroso benigno, tumores desmoplásicos de células pequeñas y redondas, ependimomas, tumores de Ewing, condrosarcoma mixoide extraesquelético, fibrogénesis imperfecta ossium, displasia fibrosa del hueso, cánceres de vesícula biliar y del conducto biliar, enfermedad de gestación trofoblástica, tumores de células germinales, cáncer de cabeza y cuello, insulinosomas, sarcoma de Kaposi, cáncer renal (nefroblastoma, carcinoma papilar de células renales), leucemias, lipomas o tumores lipomatosos benignos, liposarcoma o tumores lipomatosos malignos, cáncer de hígado (hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular), linfomas, cáncer pulmonar, meduloblastoma, melanoma, meningiomas, neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinomas papilares de tiroides, tumores paratiroideos, cánceres pediátricos, tumores de la vaina de nervio periférico, feocromocitoma, tumores de la hipófisis, cáncer de próstata, melanoma uveal posterior, trastornos hematológicos raros, cáncer renal metastásico, tumor rabdoide, rhabdomyosarcoma, sarcomas, cáncer de piel, sarcomas de tejidos blandos, cáncer epidermoide, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, carcinoma tímico, timoma, cáncer de tiroides metastásico, y cáncer de útero (carcinoma de cuello de útero, carcinoma de endometrio, y leiomioma).

10
15
20
25 En la presente memoria se describe un procedimiento para ayudar al diagnóstico de cáncer (por ejemplo, pero sin limitarse al cáncer de ovario, pulmón, próstata, páncreas, colon o mama) en un sujeto que comprende la determinación de la expresión de RAAG10 en un muestra biológica del sujeto. En algunas formas de realización, la expresión de RAAG10 se determina utilizando un anticuerpo anti-RAAG10. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-RAAG10 es un miembro de la familia expresamente mencionado en la presente memoria. En algunas formas de realización, el procedimiento consiste en detectar el nivel de expresión RAAG10 de las células.

30
35
40
45
50
55 En la presente memoria se describe un procedimiento de tratamiento del cáncer mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a RAAG10 suficiente para reducir el crecimiento de células cancerosas. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-RAAG10. En determinadas formas de realización, las células cancerosas se seleccionan de entre el grupo que comprende de manera no limitativa tumores de la glándula suprarrenal, a cánceres asociados al SIDA, al sarcoma alveolar de partes blandas, tumores astrocíticos, cáncer de vejiga (carcinoma epidermoide y al carcinoma de células de transición), al cáncer de hueso (adamantinoma, quistes aneurismáticos de huesos, osteocondroma, osteosarcoma), a cánceres de cerebro y de médula espinal, tumores cerebrales metastásicos, cáncer de mama, tumores del cuerpo carotídeo, cáncer de cuello de útero, condrosarcoma, cordoma, carcinoma renal de células cromóforas, carcinoma de células claras, el cáncer de colon, cáncer colorrectal, histiocitomas fibrosos cutáneos benignos, tumores desmoplásicos de células pequeñas y redondas, ependimomas, tumores de Ewing, condrosarcoma mixoide extraesquelético, fibrogénesis imperfecta ossium, displasia fibrosa del hueso, cánceres de vesícula biliar y del conducto biliar, enfermedad de gestación trofoblástica, los tumores de células germinales, cánceres de cabeza y de cuello, insulinosomas, Sarcoma de Kaposi, cáncer renal (nefroblastoma, carcinoma papilar de células renales), leucemias, lipomas o tumores lipomatosos benignos, liposarcoma/tumores lipomatosos malignos, cáncer de hígado (hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular), linfomas, cáncer pulmonar, meduloblastoma, melanoma, meningiomas, neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma papilar de tiroides, tumores paratiroideos, cánceres pediátricos, tumores de vaina de nervio periférico, feocromocitoma, tumores de la hipófisis, cáncer de próstata, el melanoma uveal posterior, trastornos hematológicos poco frecuentes, cáncer renal metastásico, tumor rabdoide, rhabdomyosarcoma, sarcomas, cáncer de piel, sarcomas de tejidos blandos, cáncer epidermoide, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, carcinoma tímico, timoma, cáncer metastásico de tiroides, y cáncer de útero (carcinoma de cuello de útero, carcinoma de endometrio, y leiomioma). En determinadas formas de realización preferidas, las células cancerosas se seleccionan de entre el grupo de tumores sólidos, incluyendo pero sin limitarse al cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer pulmonar, sarcoma, cáncer renal metastásico, cáncer tiroideo metastásico y el carcinoma de células claras.

60
65 En la presente memoria se describe un procedimiento para retrasar el desarrollo de metástasis en una persona que padece cáncer que comprende administrar una cantidad eficaz de por lo menos uno de una familia de anticuerpos que se unen específicamente a RAAG10. En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-RAAG10. En otro aspecto, la invención es un procedimiento para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células cancerosas *in vitro* o en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo anti-RAAG10 asociado a (incluyendo unido a) un agente quimioterapéutico al cultivo celular o la muestra, o al sujeto.

En la presente memoria se describe un procedimiento de administrar un agente terapéutico a una célula cancerosa en un sujeto mediante la administración al sujeto una cantidad eficaz de por lo menos un miembro de una familia de anticuerpos, que se unen específicamente a RAAG10. En otras formas de realización, un anticuerpo anti-RAAG10 se administra a un sujeto en combinación con (incluyendo unido a) otro agente terapéutico.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-RAAG10 es un anticuerpo humanizado derivado de un miembro de la familia de anticuerpos indicado en la presente memoria (en general, pero no necesariamente, que comprende una o más RDC parcial o intacta del anticuerpo). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-RAAG10 es un anticuerpo humano con una o más propiedades del miembro de la familia de anticuerpos indicado. En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico (tal como una toxina o una molécula radiactiva) se administra (se interioriza) a las células cancerosas. En algunas formas de realización, el agente es saporina.

En la presente memoria se describe un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo anti-RAAG10 asociados a (incluyendo unido a) un agente quimioterapéutico para el sujeto.

En la presente memoria se describen procedimientos para modular, ya sea aumentando o reduciendo, la asociación de RAAG10 con un acompañante de señalización citoplásmica. La asociación de RAAG10 con un acompañante de señalización citoplásmica puede resultar afectada al poner en contacto una molécula RAAG10 que se presenta en una superficie celular, con un agente que modula la unión del acompañante de señalización a RAAG10. Los agentes que bloquean o reducen la asociación de RAAG10 con su acompañante de unión y/o señalización pueden utilizarse para modular los procesos biológicos y patológicos que están implicados en la inflamación mediada por RAAG10 o las respuestas inmunitarias. Los procesos patológicos que implican esta acción incluyen el crecimiento celular asociado al tumor.

Puede probarse la capacidad de los agentes para bloquear, reducir, mejorar o si no modular la asociación de RAAG10 con un acompañante de unión, tal como un anticuerpo anti-RAAG10. En concreto, puede probarse la capacidad de un agente para modular dicha interacción incubando un péptido que comprende el punto de interacción de RAAG10 (por lo general en su configuración natural, tal como existe en las células vivas íntegras) con un acompañante de unión y un agente de ensayo, y determinar si el agente de ensayo reduce o aumenta la unión del acompañante de unión al péptido RAAG10. Agonistas, antagonistas y otros moduladores están expresamente previstos.

Otros aspectos descritos en la presente memoria se refieren al nuevo antígeno identificados y mencionado en la presente memoria como RAAG10. Este antígeno es adecuado para su utilización como inmunógeno y para varias investigaciones, diagnósticos y fines terapéuticos.

En la presente memoria se describe además un procedimiento para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad en un sujeto que comprende las etapas de (i) analizar la presencia de RAAG10 en una muestra de sangre o de tejidos extraídos de un sujeto, (ii) detectar si dicha muestra tiene una cantidad mayor de un marcador RAAG10 con relación a una muestra de sangre o tejido normal (no enfermos) y (iii) correlacionar una cantidad mayor de dicho marcador con un diagnóstico positivo o correlacionar la ausencia de una mayor cantidad de dicho marcador con un diagnóstico negativo de la enfermedad. En determinadas formas de realización, el marcador se detecta utilizando un anticuerpo anti-RAAG10. En determinadas formas de realización, el procedimiento se efectúa por una técnica seleccionada de entre el grupo constituido por detección por la imagen con radionúclidos, citometría de flujo e inmunohistoquímica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 representa los resultados de los estudios de interiorización del anticuerpo con el anticuerpo LUCA1. La divergencia de las líneas a las concentraciones mayores de MabZAP indica que se interioriza LUCA1.

La figura 2 representa una representación esquemática de B7H3 y sus mutantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona un nuevo antígeno, RAAG10 (B7-H3L), que se expresa en las células cancerosas de varios tipos de tejidos, que incluyendo pero no se limitan a, cánceres de mama, colon, pulmón y próstata. Además, la invención proporciona anticuerpos monoclonales y polipéptidos que se unen a RAAG10 y procedimientos de preparación y utilización de estos anticuerpos y polipéptidos para diagnosticar y tratar varios cánceres humanos asociados con la expresión y/o sobreexpresión de RAAG10.

I. Técnicas generales

La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas las técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) Cold Spring Harbor Press, *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed, 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (Ri Freshney, ed, 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press, *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, editores, 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds); *Gene Transfer Vectors fórmula Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, editores, 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds, 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

II. Definiciones

"RAAG10" y "B7-H3L" se refieren a ese nuevo polipéptido antígeno con un peso molecular glicosilado de aproximadamente 100 kD, contra el que se dirigen los anticuerpos de la presente invención. Como se describe con mayor detalle en la presente memoria, este antígeno presenta más de un epítipo diferente. Algunas de las formas de realización de anticuerpos preferidas de la presente invención se dirigen contra uno de los tres epítipos específicos del antígeno RAAG10. Se cree actualmente que RAAG10 se sobreexpresa en las células de algunos tipos de cáncer en comparación con sus contrapartidas de tejido normal.

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a una diana, tales como hidratos de carbono, polinucleótidos, lípidos, polipéptidos, etc, a través de por lo menos una zona de reconocimiento de antígeno, situada en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término comprende no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales íntegros, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenario (scFv), los mutantes de los mismos, las variantes naturales, proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpos con una zona de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos híbridos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende una zona de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos en la que el anticuerpo monoclonal está constituido por aminoácidos (de origen natural y artificial) que están implicados en la unión selectiva de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra una sola zona antigénica. El término "anticuerpo monoclonal" comprende no sólo los anticuerpos monoclonales y anticuerpos monoclonales completos, sino también fragmentos de los mismos (tales como, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenario (scFv), los mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales híbridos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende una zona de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida y la capacidad para unirse a un antígeno. No se pretende estar limitado en lo que respecta a la fuente de anticuerpos o a la manera en que se prepara (por ejemplo, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye todas las inmunoglobulinas, así como los fragmentos, etc. descritos anteriormente en la definición de "anticuerpo".

Los anticuerpos "humanizados" se refieren a una molécula híbrida, preparados generalmente utilizando técnicas recombinantes, que tiene una zona de unión al antígeno procedentes de una inmunoglobulina de una especie no humana y la estructura de la inmunoglobulina restante de la molécula basada en la estructura y/o la secuencia de una inmunoglobulina humana. El punto de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados a dominios constantes o sólo las regiones determinantes de complementariedad (RDC) injertadas en regiones marco adecuadas en los dominios variables. Los puntos de unión al antígeno puede ser naturales o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos. Esto elimina la región constante como inmunógeno en sujetos humanos, pero se mantiene la posibilidad de una respuesta inmunitaria a la región variable extraña (LoBuglio, A.F. *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4220-4224). Otro enfoque se centra no sólo en proporcionar regiones constantes de origen humano, sino en modificar las regiones variables también a fin de cambiarlas de forma lo más posible a su forma humana. Se sabe que las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como ligeras contienen tres regiones determinantes de complementariedad (RDC) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinar la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco

(FR) que están relativamente conservados en un especie y que supuestamente proporcionan un andamiaje de las RDC. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno específico, las regiones variables pueden "cambiarse de forma" o "humanizarse" injertando las RDC procedentes de anticuerpos no humanos en las FR presentes en el anticuerpo humano que ha de ser modificado. La aplicación de este enfoque a varios anticuerpos ha sido descrito por Sato, K., *et al.*, (1993), *Cancer Res.* 53:851-856. Riechmann, L., *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M., *et al.*, (1988) *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C.A., *et al.*, (1991) *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H., *et al.*, (1991) *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S.D., *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4181-4185; Tempest, P.R., *et al.*, (1991) *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M.S., *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869-2873; Carter, P., *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289; y Co, MS *et al.*, (1992) *J. Immunol.* 148:1149-1154. En algunas formas de realización, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de RDC (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis RDC de los anticuerpos de ratón). En otras formas de realización, los anticuerpos humanizados tienen una o más RDC (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis), que se alteran con respecto al anticuerpo original, que se denominan también una o más RDC "procedente(s) de" una o más RDC del anticuerpo original.

Un epítipo que "se une específicamente" o "se une preferentemente" (utilizado indistintamente en la presente memoria) a un anticuerpo o a un polipéptido es un término bien entendido en la materia, y los procedimientos para determinar dicha unión específica o preferente son también conocidos en la materia. Se dice que una molécula muestra "unión específica" o "unión preferida" si reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con una mayor afinidad con una determinada célula o sustancia que lo hace con otras células o sustancias. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con una mayor duración que a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferentemente a un epítipo RAAG10 es un anticuerpo que se une este epítipo RAAG10 con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que a otros epítopos RAAG10 o epítopos no de RAAG10. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que específica o preferentemente se une a una primera diana puede o no unirse específica o preferentemente a una segunda diana. En sí, "unión específica" o "unión preferida" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva. Por lo general, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión preferida.

El término "inmunológicamente activo", en referencia a un epítipo que es o "que permanece inmunológicamente activo" se refiere a la capacidad de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-RAAG10) para unirse a un epítipo en diferentes condiciones, por ejemplo, una vez que el epítipo se ha sometido a condiciones reductoras y desnaturalizantes.

Las diferentes funciones biológicas están asociadas a anticuerpos anti-RAAG10, que comprenden de manera no limitativa, la capacidad para unirse a RAAG10 (incluyendo RAAG10 en las células cancerosas, incluyendo pero sin limitarse a células cancerosas de ovario, próstata, páncreas, pulmón, colon o de mama), la capacidad para unirse a una parte de RAAG10 que está expuesto en la superficie de una célula viva *in vitro* o *in vivo*; la capacidad para suministrar un agente quimioterapéutico a las células cancerosas (tales como a las células cancerosas de ovario, próstata, páncreas, pulmón, colon, o mama) que expresa RAAG10; capacidad para suministrar un agente terapéutico o un marcador detectable en las células cancerosas que expresan RAAG10. Como se expuso en la presente memoria, los polipéptidos (incluyendo los anticuerpos) de la invención pueden tener una o más de estas características.

Un "anticuerpo anti-RAAG10 equivalente" o "anti-polipéptido RAAG10 equivalente" se refiere a un anticuerpo o un polipéptido que tiene una o más funciones biológicas asociadas a un anticuerpo anti-RAAG10, como, por ejemplo especificidad de unión.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "agente" se refiere a un compuesto biológico, farmacéutico o químico. Los ejemplos no limitativos incluyen moléculas orgánicas o inorgánicas simples o complejas, un péptido, una proteína, un oligonucleótido, un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un derivado de vitamina, un hidrato de carbono, una toxina, o un compuesto quimioterapéutico. Se pueden sintetizar varios compuestos, por ejemplo, moléculas pequeñas y oligómeros (por ejemplo, oligopéptidos y oligonucleótidos), y compuestos orgánicos sintéticos basados en estructuras básicas. Además, varias fuentes naturales pueden proporcionar los compuestos para identificación, tales como extractos vegetales o animales, y similares. Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que no existe un límite en cuanto a la naturaleza estructural de los agentes de la presente invención.

Los agentes utilizados en los procedimientos de la presente invención pueden seleccionarse al azar o seleccionarse o diseñarse racionalmente. Tal como se utiliza en la presente memoria, se dice que un agente se selecciona al azar cuando el agente se elige al azar sin considerar las secuencias específicas que participan en la asociación de RAAG10 con sus acompañantes de unión naturales o anticuerpos conocidos. Un ejemplo de los agentes seleccionados al azar es la utilización de un banco químico o de un banco combinatorio de péptidos.

5 Según se utiliza en la presente memoria, un agente se selecciona o se diseña racionalmente cuando el agente se elige de forma no aleatoria que tiene en cuenta la secuencia del punto de destino y/o su configuración en relación con la acción del agente. Con respecto a los agentes anti-RAAG10, actualmente se cree que hay por lo menos tres epítomos en RAAG10 contra los que los anticuerpos pueden ser producidos y por lo tanto por lo menos tres puntos de acción para los agentes que bloquean la interacción RAAG10/anti-RAAG10. La presente invención comprende asimismo los agentes que actúan en los puntos de interacción entre RAAG10 y su acompañante de unión natural, aunque otros ligandos y sus puntos activos interactivos con RAAG10 también están comprendidas dentro del alcance de la presente invención, ya se conozca actualmente o se identifique más tarde. Los agentes pueden seleccionarse racionalmente o diseñarse racionalmente utilizando las secuencias de péptidos que componen los puntos de contacto del complejo receptor/ligando y/o de anticuerpos RAAG10/anti-RAAG10. Por ejemplo, un agente peptídico seleccionado racionalmente puede ser un péptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a un epítomo que aparece en RAAG10 tal como se expone en la superficie de una célula viva en su medio natural. Dicho agente reducirá o bloqueará la asociación del anticuerpo anti-RAAG10 con RAAG10, o la asociación de RAAG10 con su ligando natural, como se desea, al unirse al anticuerpo anti-RAAG10 o al ligando natural.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "marcado", con respecto al anticuerpo, pretende comprender el marcado directo del anticuerpo por acoplamiento (es decir, unión física) una sustancia detectable, como un agente radioactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE)) al anticuerpo, así como el marcado indirecto de la sonda o el anticuerpo por reactividad con una sustancia detectable.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "asociación", con respecto al anticuerpo, incluye el acoplamiento o enlace covalente o no covalente a un agente (p. ej. agente quimioterapéutico). El anticuerpo se puede asociar a un agente (p. ej., agente quimioterapéutico) por enlace directa o enlace indirecto mediante acoplamiento a una plataforma común, de tal manera que el anticuerpo dirige la localización del agente a la célula cancerosa a la que se une el anticuerpo y en la que el anticuerpo y el agente no se disocian sustancialmente en condiciones fisiológicas de tal manera que el agente no se dirige a la misma célula cancerosa a la que se une el anticuerpo o de tal manera que la potencia del agente no disminuye.

20 Una "muestra biológica" comprende una variedad de tipos de muestras extraídas de un sujeto y se pueden utilizar en un ensayo de diagnóstico o de seguimiento. La definición comprende muestras de sangre y de otros líquidos de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, tales como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células procedentes de los mismos, y la descendencia de las mismas, por ejemplo, las células extraídas de una muestra de tejido recogido de un sujeto que se sospecha que padece cáncer, en las formas de realización preferidas de tejido de ovario, pulmón, próstata, páncreas, colon y mama. La definición también incluye las muestras que han sido manipuladas de ninguna manera después de su adquisición, como por tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento en determinados componentes, como proteínas o polinucleótidos, o incrustación en una matriz semi-sólida o sólida para dividir los objetivos. El término "muestra biológica" comprende una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, los sobrenadantes de células, lisados de células, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejido.

25 Una "célula hospedadora" incluye una celda individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido receptor de vector(es) para la incorporación de inserciones de polinucleótidos. Las células hospedadoras incluyen la descendencia de una sola célula hospedadora, y la descendencia puede no ser necesariamente completamente idéntica (en la morfología o en el complemento del ADN genómico) a la célula madre original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula hospedadora incluye células transfectadas *in vivo* con polinucleótido(s) de la presente invención.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, "retrasar el desarrollo de la metástasis" significa diferir, obstaculizar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de metástasis. Este retraso puede ser de duración variable, dependiendo del historial del cáncer y/o del sujeto que se está tratando. Como resulta evidente para un experto en la materia, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, comprender la prevención, para que el sujeto no desarrolle la metástasis.

35 Una "cantidad eficaz" de una composición farmacéutica, en una forma de realización, es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, comprendiendo de manera no limitativa, los resultados clínicos, tales como reducción del tamaño del tumor (en el contexto del cáncer, por ejemplo, cáncer de mama o de próstata), retraso de crecimiento de las células cancerosas, lo que retarda el desarrollo de metástasis, disminución de los síntomas procedentes de la enfermedad, aumento de la calidad de vida de los que padecen la enfermedad, disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, aumento del efecto de otra medicación tales como mediante la focalización y/o interiorización, lo que retrasa la evolución de la enfermedad, y/o prolonga la supervivencia de los sujetos. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o varias administraciones. En el contexto de la presente invención, una cantidad eficaz del fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para reducir la proliferación de las células cancerosas (o destruirlas) y para reducir y/o retardar el desarrollo, o crecimiento, de la metástasis de células cancerosas, ya sea directa o indirectamente. En algunas formas de realización, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no conseguirse junto con otro fármaco, compuesto o composición

5 farmacéutica. Por lo tanto, una "cantidad eficaz" puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos, y un solo agente puede considerarse que ha de administrarse en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes, puede haber o se consigue un resultado deseable. Si bien las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de las cantidades eficaces de cada componente está dentro de la experiencia en la técnica. Las dosis típicas comprenden de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal. Las dosis preferidos comprenden de 1 a 100 mg/kg de peso corporal. Las dosis más preferidas comprenden de 10 a 100 mg/kg de peso corporal.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, se hace referencia a la molécula de ácido nucleico o agente, anticuerpo, composición o célula, etc., como "aislado/aislada", cuando esa molécula de ácido nucleico, agente, anticuerpo, composición o célula, etc. está sustancialmente separada de las moléculas de ácidos nucleicos contaminantes, anticuerpos, agentes, composiciones, o las células, etc. de su fuente original.

15 Un "sujeto" es un vertebrado, preferentemente un mamífero, preferentemente un ser humano. Los mamíferos comprenden de manera no limitativa, animales de granja, animales para deporte, mascotas, primates, ratones y ratas.

20 Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a los polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede ser interrumpido por compuestos no aminoácidos. Los términos también incluyen un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención, por ejemplo, formación del enlace disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tales como la conjugación con un componente de marcado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o varios análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos artificiales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de la presente invención se basan en un anticuerpo, los polipéptidos puede surgir como cadenas simples o cadenas asociadas.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, "sustancialmente puro" se refiere al material que tiene por lo menos 50% de pureza (es decir, libre de contaminantes), más preferentemente por lo menos 90% de pureza, más preferentemente por lo menos 95% de pureza, más preferentemente por lo menos el 98% de pureza, más preferentemente por lo menos el 99% de pureza, o más, pureza.

35 "Toxina" se refiere a cualquier sustancia, que efectúa una respuesta perjudicial dentro de una célula. Por ejemplo, una toxina dirigida a una célula cancerosa podría tener un efecto perjudicial, a veces nocivo, en la célula cancerosa. Los ejemplos de toxinas comprenden de manera no limitativa los radioisótopos, caliqueamicina y maitansinoides.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, "tratamiento" o "tratamiento" es un método para la obtención de resultados beneficiosos o deseados y, preferentemente, incluyendo resultados clínicos. Para la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados comprenden de manera no limitativa uno o más de los siguientes: reducción de la proliferación (o destrucción) de las células cancerosas u otras enfermas, reducción de la metástasis de las células cancerosas que se encuentran en los cánceres, reducción del tamaño del tumor, disminución de los síntomas procedentes de la enfermedad, aumento de la calidad de vida de los que padecen la enfermedad, disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retraso de la evolución de la enfermedad, y/o prolongación de la supervivencia de personas.

III. Procedimientos de preparación de anticuerpos

50 Los procedimientos de preparación de anticuerpos monoclonales son conocidos en la materia. Uno de los procedimientos que se pueden utilizar es el método de Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975) o una modificación de los mismos. Normalmente, los anticuerpos monoclonales se desarrollan en especies no humanas, tales como los ratones. En general, para la inmunización se utiliza un ratón o una rata, pero también pueden utilizarse otros animales. Los anticuerpos se producen al inmunizar ratones con una cantidad inmunógena de células, extractos de células, o preparados de proteínas que contienen RAAG10 humanos. El inmunógeno puede ser, pero no se limita a, células primarias, estirpes celulares cultivadas, células cancerosas, ácidos nucleicos o tejido. En una forma de realización, se utilizan células humanas de vejiga fetal. En otra forma de realización, se utilizan células madre pancreáticas. En el Ejemplo 1 se detallan procedimientos para el aislamiento y cultivo de células humanas de vejiga del feto y células madre pancreáticas. Las células utilizadas para el inmunógeno, por ejemplo, las células de vejiga del feto humano o de las células madre pancreáticas, pueden ser cultivadas durante un período de tiempo (por lo menos 24 horas) antes de su utilización como inmunógeno. Las células (por ejemplo, células de vejiga del feto humano o células madre pancreáticas) se puede utilizar como inmunógenos por sí mismos o en combinación con un adyuvante no desnaturizante, tal como Ribi. En general, las células deben mantenerse intactas y preferentemente viables cuando se utilizan como inmunógenos. Las células íntegras puede permitir detectar antígenos mejor en animales inmunizados que las células rotas. La utilización de adyuvantes de desnaturización o ásperos, por ejemplo, adyuvante de Freud, pueden romper las células de vejiga de feto humano

o células madre pancreáticas humanas y por lo tanto es desalentador. El inmunógeno se puede administrar varias veces a intervalos periódicos, tales como, quincenal o semanal, o puede administrarse de tal manera que mantenga la viabilidad en el animal (por ejemplo, en un tejido recombinante). El Ejemplo 2 describe procedimientos utilizados para generar anticuerpos anti-RAAG10 y puede utilizarse para generar otros anticuerpos monoclonales, que se unen a RAAG10.

En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales, que se obtienen se unen a RAAG10 utilizando células hospedadoras que sobreexpresan RAAG10 como inmunógeno.

Para controlar la respuesta del anticuerpo, puede extraerse del animal una pequeña muestra biológica (por ejemplo, sangre) y determinar el valor de anticuerpos contra el inmunógeno. El bazo y/o varios ganglios linfáticos grandes se pueden quitar y disociar en células individuales. Si se desea, las células del bazo pueden examinarse (después de la eliminación de las células no específicamente adherentes) aplicando una suspensión celular a una placa o a un pocillo recubierta con el antígeno. Los linfocitos B, que expresan inmunoglobulinas específicas de la membrana para el antígeno, se unirán a la placa, y no se enjuagan con el resto de la suspensión. Los linfocitos B resultantes, o todos los esplenocitos disociados, se pueden fusionar entonces con las células de mieloma (por ejemplo, X63-Ag8.653 y las del Cell Distribución Center, Instituto Salk, San Diego, CA). Se puede utilizar polietilenglicol (PEG) para fusionar esplenocitos o linfocitos con células de mieloma para formar un hibridoma. El hibridoma se puede cultivar a continuación en un medio selectivo (por ejemplo, hipoxantina, aminopterina, medio de timidina, también conocido como "medio HAT"). Los hibridomas resultantes se colocan en placas por dilución limitativa, y se analiza la producción de anticuerpos que se unen específicamente al inmunógeno (por ejemplo, la superficie de las células HFB, la superficie de las estirpes celulares de cáncer, las secciones de vejiga fetal, etc.) utilizando FACS o inmunohistoquímica (cribado de IHQ). Los hibridomas seleccionados que segregan anticuerpos monoclonales se cultivan a continuación *in vitro* (por ejemplo, en botellas de cultivo tisular o reactores de fibra hueca), o *in vivo* (por ejemplo, como ascitis en ratones). El ejemplo 3 proporciona más detalles acerca de los procedimientos utilizados para obtener e identificar un anticuerpo anti-RAAG10.

Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, pueden utilizarse linfocitos B inmortalizado por el VEB para producir anticuerpos monoclonales de la presente invención. Los hibridomas se expanden y se subclonan, si se desea, y se analiza en los sobrenadantes la actividad contra el inmunógeno por procedimientos de análisis convencionales (por ejemplo, FACS, IHQ, radioinmunoanálisis, inmunoanálisis enzimático, inmunoanálisis de fluorescencia, etc.).

En otra alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-RAAG10 y cualesquier otros anticuerpos equivalentes pueden secuenciarse y producirse por recombinación por cualquier medio conocido en la técnica (por ejemplo, humanización, utilización de ratones transgénicos para producir anticuerpos completamente humanos, tecnología de presentación de fagos, etc.). En una forma de realización, el anticuerpo monoclonal anti-RAAG10 se secuencia y la secuencia de polinucleótidos se clona en un vector de expresión o de propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en un vector en una célula hospedadora y la célula hospedadora puede ampliarse a continuación y congelarse para su utilización en el futuro.

La secuencia de polinucleótidos de anticuerpo anti-RAAG 10 monoclonal y de cualesquier otros anticuerpos equivalentes puede utilizarse para la manipulación genética para generar un anticuerpo "humanizado", para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. El principio general en la humanización de un anticuerpo supone mantener la secuencia básica de la fracción de unión al antígeno del anticuerpo, mientras se intercambia el resto no-humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpo humano. Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar los nucleótidos y predecir la secuencia de aminoácidos de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región del marco de anticuerpo utilizar durante el proceso de humanización (3) las metodologías y técnicas de humanización existentes y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, la patente US nº 4.816.567; nº 5.807.715; nº 5.866.692 y nº 6.331.415.

Se han descrito numerosas moléculas de anticuerpo "humanizado" que comprenden una zona de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo los anticuerpos híbridos con regiones V de roedores o roedores modificados y su complementariedad asociada para determinar las regiones (RDC) fusionadas a dominios humanos constantes. Véase, por ejemplo, Winter *et al. Nature* 349:293-299 (1991), Lobuglio *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989), Shaw *et al. J. Immunol.* 138:4534-4538 (1987) y Brown *et al. Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987). Otras referencias describen las RDC de roedores injertados en una región marco (FR) humana de soporte antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann *et al. Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeyen *et al. Science* 239:1534-1536 (1988) y Jones *et al. Nature* 321:522-525 (1986). Otra referencia describe RDC de roedores soportadas por regiones marco de roedores de apariencia exterior recombinante. Véase, por ejemplo, la publicación de patente europea nº 519.596. Estas moléculas "humanizadas" están diseñados para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia las moléculas de anticuerpo anti-humano en roedores que limita la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de los restos en receptores humanos. Otros procedimientos de humanización de

anticuerpos que pueden utilizarse también son dados a conocer por Daugherty *et al.* *Nucl. Acids Res.*, 19:2471-2476 (1991) y en las patentes US nº 6.180.377, nº 6.054.297, nº 5.997.867 y nº 5.866.692.

5 La invención también comprende fragmentos monocatenarios de la región variable ("scFv") de anticuerpos de la presente invención, como mKID2. Los fragmentos monocatenarios de la región variable se preparan uniendo las regiones variables de cadena ligera y/o pesada utilizando un péptido corto de enlace. Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426 describe ejemplos de péptidos de enlace que forman un puente de aproximadamente 3,5 nm entre el terminal carboxilo de una región variable de uno y el terminal amino de la otra región variable. Se han diseñado y utilizado enlazadores de otras secuencias, Bird *et al.* (1988). Los enlazadores a su vez pueden modificarse para funciones adicionales, tal como el acoplamiento de fármacos o el acoplamiento a soportes sólidos. Las variantes monocatenarias pueden producirse de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede utilizarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, un plásmido adecuado que contiene polinucleótido que codifica el scFv se puede introducir en una célula hospedadora adecuada, ya sea eucariota, tal como la levadura, vegetal, insectos o células de mamífero, o procariotas, tales como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden prepararse por manipulaciones de rutina, tales como la ligadura de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse, utilizando las técnicas de purificación de proteínas conocidas en la materia.

20 La invención incluye modificaciones a los anticuerpos, incluyendo anticuerpos funcionalmente equivalentes y polipéptidos que no afecten transcrintamente a sus propiedades y las variantes que han aumentado o disminuido la actividad. La modificación de los polipéptidos es una práctica habitual en la técnica y no necesita ser descrita con detalle en la presente memoria. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de los restos de aminoácidos, uno o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de manera perjudicial la actividad funcional, o la utilización de análogos químicos. Los restos de aminoácidos que pueden sustituirse uno por otro de manera conservadora incluyen pero no se limitan a: glicina/alanina; valina/soleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina; lisina/arginina y fenilalanina/tirosina. Estos polipéptidos también incluyen polipéptidos glucosilados y no glucosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones después de la traducción, como, por ejemplo, la glucosilación con diferentes azúcares, la acetilación y la fosforilación. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos sería conservadora, el aminoácido sustituido poseería propiedades químicas similares a las del aminoácido original. Dichas sustituciones conservadoras son conocidas en la técnica, y se han proporcionado ejemplos anteriormente. Las modificaciones de aminoácidos pueden oscilar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos hasta completar el rediseño de una región, tales como la región variable. Los cambios en la región variable puede alterar afinidad y/o especificidad de unión. Otros procedimientos de modificación incluyen la utilización de técnicas de acoplamiento conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitarse a, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Las modificaciones pueden utilizarse, por ejemplo, para el acoplamiento de los marcadores de inmunoanálisis, tales como el acoplamiento de restos radiactivos para radioinmunoanálisis. Los polipéptidos modificados se preparan utilizando los procedimientos establecidos en la materia y pueden identificarse utilizando ensayos estándares conocidos en la técnica.

40 La invención también comprende las proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos de la presente invención. En una forma de realización, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende por lo menos 10 aminoácidos contiguos de la región variable de cadena ligera y por lo menos 10 aminoácidos de la región variable de cadena pesada. En otra forma de realización, el polipéptido de fusión contiene una región constante de la inmunoglobulina heteróloga. En otra forma de realización, el polipéptido de fusión contiene una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada de un anticuerpo producido a partir de un hibridoma depositado en la ATCC como se describe en la presente memoria. Para efectos de la presente invención, una proteína de fusión del anticuerpo contiene uno o más polipéptidos anti-RAAG10 y otra secuencia de aminoácidos a la que no está unida en la molécula natural, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Un polipéptido anti-RAAG10 se puede crear por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, por síntesis o recombinación.

55 Todavía en otra alternativa, pueden obtenerse anticuerpos totalmente humanos utilizando ratones comercialmente disponibles que han sido modificados genéticamente para expresar proteínas específicas de inmunoglobulina humana. Los animales transgénicos que se diseñan para producir una respuesta inmunitaria más deseable (por ejemplo, los anticuerpos completamente humanos) o más robusta también pueden utilizarse para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Los ejemplos de esta tecnología son XenoMouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

60 En una alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante y expresarse utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los anticuerpos se pueden preparar por recombinaciones, aislando en primer lugar los anticuerpos producidos en animales hospedador, obteniendo la secuencia génica, y utilizando la secuencia del gen para expresar el anticuerpo por recombinación en células hospedadoras (por ejemplo, las células CHO). Otro procedimiento que puede emplearse consiste en expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (por ejemplo, el tabaco) o leche transgénica. Los procedimientos para expresar anticuerpos por recombinaciones en plantas o en la leche se han dado a conocer. Véase, por ejemplo, Peeters, *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2756; Lonberg,

N. y D. Huszar (1995) *Rev. Immunol* 13:65; y Pollock, *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147. Los procedimientos para preparar derivados de anticuerpos, p. ej., una cadena, humanizada, etc. son conocidos en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos pueden prepararse por recombinación por la tecnología de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, las patentes US nº 5.565.332, nº 5.580.717, nº 5.733.743, nº 6.265.150; y Winter *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994).

Los anticuerpos o proteínas de interés pueden ser sometidos a secuenciación por la degradación de Edman, lo que es bien conocido por los expertos en la materia. La información de péptidos generada por espectrometría de masas o degradación de Edman se puede utilizar para diseñar sondas o cebadores que se utilizan para clonar la proteína de interés.

Un procedimiento alternativo de clonación de la proteína de interés es por "adhesión celular sobre plástico" utilizando ALCAM para las células que expresan el anticuerpo o la proteína de interés. El procedimiento de "adhesión celular sobre plástico" se lleva a cabo mediante la obtención de una genoteca a partir de tejidos o células que expresan el anticuerpo o la proteína de interés, sobreexpresando los ADNc en un segundo tipo celular, identificando las células transfectadas del segundo tipo celular para un enlace específico a ALCAM. Las descripciones detalladas de los procedimientos utilizados en la clonación de genes de mamíferos que codifican las proteínas de la superficie celular por "adhesión celular sobre plástico" se puede encontrar en la técnica. Véase, por ejemplo, Aruffo, A. y Seed, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8573-8577 (1987) y Stephan, J. *et al.*, *Endocrinology* 140:5.841-5854 (1999).

Los ADNc se pueden obtener por transcripción inversa de los ARN de un tipo de célula específico según los procedimientos habituales en la materia. En concreto, el ARNm se puede aislar utilizando una serie de enzimas líticas o soluciones químicas de acuerdo a los procedimientos expuestos en Sambrook *et al.* anteriormente o extraídas con resinas que se unen al ácido nucleico disponibles en el mercado siguiendo las instrucciones adjuntas proporcionadas por los fabricantes (por ejemplo, Qiagen, Invitrogen, Promega). El ADNc sintetizado se introduce entonces en un vector de expresión para producir los anticuerpos o proteínas de interés en las células de un segundo tipo. Se supone que un vector de expresión debe poder replicarse en las células hospedadoras, ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a plásmidos, vectores víricos, como los adenovirus, virus adeno-asociado, retrovirus y cósmidos.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés se pueden introducir en la célula hospedadora por cualquiera de una serie de medios adecuados, incluida la electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, u otras sustancias; bombardeo de micropartículas; lipofección e infección (p. ej., donde el vector es un agente infeccioso tal como el virus de la vacuna). La elección de los vectores de introducción o polinucleótidos a menudo dependerá de las características de la célula hospedadora.

Algunas células hospedadoras capaces de sobreexpresión de los ADN heterólogos pueden utilizarse con el fin de aislar los genes que codifican los anticuerpos, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitativos de células hospedadoras mamífero incluyen pero no se limitan a células COS, HeLa y CHO. Preferentemente, las células hospedadoras expresan los ADNc en un nivel de alrededor 5 veces mayor, más preferentemente 10 veces mayor, aún más preferentemente 20 veces mayor que el de los anticuerpos o proteínas endógenos correspondientes de interés, si está presente, en las células hospedadoras. La identificación de las células hospedadoras para una unión específica a RAAG10 se efectúa por inmunoanálisis o FACS. Una célula que sobreexpresa el anticuerpo o la proteína de interés puede identificarse.

La invención incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de la presente invención. Los polipéptidos de la presente invención se pueden preparar por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden ser producidos por degradación proteolítica u otra de los anticuerpos, por métodos recombinantes (es decir, polipéptidos aislados o de fusión) como se describió anteriormente, o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, en especial los polipéptidos más cortos hasta de aproximadamente 50 aminoácidos, se preparan convenientemente por síntesis química. Los métodos de síntesis química se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un polipéptido anti-RAAG10 podría ser producido por un sintetizador de polipéptidos automatizado empleando el método de fase sólida.

IV. Métodos para la detección de anticuerpos monoclonales

Pueden utilizarse varios métodos para detectar anticuerpos monoclonales que se unen a RAAG10. Se entiende que "unión" se refiere a unión inmunológicamente relevante es decir, unión que es específica para el antígeno único mediante el que se codifica la molécula de inmunoglobulina. No se refiere a la unión no específica que puede ocurrir cuando se utiliza una inmunoglobulina a una concentración muy alta frente a una diana no específica. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales se detectan por la unión a RAAG10 utilizando técnicas de detección habituales. De esta manera, se obtuvo el anticuerpo monoclonal anti-RAAG10. De conformidad con el Tratado de Budapest, los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales anti-RAAG10 se

han depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Blvd., Manassas VA 20110-2209 el 9 de abril de 2002 con denominación de depósito de patente PTA-4217, PTA-4218, PTA-4244, y PTA-4245.

5 Los anticuerpos monoclonales que se unen a RAAG10 se detectan por la unión a tejidos cancerosos y a células no cancerosas. En una forma de realización, se seleccionan los anticuerpos monoclonales que se unen a RAAG10 y que además presentan reactividad cruzada para células o tejidos cancerosos, pero no para las células o tejidos normales en el mismo grado. Un método que puede emplearse para la detección es la inmunohistoquímica (IHQ). Los expertos en la materia conocen las técnicas de inmunohistoquímica habituales. Véase, por ejemplo, Animal Cell Culture Methods (J.P. Mather y D. Bames, eds, Academic Press, Vol. 57, Caps. 18 y 19, págs. 314-350, 10 1998). Pueden extraerse muestras biológicas (por ejemplo, de tejidos) a partir de biopsias, autopsias o necropsias. Para determinar si RAAG10 sólo está presente en las células cancerosas, se pueden utilizar anticuerpos anti-RAAG10 para detectar la presencia de RAAG10 en los tejidos de sujetos con cáncer, mientras que otros tejidos no cancerosos del sujeto que padece cáncer o tejidos de sujetos sin cáncer se utilizan como referencia. El tejido puede estar incrustado en una sustancia sólida o semisólida que impide daños durante la congelación (por ejemplo, gel de agarosa u OCT) y se secciona a continuación para la tinción. Los cánceres de diferentes órganos y en diferentes grados se puede utilizar para detectar anticuerpos monoclonales. Los ejemplos de los tejidos que se pueden utilizar para selección incluyen, pero no se limitan al cáncer de ovario, mama, pulmón, próstata, colon, riñón, piel, tiroides, cerebro, corazón, hígado, estómago, nervios, vasos sanguíneos, huesos, aparato digestivo superior y páncreas. Los ejemplos de diferentes tipos de cáncer que pueden utilizarse para la 15 detección incluyen pero no se limitan a carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, adenosarcomas, linfomas y leucemias.

25 En otra alternativa, las estirpes de células cancerosas, como SK-Ov-3 (ATCC #HTB 77), LNCaP (ATCC #CRL-1740), A549 (ATCC #CCL 185), PANC-1 (ATCC #CRL 1469), SK-BR-3 (ATCC #HTB 30), SK-MES-1 (ATCC #HTB 58), HT-29 (HTB-38), SW 480 (ATCC #CCL 228), AsPC-1 (ATCC #CRL 1682), Capan- 1 (ATCC #HTB 79), CFPAC-1 (ATCC #CRL 1918), HPAF-II (ATCC #CRL-1997), Hs-700T (ATCC #HTB 147), ES-2 (ATCC #CRL-1978), PC-3 (ATCC #CRL 1435), Du-145 (ATCC #HTB-81), Calu3 (ATCC #HTB-55), A498 (ATCC #CRL-7908), Caki-2 (ATCC #HTB-47), 786-O (ATCC #CRL-1932), Hs 766T (ATCC #HTB- 134), MCF7 (ATCC #HTB-22), BT-474 (ATCC #HTB-20), Rav CA130 (estirpe de células cancerosas pulmonar registrada desarrollada en Raven Biotechnologies, Inc.), Rav9926 (estirpe de células cancerosas de páncreas registrada desarrollada en Raven) y 22Rv1 (ATCC #CRL-2505) y las células normales de sus respectivos tejidos se pueden utilizar para la detección de anticuerpos monoclonales que son específicos para el tejido canceroso. paso de Primario, o paso bajo, cultivos de células procedentes de tejidos normales de diferentes órganos, incluyendo pero sin limitarse a, ovario, mama, pulmón, próstata, colon, riñón, piel, tiroides, músculo liso de la aorta y células endoteliales pueden utilizarse como referencias negativas. Las células cancerosas o no cancerosos se pueden cultivar en portaobjetos o cubreobjetos de vidrio, o en superficies de plástico, o prepararse en un CellArray™, como se describe en el documento WO 01/43869, y se detectan para la unión de anticuerpos utilizando análisis IHQ como se describió anteriormente para los tejidos. Alternativamente, las células pueden retirarse de la superficie de cultivo utilizando medios no proteolíticos y centrifugación dentro de una bolita, que se incrusta a continuación y se trata como tejidos para el análisis de IHQ como se describió anteriormente. En otra alternativa, células aisladas pueden detectarse por incubación con el anticuerpo primario, un anticuerpo secundario "indicador" unido a una molécula fluorescente y a continuación analizado utilizando una máquina de clasificación de células activadas fluorescentes (FACS).

45 Pueden utilizarse varios sistemas diferentes de detección para detectar la unión de anticuerpos a la sección de tejido. Por lo general, inmunohistoquímica implica la unión de un anticuerpo primario al tejido y a continuación un anticuerpo secundario reactivo contra la especie procedente del anticuerpo primario se generó y conjugó con un marcador detectable (p. ej., peroxidasa de rábano, HRP, o diaminobencedina, DAB). Un método alternativo que puede utilizarse es de anticuerpos policlonales complementarios de la imagen en el espejo o poliMICA. La técnica polyMICA (policlonal Mirror Image Complementary Antibodies), descrita por D.C. Mangham y P.G. Isaacson (Histopathology (1999) 35(2):129-33), puede utilizarse para probar la unión de los anticuerpos primarios (p. ej., los anticuerpos anti-RAAG10) a los tejidos normales y cancerosos. Varios tipos de kits de detección polyMICA™ resultan disponibles comercialmente en The Binding Site Limited (P.O. Box 4073 Birmingham B29 6AT, Inglaterra). El producto nº HK004.D es un kit de detección polyMICA™ que utiliza chromagen DAB. El producto nº HK004. A es un kit de detección polyMICA que utiliza cromógeno AEC. Por otra parte, el anticuerpo primario puede estar directamente marcado con el marcador detectable.

60 La primera etapa en la detección IHQ para seleccionar un anticuerpo apropiado es la unión de los anticuerpos primarios producidos en ratones (p. ej., los anticuerpos anti-RAAG10) contra uno o más inmunógenos (por ejemplo, muestras de células o de tejido). En una forma de realización, la muestra de tejido es de secciones de tejido congelado procedentes de diferentes órganos. Las células o muestras de tejido pueden ser cancerosos o no cancerosos.

65 Los tejidos congelados se pueden preparar, seccionados, con o sin fijación, y la HQ realizada por cualquiera de los numerosos métodos conocidos para familiarizarse con la técnica. Véase, por ejemplo, Stephan *et al. Dev. Biol.* 212: 264-277 (1999), y Stephan *et al. Endocrinology* 140: 5841-54 (1999).

V. Métodos de caracterización de anticuerpos anti-RAAG10

Varios métodos pueden utilizarse para caracterizar anticuerpos anti-RAAG10. Un método consiste en identificar el epítipo al que se une. La cartografía del epítipo está comercializada por diversos proveedores, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). La cartografía del epítipo se puede utilizar para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo anti-RAAG10. El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en un solo tramo de aminoácidos, o un epítipo de configuración formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que no necesariamente pueden estar contenidos en un solo tramo. Péptidos de longitudes variables (por ejemplo, por lo menos 4-6 aminoácidos de longitud) pueden aislarse o sintetizarse (por ejemplo, por recombinación) y utilizarse para ensayos de unión con el anticuerpo anti-RAAG10. El epítipo al que se une el anticuerpo RAAG10 se puede determinar en una identificación sistemática utilizando péptidos superpuestos procedentes de la secuencia extracelular y determinando la unión por el anticuerpo anti-RAAG10. La cartografía del epítipo de RAAG10 se detalla en los ejemplos. Se ha determinado que existe más de un epítipo de RAAG10, con los anticuerpos KID13, LUCA1 y GB8 de la invención que se unen a un epítipo, los anticuerpos SKIN2, PA20 y KID1 de la invención que se unen a un segundo epítipo, y el anticuerpo BLA8 de la invención que se une a un tercer epítipo. Estos anticuerpos son únicamente representativos de los grupos de nuevos anticuerpos con similares características inherentes de unión y biológicas, los cuales están específicamente comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

Otro método todavía que puede utilizarse para caracterizar un anticuerpo anti-RAAG10 consiste en utilizar ensayos de competencia con otros anticuerpos que se conoce que se unen al mismo antígeno, es decir, RAAG10 para determinar si los anticuerpos anti-RAAG10 se une al epítipo que otros anticuerpos. Ejemplos de anticuerpos comercialmente disponibles para RAAG10 pueden estar disponibles y pueden identificarse utilizando los ensayos de unión dados a conocer en la presente memoria. Los ensayos de competencia son bien conocidos por los expertos en la materia, y dichos procedimientos y los datos ilustrativos se detallan más en los ejemplos. Los anticuerpos anti-RAAG10 puede caracterizarse aún más por los tejidos, el tipo de cáncer o el tipo de tumor al que se unen.

Otro método de caracterización de anticuerpos anti-RAAG10 es por el antígeno al que se unen. Se utilizaron anticuerpos anti-RAAG10 en inmunotransferencia Western con lisados de células de diversos tipos de cáncer humano. Como es conocido para un experto en la materia, la inmunotransferencia Western puede implicar introducir lisados celulares y/o fracciones de células en un gel desnaturante o no desnaturante, la transferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa, y luego sondar la inmunotransferencia con un anticuerpo (p. ej., anticuerpo anti-RAAG10) para ver qué proteínas se unen al anticuerpo. Este procedimiento se expone con mayor detalle en el ejemplo 4. Se aisló la banda a la que se une el anticuerpo anti-RAAG10 y se confirmó el análisis utilizando espectroscopia de masas, como se describe en los ejemplos 5 y 6. El antígeno al que se une el anticuerpo anti-RAAG10 resultó ser RAAG10. RAAG10 se asocia a varios tipos de cáncer humano de diferentes tejidos, incluyendo pero sin limitarse a, colon, pulmón, mama, próstata, ovario, páncreas, riñón, así como otros tipos de cáncer tal como el sarcoma. En los ejemplos 6 y 7 se da una descripción más detallada de RAAG10.

VI. Procedimientos de diagnóstico de cáncer utilizando anticuerpos anti-RAAG10

Los anticuerpos monoclonales contra RAAG10 preparados por los procedimientos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para identificar la presencia o ausencia de células cancerosas en varios tejidos, incluyendo pero sin limitarse a, ovario, mama, pulmón, próstata, colon, riñón, páncreas, piel, tiroides, cerebro, corazón, hígado, estómago, nervios, vasos sanguíneos, huesos y del aparato digestivo superior, para diagnóstico. Los anticuerpos monoclonales contra RAAG10 realizados por los métodos descritos en la presente memoria también se puede utilizar para identificar la presencia o ausencia de células cancerosas, o el nivel de los mismos, que están circulando en la sangre después de su liberación de un tumor sólido. Dichos antígenos circulantes puede ser un antígeno RAAG10 intacto, o un fragmento del mismo que conserva la capacidad de ser detectado de acuerdo a los procedimientos dados a conocer en la presente memoria. Dicha detección se puede efectuar por análisis FACS utilizando los procedimientos habituales comunmente utilizados en la técnica.

Estas utilizaciones pueden incluir la formación de un complejo entre RAAG10 y un anticuerpo que se une específicamente a RAAG10. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen pero no se limitan a los anti-RAAG10 anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas depositado en la ATCC con las denominaciones PTA-4217, PTA-4218, PTA-4244, y el PTA-4245. La formación de dicho complejo puede ser *in vitro* o *in vivo*. Sin estar vinculado a la teoría, el anticuerpo monoclonal anti-RAAG10 puede unirse a RAAG10 a través del dominio extracelular de RAAG10 y luego puede ser interiorizarse.

En una forma de realización preferida de los procedimientos de diagnóstico de la presente invención, el anticuerpo lleva un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores que se pueden utilizar incluyen un agente radioactivo o un fluoróforo, como fluoroisotiocianato o ficoeritrina.

Al igual que con otros anticuerpos conocidos utilizados comercialmente con finalidad de diagnóstico y terapéutica, el antígeno objetivo de la presente invención está ampliamente expresado en el tejido normal. También

está aumentado en algunos tumores. Por lo tanto, las dosis específicas y las rutas de suministro de los anticuerpos de la invención tal como se utiliza para los agentes de diagnóstico o terapéuticos se adaptarán al tumor específico o al estado de la enfermedad en cuestión, así como al sujeto que se está tratando.

5 Un método de utilizar los anticuerpos para el diagnóstico es la detección por la imagen del tumor *in vivo* fijando el anticuerpo a un agente radioactivo o radioopaco, administrando el anticuerpo al sujeto y utilizando una radiografía o una máquina de diagnóstico por la imagen para observar la localización del anticuerpo marcado en la superficie de las células cancerosas que expresan el antígeno. El anticuerpo se administra a una concentración que favorece la unión en condiciones fisiológicas.

10 Las técnicas para la detección *in vitro* de RAAG10 son rutinarias en la técnica e incluyen ensayos de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, inmunoanálisis enzimático (EIA), radioinmunoanálisis (RIA) y análisis de inmunotransferencia Western.

15 En aspectos de la presente invención, los procedimientos de detección por radioimagen de tumores o neoplasias, o de medición de la eficacia de un procedimiento de tratamiento con un anticuerpo marcado radiactivamente, que comprende la etapa de la administración a un sujeto de un anticuerpo específico para el tumor marcado radiactivamente después de la práctica de la presente invención. El anticuerpo marcado radiactivamente puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal que comprende un radiomarcador, preferentemente seleccionado de entre el grupo constituido por tecnecio-99m, indio-111, yodo-131, renio-186, renio-188, samario-153, lutecio-177, cobre-64, escandio-47, Ytrio-90. Resultan especialmente preferidos los anticuerpos monoclonales marcados con radionucleidos terapéuticos tales como yodo-131, renio-188, holmio-166, samario-153 y escandio-47, que no ponen en peligro la inmunorreactividad de los anticuerpos y no se descomponen *in vivo*. El experto en la materia apreciará que se conozcan otros isótopos radiactivos, y puedan ser adecuados para aplicaciones específicas. La detección por radioimagen puede llevarse a cabo utilizando Tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT), Tomografía de emisión de positrones (PET), Tomografía Computarizada (TC) o Detección por la imagen de resonancia magnética (IRM). La Detección por imágenes correlativas, que permite una mayor definición anatómica de la posición de metástasis localizadas por Detección por imagen radioinmunológica, también se contempla.

30 En otros procedimientos, las células cancerosas se retiran y el tejido se prepara para inmunohistoquímica por procedimientos bien conocidos en la materia (p. ej., la incrustación de un compuesto en congelación, congelación y corte, con o sin fijación; la fijación y la incrustación en parafina, con o sin varios métodos de recuperación antigénica y tinción de contraste). Los anticuerpos monoclonales también se pueden utilizar para identificar las células cancerosas en diferentes etapas de desarrollo. Los anticuerpos también se pueden utilizar para determinar qué tumores individuales expresan el antígeno en su superficie a un nivel predeterminado y por tanto son candidatos para la inmunoterapia con anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno. Los anticuerpos pueden reconocer tanto tipos de cáncer primario como en metástasis de ovario, de próstata y páncreas y el cánceres primarios pulmonares que expresan RAAG10. Tal como se utiliza en la presente memoria, puede incluir la detección cualitativa y/o detección cuantitativa y puede incluir comparar el nivel medido a una celda normal para un mayor nivel de expresión de RAAG10 en las células cancerosas.

45 La invención también proporciona procedimientos para ayudar al diagnóstico del cáncer (tal como el de ovario, pulmón, páncreas, próstata, colon o cáncer de mama) en un sujeto con cualquier anticuerpo que se une a RAAG10 y cualquier otro procedimiento que se puede utilizar determinan el nivel de expresión de RAAG10. Tal como se utiliza en la presente memoria, procedimientos para "ayudar al diagnóstico" hace referencia a que estos procedimientos ayudan a hacer una determinación clínica respecto a la clasificación, o naturaleza del cáncer, y pueden o no ser concluyentes con respecto al diagnóstico definitivo. Por consiguiente, un procedimiento de ayuda al diagnóstico de cáncer puede comprender la etapa de detección del antígeno liberado o segregado procedente de células cancerosas vivas o muertas en los fluidos corporales, incluyendo pero no sin limitarse a, sangre, saliva, orina, líquido pulmonar o líquido ascítico.

50 No todas las células en un tumor específico de interés expresarán RAAG10, y las células cancerosas en otros tejidos pueden expresar RAAG10, por lo que en un sujeto debería examinarse la presencia o ausencia de RAAG10 en células cancerosas para determinar la utilidad de la inmunoterapia en el individuo. Los anticuerpos anti-RAAG10 preparados por los procedimientos dados a conocer en la presente memoria pueden utilizarse para determinar si una persona diagnosticada de cáncer puede ser considerada un candidato para la inmunoterapia utilizando anticuerpos dirigidos contra RAAG10. En una forma de realización, en un tumor canceroso o una muestra de biopsia se puede analizar la expresión de RAAG10, utilizando anticuerpos dirigidos contra RAAG10. Los sujetos con células cancerosas que expresan RAAG10 son candidatos adecuados para la inmunoterapia con anticuerpos dirigidos contra RAAG10. La tinción con el anticuerpo anti-RAAG10 puede utilizarse también para distinguir tejidos cancerosos de tejidos normales.

65 Los procedimientos de utilización de anticuerpos anti-RAAG10 para diagnóstico son útiles tanto antes como después de cualquier forma de tratamiento contra el cáncer, p. ej., la quimioterapia o la radioterapia, para determinar qué tumores tienen más probabilidades de responder a un tratamiento dado, el pronóstico para una

persona con cáncer, el subtipo de tumor o el origen de la enfermedad metastásica, y la evolución de la enfermedad o la respuesta al tratamiento.

Las composiciones de la presente invención son también adecuados para el diagnóstico de otras enfermedades aparte del cáncer, utilizando los procedimientos generales descritos anteriormente en la aplicación a otras células enfermas (no cancerosas). Las enfermedades adecuadas para su utilización en los procedimientos de la presente invención comprenden de manera no limitativa las enfermedades o trastornos asociados a respuestas inflamatorias o autoinmunitarias en las personas. Los procedimientos descritos anteriormente se pueden utilizar para modular respuestas inflamatorias o autoinmunitarias en las personas. Las enfermedades y los procesos resultantes de la inflamación y los trastornos autoinmunitarios que pueden someterse a diagnóstico y/o el tratamiento utilizando las composiciones y procedimientos de la invención comprenden de manera ilustrativa y no limitativa, la esclerosis múltiple, meningitis, encefalitis, ictus, otros traumatismos cerebrales, la enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, miastenia grave, lupus, artritis reumatoidea, asma, la diabetes aguda de inicio juvenil, demencia del SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia de miocardio y la lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos.

Sin embargo otras indicaciones de diagnóstico y/o utilización terapéutica de los anticuerpos y otros agentes terapéuticos de la invención incluyen la administración a personas en riesgo de rechazo del órgano o del injerto. En los últimos años se ha producido una considerable mejora en la eficiencia de las técnicas quirúrgicas para el trasplante de tejidos y órganos como la piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Tal vez el problema principal pendiente es la falta satisfactoria de agentes para inducir inmunotolerancia en el receptor al alotrasplante injerto u órgano trasplantado. Cuando se trasplantan células u órganos alogénicos en un hospedador (es decir, el donante y el receptor son personas diferentes de la misma especie), el sistema inmunitario del hospedador es probable que organice una respuesta inmunitaria a antígenos extraños en el trasplante (enfermedad de hospedador contra injerto) que conduce a la destrucción del tejido trasplantado.

VII. Composiciones de la presente invención

La presente invención también comprende composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, de los cuales los anticuerpos anti-RAAG10, polipéptidos derivados de anticuerpos, polinucleótidos que comprende la secuencia de codificación de anticuerpos anti-RAAG10, y otros agentes como se describe en la presente memoria. Tal como se utiliza en la presente memoria, las composiciones adicionales comprenden uno o más anticuerpos, polipéptidos y/o proteínas que se unen a RAAG10, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican una o más anticuerpos, polipéptidos y proteínas que se unen a RAAG10.

Los anticuerpos, agentes, polipéptidos y proteínas de la presente invención se identifican y caracterizan más por cualquiera (uno o más) de los siguientes criterios: (a) capacidad para unirse a RAAG10 (incluyendo RAAG10 en las células cancerosas, incluyendo pero sin limitarse a células de ovario, próstata, páncreas, pulmón, colon, o las células cancerosas de mama), (b) capacidad de inhibir competitivamente la unión preferida de un anticuerpo anti-RAAG10 conocido a RAAG10, incluyendo la capacidad para unir preferentemente al mismo epítipo RAAG10 al que se une preferentemente el anticuerpo original; (c) capacidad de unir una parte de RAAG10 que está expuesta en la superficie de una célula viva *in vitro* o *in vivo*; (d) capacidad para unirse a una parte de RAAG10 que está expuesta en la superficie de las células cancerosas vivas, tales como, pero no limitada a las células cancerosas de ovario, próstata, páncreas, pulmón, colon, o mama; (e) capacidad para suministrar un agente quimioterapéutico o marcador detectable a las células cancerosas (por ejemplo, pero no limitada a las células cancerosas de ovario, próstata, páncreas, pulmón, colon o de mama) que expresan ALCAM; (f) capacidad para administrar un agente terapéutico a las células cancerosas (por ejemplo, pero no limitada a las células cancerosas de ovario) que expresan RAAG10.

En algunas formas de forma de realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo que es producido por una célula hospedadora con un número de depósito de cualquiera de los números ATCC PTA-4217, 4218, 4244 ó 4245, o de la descendencia de los mismos. La presente invención también comprende varias formulaciones de los anticuerpos producidos por estos hibridomas depositados y anticuerpos equivalentes o fragmentos de polipéptido (p. ej., Fab, Fab, F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos híbridos, monocatenario (scFv), los mutantes de los mismos, las proteínas de fusión que comprende una parte de anticuerpos, los anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de cualquiera de estos anticuerpos equivalentes que comprende un antígeno (RAAG10), sitio de reconocimiento de la especificidad requerida. La invención también proporciona anticuerpos humanos que muestra una o más de las características biológicas de un miembro de la familia contra la RAAG10. Los anticuerpos equivalente de la familia de anti-RAAG10 (incluyendo anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos), los fragmentos de un polipéptido, y polipéptidos que comprende cualquiera de estos fragmentos se identifican y se caracteriza por alguno (uno o más) de los cinco criterios descritos anteriormente.

En algunas formas de realización, los anticuerpos, polipéptidos y proteínas de la invención que se unen a RAAG10 son anticuerpos, polipéptidos y proteínas que inhiben competitivamente la unión preferida de un anticuerpo anti-RAAG10 en la presente memoria especificados para RAAG10. En algunas formas de realización,

los anticuerpos, polipéptidos y proteínas se unen preferentemente al mismo epítipo en RAAG10 como uno de los LUCA1 anticuerpos, BLA8, PA20, y SKIN2 preferentemente se une.

5 Por consiguiente, la invención proporciona cualquiera de las siguientes (o composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, de los cuales cualquiera de los siguientes): (a) un anticuerpo producido por la célula hospedadora con un número de depósito identificado anteriormente o su descendencia, (b) una forma humanizada de este anticuerpo, (c) un anticuerpo que comprende uno o más de las regiones variables de cadena ligera y/o cadena pesada de dicho anticuerpo, (d) un anticuerpo híbrido que comprende regiones variables homólogas o derivadas de las regiones variables de un cadena pesada y una cadena ligera de este anticuerpo, y regiones constantes homólogas o derivadas de las regiones constantes de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano; (e) un anticuerpo que comprende uno o más de las RDC de cadena ligera y/o de la cadena pesada (por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de dicho anticuerpo; (f) un anticuerpo que comprende una cadena pesada y/o ligera de dicho anticuerpo, (g) un anticuerpo humano que es equivalente a dicho anticuerpo. Una forma humanizada del anticuerpo puede o no presentar RDC idénticas a la del anticuerpo original, o el anticuerpo producido por una célula hospedadora con un número de depósito identificado anteriormente. La determinación de las regiones RDC resultará evidente para el experto en la materia. En algunas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende por lo menos una RDC que es sustancialmente homóloga a por lo menos un RDC, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos 5 RDC de un anticuerpo producido por uno de los hibridomas depositados identificados anteriormente (o, en algunas formas de realización sustancialmente homóloga a las 6 RDC de uno de estos anticuerpos, o procedente de uno de estos anticuerpos), o el anticuerpo producido por la célula hospedadora con un número de depósito identificado anteriormente. Otras formas de realización incluyen los anticuerpos que tienen por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, o seis RDC que son sustancialmente homólogas a por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o seis RDC de un anticuerpo producido a partir de un hibridoma depositado identificado como en la presente memoria o derivados del mismo tal como un anticuerpo. Se entiende que, para el contexto de la presente invención, especificidad de unión y/o la actividad global (que puede ser en términos del suministro de un agente quimioterapéutico a o en las células cancerosas para reducir el crecimiento y/o la proliferación de células cancerosas, para provocar la muerte celular apoptósica en la célula cancerosa, para retrasar el desarrollo de metástasis, y/o para el tratamiento paliativo) generalmente se mantiene, aunque el grado de actividad puede variar en comparación con un anticuerpo producido por el hibridoma depositado (puede ser mayor o menor). La invención también proporciona procedimientos de preparación de cualquiera de estos anticuerpos. Los procedimientos de preparación de anticuerpos son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria.

35 La invención también proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de la invención. En algunas formas de realización, el polipéptido comprende uno o más de las RDC de la cadena ligera y/o de la cadena pesada del anticuerpo. En algunas formas de realización, el polipéptido comprende uno o más de la cadena ligera y/o RDC de la cadena pesada del anticuerpo. En algunas formas de realización, el polipéptido comprende tres RDC de la cadena ligera y/o de la cadena pesada del anticuerpo. En algunas formas de realización, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos del anticuerpo que tiene alguna de las siguientes: por lo menos 5 aminoácidos contiguos de una secuencia del anticuerpo original, por lo menos 8 aminoácidos contiguos, por lo menos unos 10 aminoácidos contiguos, por lo menos alrededor de 15 aminoácidos contiguos, por lo menos alrededor de 20 aminoácidos contiguos, por lo menos alrededor de 25 aminoácidos contiguos, por lo menos alrededor de 30 aminoácidos contiguos, en el que por lo menos 3 de los aminoácidos son de una región variable del anticuerpo. En una forma de realización, la región variable es de una cadena ligera del anticuerpo original. En otra forma de realización, la región variable es de una cadena pesada del anticuerpo. En otra forma de realización, los 5 (o más) aminoácidos contiguos están en una región determinante de la complementariedad (RDC) del anticuerpo.

50 VIII. Procedimientos de utilización de anticuerpos anti-RAAG10 con fines terapéuticos

Los anticuerpos monoclonales contra RAAG10 puede utilizarse con fines terapéuticos en personas con cáncer u otras enfermedades. La terapia con anticuerpos anti-RAAG10 puede implicar la formación de complejos, tanto *in vitro* como *in vivo* como se describe anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo monoclonal anti-RAAG10 puede unir a reducir y la proliferación de células cancerosas. Debe apreciarse que el anticuerpo se administra a una concentración que favorece la unión en condiciones fisiológicas (p. ej., *in vivo*). En otra forma de realización, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales contra RAAG10 para la inmunoterapia dirigida a las células cancerosas de diferentes tejidos como el de colon, pulmón, mama, próstata, ovario, páncreas, riñón y otros tipos de cáncer tal como el sarcoma. En otra forma de realización, el anticuerpo monoclonal anti-RAAG10 solo puede unirse a células cancerosas e inducir la muerte celular por apoptosis en éstas. En otra forma de realización, el anticuerpo monoclonal anti-RAAG10 puede unirse a células cancerosas y retrasar el desarrollo de metástasis. Todavía en otra forma de realización, se administra un tratamiento paliativo a una persona con cáncer con anticuerpos anti-RAAG10. El tratamiento paliativo de una persona con cáncer implica tratar el cáncer o disminuir los síntomas adversos de la enfermedad, síntomas iatrógenos resultantes de otros tratamientos dados para la enfermedad sin afectar directamente a la evolución del cáncer. Esto incluye los tratamientos para el alivio del dolor, apoyo nutricional, problemas sexuales, tensión psicológica, depresión, fatiga, trastornos psiquiátricos, náuseas, vómitos, etc.

En dichas situaciones, el anticuerpo anti-RAAG 10 puede administrarse junto con agentes que mejoran o dirigen una respuesta inmunitaria propia de la persona, tales como un agente que refuerza ADCC.

5 Todavía en otra forma de realización, el anticuerpo anti-RAAG10 se conjuga a o se asocia con una molécula radiactiva, una toxina (por ejemplo, caliqueamicina), molécula quimioterapéutica, liposomas u otras vesículas que contienen otros compuestos quimioterapéuticos y se administra a una persona necesitada de dicho tratamiento para dirigir estos compuestos a las células cancerosas que contienen el antígeno reconocido por el anticuerpo y por lo tanto eliminan las células cancerosas o enfermas. Sin limitarse a ninguna teoría en particular, el anticuerpo anti-RAAG10 es interiorizado por la célula que lleva RAAG10 en su superficie, suministrando de este modo el resto conjugado a la célula para provocar el efecto terapéutico. Todavía en otra forma de realización, el anticuerpo puede emplearse como terapia adyuvante en el momento de la extirpación quirúrgica de un cáncer que expresa el antígeno a fin de retrasar el desarrollo de la metástasis. El anticuerpo también puede administrarse antes de la intervención quirúrgica (terapia neoadyuvante) en un sujeto con un tumor que expresa el antígeno a fin de disminuir el tamaño del tumor y por lo tanto permiten o simplifican la intervención quirúrgica, el tejido de repuesto durante la intervención quirúrgica, y/o disminuyen la desfiguración resultante.

10 Los agentes quimioterapéuticos incluyen moléculas radiactivas, toxinas, también conocida como citotoxinas o agentes citotóxicos, que incluyen cualquier agente que es perjudicial para la viabilidad de las células cancerosas, los agentes y los liposomas u otras vesículas que contienen otros compuestos quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a: 1-deshidrotestosterona, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleucina, agentes alquilantes, alopurinol sodio, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina,(AMC)), agentes antimetabólicos, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), diamino dicloro platino, antraciclinas, antibióticos, antimetabolitos, asparaginasa, BCG vivo (intravesical), betametasona fosfato de sodio y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfán, leucovorin calcio, caliqueamicina, capecitabina, carboplatino, lomustina (CCNU), carmustina (BSNU), clorambucil, cisplatino, cladribina, colquiicina, estrógenos conjugados, ciclofosfamida, ciclotosfamida, citarabina, citocalasina B, Cytosan, Dacarbazina, dactinomicina, dactinomicina (antes actinomicina), daunirrubina HCL, citrato de daunorubicin, denileucina difitox, Dexrazoxano, Dibromomannitol, dihidroxi antracina diona, Docetaxel, mesilato de dolasetrón, doxorubicina HCL, dronabinol, E. coli L-asparaginasa, emetina , epoetina alfa, Erwinia L-asparaginasa, estrógenos esterificados, estradiol, estramustina fosfato sódico, bromuro de etidio, etinil estradiol, etidronato, factor de etopósido citrororum, fosfato de etopósido, filgrastim, floxuridina, fosfato fluconazol, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, gemcitabina HCL, glucocorticoides, acetato de goserelina, gramicidina D, granisetron HCL, hidroxurea, idarrubicina HCL, ifosfamida, interferón alfa-2b, irinotecán HCL, letrozol, leucovorina calcio, acetato de leuprolida, levamisol HCL, lidocaína, lomustina, maytansinoid, mecloretamina HCL, acetato de medroxiprogesterona , acetato de megestrol, melfalán HCL, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metiltestosterona, mitramicina mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, acetato de octreotida, ondansetrón HCL, paclitaxel, pamidronato disódico, pentostatina, pilocarpina HCL, plimycin, polifeprosán 20 con implante de carmustina, porfímero sódico, procaína, procarbazona HCL, propranolol, rituximab, sargramostim, estreptozotocina, tamoxifeno, el taxol, tenipósido, tenopósido, testolactona, tetracaína, thioepa clorambucil, tioguanina, tiotepa, topotecan HCL, citrato de toremifeno, trastuzumab, tretinoína, valrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina y tartrato de vinorelbina.

15 En una forma de realización preferida, la citotoxina es especialmente eficaz en células de división o de división rápida, de modo que las células no se dividen están relativamente a salvo de los efectos tóxicos.

20 Los anticuerpos de la invención pueden interiorizarse dentro de de células enfermas o con carcinoma que se unen y son particularmente útiles para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, el suministro de las toxinas en las células que necesitan ser interiorizadas por su actividad adversa. Los ejemplos de dichas toxinas comprenden de manera no limitativa saporina, caliqueamicina, auristatina y maytansinoid.

25 Los anticuerpos o polipéptidos de la invención pueden estar asociados (incluyendo conjugados o unidos) a una molécula radioactiva, a una toxina, o a otros agentes terapéuticos, o liposomas o vesículas que contienen otros agentes terapéuticos por enlace covalente o no covalente, directa o indirectamente. El anticuerpo puede estar unido a la molécula radiactiva, la toxina, o la molécula quimioterapéutica en cualquier posición a lo largo del anticuerpo, siempre y cuando el anticuerpo sea capaz de fijar a su RAAG10 diana.

30 Una toxina o un agente quimioterapéutico se puede acoplar (por ejemplo, por enlace covalente) a un anticuerpo monoclonal adecuado, ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, mediante un grupo enlazador, o, alternativamente, mediante una molécula de enlace con sitios de enlace adecuados, como una molécula de plataforma como se describe en la patente US nº 5.552.391). La toxina y el agente quimioterapéutico de la presente invención se pueden acoplar directamente a las proteínas específicas dirigidas utilizando procedimientos conocidos en la materia. Por ejemplo, es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituto capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un grupo saliente adecuado (p. ej., un haluro) en el otro.

Los anticuerpos o polipéptidos también pueden unirse a un agente quimioterapéutico mediante un microportador. Microportador se refiere a una partícula biodegradable o no biodegradable que es insoluble en agua y que tiene un tamaño inferior a aproximadamente 150, 120 o 100 μm , con mayor frecuencia inferior a 50-60 μm , preferentemente inferior a 10, 5, 2,5, 2 ó 1,5 μm . Los microportadores incluyen "nanotransportadores", que son microportadores que tienen un tamaño inferior a aproximadamente 1 μm , preferentemente inferior a 500 nm. Dichas partículas son conocidas en la técnica. Microportadores en fase sólida pueden ser partículas formadas a partir de polímeros naturales biocompatibles, polímeros sintéticos o copolímeros sintéticos, que pueden incluir o excluir microportadores formados por agarosa o agarosa reticulada, así como otros materiales biodegradables conocidos en la materia. Se pueden formar microportadores biodegradables en fase sólida a partir de polímeros que son degradables (p. ej., poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y copolímeros de los mismos) o erosionables (p. ej., poli(ortoésteres tales como 3,9-dietiliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano (DETOSU) o poli(anhídridos), tales como poli(anhídridos) de ácido sebácico) bajo condiciones fisiológicas de mamíferos. También pueden ser microportadores en fase líquida (p. ej. a base de aceite o lípidos), como liposomas, *iscoms* (complejos inmunoestimulantes, que son complejos estables de colesterol, fosfolípidos y, saponina activa por adyuvante) sin antígeno, o gotitas o micelas que se encuentran en emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, siempre y cuando los microportadores en fase líquida sean biodegradables. Los microportadores biodegradables en fase líquida suelen incorporar un aceite biodegradable, algunos de los cuales se conocen en esta materia, incluidos los aceites vegetales y el escualeno. Los microportadores suelen ser de forma esférica, pero los microportadores que se desvían de la forma esférica también son aceptables (por ejemplo, elipsoide, en forma de varilla, etc.) Debido a su naturaleza insolubles (con respecto al agua), los microportadores se pueden filtrar en agua y en soluciones (acuosas) a base de agua.

Los conjugados de anticuerpos o polipéptidos de la invención puede incluir un enlazador bifuncional que contiene un grupo que puede acoplarse a un agente tóxico o un agente quimioterapéutico y un grupo que puede acoplarse al anticuerpo. Un enlazador puede funcionar como un separador para distanciar un anticuerpos de un agente a fin de evitar interferencias con las funciones de enlace. Un enlazador puede ser escindible o no. Un enlazador también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente, un agente o un anticuerpo, y por lo tanto aumentar la eficiencia de acoplamiento. Un aumento en la reactividad química también puede facilitar la utilización de agentes o grupos funcionales en los agentes, que de otro modo no sería posible. El enlazador bifuncional puede acoplarse al anticuerpo por medios que se conocen en la técnica. Por ejemplo, un enlazador que contiene un resto de éster activo, como un éster de N-hidroxisuccinimida, puede utilizarse para el acoplamiento de los restos de lisina en el anticuerpo mediante un enlace amida. En otro ejemplo, un enlazador que contiene una amina nucleófila o restos de hidrazina se puede acoplar a grupos aldehído producidos por oxidación glucolítica de restos carbohidrato de anticuerpos. Además de estos procedimientos directos de acoplamiento, el fijador puede estar indirectamente acoplado al anticuerpo por medio de un soporte intermedio como un aminodextrano. En estas formas de realización el enlace se modifica mediante lisina, hidratos de carbono, o un vehículo intermedio. En una forma de realización, el enlazador se acopla selectivamente al sitio para liberar los restos tiol libre en la proteína. Los restos que son adecuados para el acoplamiento selectivo a grupos tiol en las proteínas son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen compuestos de disulfuro, compuestos de α -halocarbonilo y α -halocarboxilo y maleimidias. Cuando una función amina nucleófila está presente en la misma molécula como un grupo α - halocarbonilo o carboxilo existe la posibilidad de que la ciclación se produzca por alquilación intramolecular de la amina. Los procedimientos para evitar este problema son bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, por preparación de moléculas en las que las funciones amina y α -halo se separan por grupos inflexibles, tales como los grupos arilo o trans-alquenos, que hacen que la ciclación no deseado resulte desfavorecida estereoquímicamente. Véase, por ejemplo, la patente US nº 6.441.163 para la preparación de conjugados de maytansinoides y anticuerpos mediante un resto de disulfuro.

Uno de los enlazadores escindibles que pueden utilizarse para la preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco es un enlazador de ácido-lábil a base de ácido cis-aconítico que aprovecha el medio ácido de diferentes compartimentos intracelulares tales como los endosomas encontrados durante la endocitosis mediada por receptores y los lisosomas. Véase, por ejemplo, Shen *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:1048-1054 (1981) para la preparación de conjugados de daunorrubicina con portadores macromoleculares; Yang *et al.*, *J. Natl. Canc. Inst.* 80:1154-1159 (1988) para la preparación de los conjugados de daunorrubicina para un anticuerpo contra el melanoma, Dillman *et al.*, *Cancer Res.* 48:6097-6102 (1988) para la utilización de un enlazador ácido-lábil de modo similar para preparar conjugados de daunorrubicina con un anticuerpo anti-linfocito T; Trouet *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 626-629 (1982) para enlazar la daunorrubicina a un anticuerpo mediante un brazo espaciador de péptido.

Un anticuerpo (o polipéptido) de la presente invención puede conjugarse (unirse) a una molécula radiactiva por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Para una exposición de los procedimientos de radiomarcaje de anticuerpos véase "CancerTherapy with Monoclonal Antibodies T", D.M. Goldenberg ed. (CRC Press, Boca Raton, 1995).

Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado según lo descrito por Segal en la patente US nº 4.676.980. La formación de anticuerpos

reticulados puede dirigir el sistema inmunitario a tipos específicos de células, por ejemplo, células cancerosas o enfermas que expresan RAAG10.

5 La presente invención también proporciona procedimientos para retrasar el desarrollo de la metástasis en un sujeto con cáncer (incluyendo, pero sin limitarse a, próstata, pulmón, mama, ovario, páncreas o colon) utilizando un anticuerpo anti-RAAG10 o de otras formas de realización que se une a RAAG10 unido a un agente quimioterapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo es una forma humanizada o híbrida de un anticuerpo anti-RAAG10 no humano.

10 En otra forma de realización aún, el anticuerpo puede ser utilizado como terapia adyuvante en el momento de la extirpación quirúrgica de un cáncer que expresa el antígeno a fin de retrasar el desarrollo de la metástasis. El anticuerpo o anticuerpo asociado a un agente quimioterapéutico también puede administrarse antes de la intervención quirúrgica (terapia neoadyuvante) a un sujeto con un tumor que expresa el antígeno a fin de disminuir el tamaño del tumor y por lo tanto permiten o simplificar la intervención quirúrgica, el tejido de reserva durante la intervención quirúrgica, y/o disminuir la desfiguración resultante.

15 Todavía en otra forma de realización, cualquiera de las formas de realización de unión a RAAG10 descritas en la presente memoria se puede unir a las células cancerosas que expresan RAAG10 y provoca una respuesta inmunitaria activa contra las células cancerosas que expresan RAAG10. En algunos casos, la respuesta inmunitaria activa puede causar la muerte de las células cancerosas (p. ej., la unión del anticuerpo a las células cancerosas que provocan la muerte celular por apoptosis) o inhibir el crecimiento (por ejemplo, bloquear la evolución del ciclo de las células) de las células cancerosas. En otros casos, alguno de los anticuerpos nuevos descritos en la presente memoria pueden unirse a las células cancerosas y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) puede eliminar las células cancerosas a las que se une anti-RAAG 10. Por consiguiente, la invención proporciona procedimientos para estimular una respuesta inmunitaria que comprende la administración de cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria.

20 En algunos casos, la unión del anticuerpo también puede activar la respuesta inmunitaria celular y humoral y regenerar más células destructoras naturales o aumento de la producción de citocinas (por ejemplo, IL-2, IFN- γ , IL-12, FNT- α , FNT- β , etc.) que activan más el sistema inmunitario de un sujeto para destruir las células cancerosas. En otra forma de realización, mKID2 pueden unirse a las células cancerosas, y los macrófagos o células fagocitarias u otras pueden opsonizar las células cancerosas.

25 Para la administración se pueden utilizar varias formulaciones de anticuerpos anti-RAAG10 o sus fragmentos. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-RAAG10 o fragmentos de los mismos se pueden administrar puros. Además del agente farmacológicamente activo, las composiciones de la invención pueden contener vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes que son bien conocidos en la técnica y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz o que facilitan el tratamiento de los compuestos activos en las preparaciones que se pueden utilizarse farmacéuticamente para su administración al sitio de acción. Por ejemplo, un excipiente puede proporcionar forma o consistencia, o actuar como diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a agentes estabilizantes, humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes de encapsulación, tampones, y potenciadores de penetración en la piel.

30 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, por ejemplo, las sales solubles en agua. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos, apropiadas para suspensión aceitosas inyectables. Los disolventes o vehículos lipófilos incluyen los aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones acuosas inyectables pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. También se pueden utilizar liposomas para encapsular el agente para la administración a la célula.

35 La formulación farmacéutica para la administración generalizada según la invención pueden formularse para la administración enteral, parenteral o tópica. De hecho, se pueden utilizar simultáneamente los tres tipos de formulación para lograr una administración generalizada del ingrediente activo. Los excipientes, así como fórmulas para administración de fármacos por vía parenteral y no parenteral se indican en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a ed. Mack Publishing (2000).

40 Las formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen cápsulas duras o blandas de gelatina, píldoras, comprimidos, incluyendo comprimidos recubiertos, elixires, suspensiones, jarabes o inhalaciones y las formas de liberación controlada de los mismos.

45 Generalmente, estos agentes se formulan para la administración por inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.), aunque otras formas de administración (por ejemplo, bucal, por las mucosas, etc) también pueden utilizarse. Por consiguiente, los anticuerpos anti-RAAG10 se combinan

preferentemente con vehículos farmacéuticamente aceptables, tal como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares.

El régimen específico de dosificación, es decir, dosis, tiempo y repetición, dependerá de la persona en concreto y de los antecedentes personales patológicos del sujeto. Generalmente, se administra una dosis de por lo menos unos 100 µg/kg de peso corporal, preferentemente por lo menos unos 250 µg/kg de peso corporal, aún más preferentemente por lo menos unos 750 µg/kg de peso corporal, aún más preferentemente por lo menos 3 mg/kg peso corporal, aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal.

Consideraciones prácticas, tal como la vida media, generalmente contribuirán a la determinación de la dosis. Los anticuerpos, que son compatibles con el sistema inmunitario humano, tales como los anticuerpos humanizados o los anticuerpos totalmente humanos, pueden utilizarse para prolongar la vida media de los anticuerpos y para evitar que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmunitario del hospedador. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse en el transcurso de la terapia, y se basa en reducir el número de células cancerosas, mantener la reducción de las células cancerosas, reducir la proliferación de células cancerosas o retrasar el desarrollo de metástasis. Alternativamente, formulaciones de liberación continua mantenida de anticuerpos anti-RAAG 10 pueden ser apropiadas. Varias formulaciones y dispositivos para conseguir la liberación sostenida son conocidos en la técnica.

En una forma de realización, las dosis de anticuerpos anti-RAAG10 se puede determinar empíricamente en los sujetos que han recibido uno o más de administraciones. Se administran a los sujetos dosis crecientes de un anticuerpo anti-RAAG10. Para evaluar la eficacia de los anticuerpos anti-RAAG10, un marcador del proceso canceroso específico se puede seguir. Estos incluyen mediciones directas del tamaño del tumor por palpación u observación visual, medición indirecta del tamaño del tumor por rayos X u otras técnicas de detección por la imagen; una mejora evaluada por biopsia del tumor directa y examen microscópico de la muestra del tumor, medición de un marcador tumoral indirecto (p. ej., PSA para el cáncer de próstata), una disminución del dolor o la parálisis, la mejora del habla, la visión, la respiración u otra discapacidad asociada al tumor; aumento del apetito, o un aumento en la calidad de vida medida mediante pruebas aceptadas o la prolongación de la supervivencia. Para un experto en la materia resulta evidente que la dosis puede variar dependiendo del sujeto, el tipo de cáncer, la etapa del cáncer, si el cáncer ha comenzado a metastatizar a otra posición en el sujeto, y los tratamientos pasados y simultáneos que se utilizan.

Otras formulaciones incluyen formas de suministro adecuadas conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, vehículos tales como liposomas. Véase, por ejemplo, Mahato *et al.* (1997) *Pharm. Res.* 14: 853-859. Las preparaciones de liposomas comprenden de manera no limitativa citofectinas, vesículas multilaminares y vesículas unilaminares.

En algunas formas de realización, puede estar presente más de un anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Dichas composiciones pueden contener por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco anticuerpos diferentes que reaccionan contra los carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, o adenosarcomas. El anticuerpo anti-RAAG10 se puede mezclar con uno o más reactivos anticuerpos contra carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, o adenosarcomas en los órganos, incluyendo pero no sin limitarse a ovario, mama, pulmón, próstata, colon, riñón, piel, tiroides, hueso, aparato digestivo superior y páncreas. En una forma de realización, se utiliza una mezcla de diferentes anticuerpos anti-RAAG10. Una mezcla de anticuerpos, como a menudo se indican en la técnica, puede ser particularmente útil en el tratamiento de un espectro más amplio de la población de sujetos.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de células humanas de vejiga fetal y de células pancreáticas (hPED) como inmunógenos

Para preparar células de vejiga fetal para su utilización como inmunógeno, se utilizaron los procedimientos siguientes. Se obtuvieron vejigas fetales humanas de 14 a 21 semanas de edad de gestación de Advanced Bioscience Research en Alameda County, California. Se adquirieron vejigas y se enviaron al laboratorio en un medio de cultivo tisular en hielo húmedo. Nada más llegar, las vejigas se lavaron tres veces con 20 ml de PBS frío. Al microscopio de disección, se limpiaron las vejigas de los tejidos sobrantes alrededor de la vejiga, y se lavaron dos veces más con PBS frío. Las vejigas se picaron en cubos de 1 mm con una cuchilla de afeitar en un plato de cultivo seco de 100 mm. Se añadieron 10 ml de medio Opti-MEM (nº de cat. 22.600 de Gibco BRL). Las piezas de tejido se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml con una pipeta de 5 ml, que fue recubierta previamente con BSA al 5% en PBS. Las piezas de tejido se centrifugaron a continuación a 1.000 x g durante 5 minutos. El sedimento se volvió a poner en suspensión en 6 ml de medio Opti-MEM. El tejido se cultivó en una placa de 6 pocillos con 3 ml de medio Opti-MEM por pocillo, que contenía los siguientes factores de crecimiento (concentración final en cada mililitro del medio): 10 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml de vitamina

E, 25 µg/ml de aprotinina, 3 ng/ml de progesterona, 10 ng/ml de KGF, Heregulin 5 nM, 100 µg/ml de gentamicina (añadido en los dos primeros días de cultivo celular). En estas condiciones las células epiteliales emigraban para formar colonias de células epiteliales. Se observó crecimiento limitado de las células de fibroblastos en el cultivo inicial, pero estas células se eliminaron por tripsinización breve. Se añadió Tripsina (nº Cat.25300-054 de GIBCO BRL) a una concentración final de 0,05% para deshacerse de las células de fibroblastos tres días antes de la inyección.

En otras formas de realización, la fuente de tejidos es una estirpe de células madre humanas procedente del tejido fetal humano, expandida y recombinada con mesénquima de rata o ratón seleccionada para estimular la diferenciación y maduración de las células madre a uno o más tipos de células maduras humanas para formar un tejido humano/de roedor recombinante. Por ejemplo, recombinantes de tejidos pueden ser las células madre pancreáticas humanas (hPED) aisladas y cultivadas como se describe en la patente US nº 6.436.704, las células madre de Müller humanas aisladas y cultivadas según se describe en la patente US nº 6.416.999, las células madre de ovario aisladas y cultivadas como se describe en el documento WO 01/77303 o células madre de la vejiga humana (hBLA) como se describe en la solicitud de patente pendiente PCT/US03/04547, cuyas enseñanzas están específicamente incorporadas como referencia a la presente memoria.

Para recolectar las células, se lavaron las células una vez con solución salina de Hanks exenta de calcio y magnesio, se incubaron en 0,02% de EDTA en solución salina de Hanks a 37°C durante 15 minutos. Las células se despegaron de la superficie de cultivo mediante suaves golpecitos. La suspensión celular se precipitó por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y las células se volvieron a poner en suspensión en un medio exento de suero (Opti-MEM) que contenía adyuvante adecuado no desnaturizante.

Para preparar las células madre pancreáticas para su utilización como inmunógeno, se utilizaron los siguientes procedimientos. Estos procedimientos se describen en las patentes US nº 6.436.704, mencionada anteriormente. Se retiró mecánicamente el páncreas fetal (14-22 semanas de edad de gestación) por microdissección a un microscopio estereoscópico antes de la disociación enzimática. El tratamiento enzimático consistió en colocar el tejido parcialmente disociado en 1 ml de medio F12/DMEM que contiene 5 mg/ml de colagenasa-dispasa, 20 µg/ml de inhibidor de tripsina de soja y 50 g/ml de ADNasa durante 15 minutos a 37 grados centígrados.

Se dispusieron en capas agregados celulares en la parte superior de un gradiente de BSA al 5% (en volumen) y se lavaron por centrifugación durante 6 minutos a 900 rpm. Las células sedimentadas que se encontraban todavía en forma agregada se volvieron a poner en suspensión en medio de cultivo consistente en medio nutriente CMRL 1066 que contiene los factores siguientes:

Insulina	10 µg/ml
Transferrina	10 µg/ml
Factor de crecimiento epidérmico	5 ng/ml
Etanolamina	10 ⁻⁶ M
Fosfoetanolamina	10 ⁻⁶ M
Selenio	2,5 x 10 ⁻⁸ M
Triyodotironina	10 ⁻¹² M
Progesterona	10 ⁻⁹ M
Hidrocortisona	10 ⁻⁹ M

(continuación)

Forskolina	1 µM
Heregulin	10 nM
Aprotinina	25 µg/ml
Extracto hipofisario bovino	75 µg/ml
Gentamicina	100 µg/ml

Se colocaron alícuotas de agregados de células resuspendidas en pocillos recubiertos de fibronectina (6 a 12) de una placa de 24 pocillos y se incubaron a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂ humidificado durante 72 horas. Después de 72 horas, las células epiteliales forman estructuras esféricas en suspensión y las células mesenquimáticas o del estroma se pegan a la superficie del pocillo. Las células se subcultivaron a una distribución 1:2 cada 4 días en medio F12/DMEM (50:50) con 1,2 g/l de bicarbonato y Hepes 10 mM de tampón enriquecido con

las hormonas mostrado anteriormente y colocado en placas recubiertas de fibronectina (12 pocillos, después 6 pocillos, luego placas de 60 mm, a continuación placas 100 mm a medida que crece la población).

Se utilizaron varios otros tipos de células como inmunógenos en la práctica de la presente invención, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, para generar y descubrir los nuevos anticuerpos monoclonales anti-RAAG10 de la presente invención.

EJEMPLO 2. Generación de anticuerpos monoclonales

Se utilizaron células de vejiga fetal humana (BFH) entre 11 y 16 días de cultivo para generar anticuerpos monoclonales. Se utilizaron células madre pancreáticas humanas (hPED) para inyectables como inmunógeno e identificación de anticuerpos en gran medida entre los pasos 3 y 5. Se inyectaron aproximadamente 10^6 BFH o células madre pancreáticas humanas por ratón en ratones Balb/c en la almohadilla del pie, una vez a la semana. Se utilizaron adyuvantes no desnaturalizantes (p. ej., Ribi). Después de 6 semanas de inyección semanal, se vertió una gota de sangre de la cola de cada animal inmunizado para probar el valor de los anticuerpos contra BFH utilizando análisis FACS. Cuando el valor alcanzó como mínimo 1:2000, se sacrificaron los ratones en una cámara de CO₂ seguido de dislocación cervical. Se recolectaron ganglios linfáticos para la preparación del hibridoma.

Los linfocitos de ratones con el valor más alto se fusionaron con la estirpe X63-Ag8.653 de mieloma de ratón utilizando polietilenglicol 4000 al 35%. El día 10 después de la fusión, en los sobrenadantes de hibridoma se identificó la presencia de BFH o anticuerpos monoclonales específicos para células madre pancreáticas humanas por clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS). Un medio acondicionado de cada hibridoma se incubó durante 30 minutos con una alícuota de linfocitos BFH o células madre pancreáticas humanas. Tras la incubación, se lavaron las muestras de células, se volvieron a poner en suspensión en 0,1 ml de diluyente y se incubaron con 1 µg/ml de fragmento F(ab')₂ conjugado con FITC de anti-IgG de ratón en cabra durante 30 min a 4°C. Se lavaron las células, se volvieron a poner en suspensión en 0,5 ml de diluyente FACS y se analizaron utilizando un clasificador de células FACScan (Becton Dickinson; San José, CA). Se seleccionaron clones de hibridoma para expansión, clonación y caracterización posterior basándose en su unión a la superficie de los linfocitos BFH o a las células madre pancreáticas humanas evaluadas por FACS. Cien clones de hibridoma se encontraron positivos en esta primera identificación.

Los hibridomas positivos se identificaron más por su reacción a secciones normales de tejido. Se recolectaron clones negativos de hibridoma en las sesiones de tejido de riñón, pulmón y piel. Se seleccionaron estos hibridomas construyendo los anticuerpos de la anti-familia RAAG10 denominados anticuerpos monoclonales.

EJEMPLO 3. Purificación de anticuerpos monoclonales de la anti-familia RAAG10

Anticuerpos de la anti-familia RAAG10, se midió el volumen de sobrenadante y un volumen igual de tampón de fijación se añadió al sobrenadante. La mezcla se dejó equilibrar a temperatura ambiente. El sobrenadante se clarificó por paso a través de un filtro de 0,22 µm. El sobrenadante se cargó en una columna con proteína G utilizando un sistema GradiFrac. Se lavó la columna con 5 a 10 volúmenes de columna de tampón de fijación. Los anticuerpos monoclonales se eluyeron con el tampón de elución y se recogieron fracciones de 2 ml. Se obtuvo una lectura a D.O.₂₈₀ de las fracciones y se mezclaron las fracciones que contenían anticuerpos monoclonales. Las fracciones eluidas de anticuerpo monoclonal se neutralizaron añadiendo 1/20 volumen de Tris 3M. Se dializó la muestra en 1 x PBS a 4°C (con 3 cambios de tampón de por lo menos 3 horas por cambio). Los anticuerpos monoclonales purificados se filtraron estériles (0,2 µM) y se guardaron entre 2 y 8°C.

Después de la purificación de los anticuerpos monoclonales de anti-familia RAAG10 procedente del sobrenadante del hibridoma, se volvió a ensayar la unión a los linfocitos BFH o hPED. Se prepararon muestras de células tal como se describió anteriormente en el Ejemplo 4 y se incubaron con el anticuerpo purificado a varias concentraciones. Tras la incubación se lavaron las células, se volvieron a poner en suspensión en 0,1 ml de diluyente y se incubaron con 1 µg de fragmento F(ab')₂ conjugado con FITC de anti-IgG de ratón en cabra durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron, se volvieron a poner en suspensión en 0,5 ml de diluyente FACS y se analizaron utilizando un clasificador de células FACScan (Becton Dickinson; San José, CA). Un desplazamiento a la derecha en el histograma del FACScan indicaba que el anticuerpo purificado estaba todavía unido a los linfocitos BFH o hPED.

Se purificaron cuatro anticuerpos monoclonales como se menciona en la presente memoria como BLA8, LUCA1, PA20 y SKIN2. Los hibridomas que producen estos anticuerpos respectivos tienen la denominación del ATCC de PTA-4218, PTA-4217, PTA-4244 y PTA-4245, respectivamente. Se purificaron a continuación cinco anticuerpos monoclonales adicionales, denominados en la presente memoria LUCA1, GB8, KID1, KID13 y OVCA22.

EJEMPLO 4. Identificación y caracterización del antígeno al que se unen anticuerpos de la anti-familia RAAG10

Anticuerpo BLA8: Para identificar al antígeno al que era reactivo BLA8, se realizó un experimento de

5 inmunoprecipitación. Para la inmunoprecipitación, se lisaron 10 ml de concentrado de células LnCap con 40 ml de tampón de lisis. El tampón de lisis consistía en una solución salina equilibrada de Hanks (HBSS+) enriquecida con Triton X-100 al 2%, mezcla de inhibidor de proteasa (1 comprimido por cada 5 ml de tampón de lisis de mezcla de proteasa exenta de EDTA mini completa de Roche Molecular Biochemicals), azida sódica al 0,1% y PMSF 2 mM. El lisado celular se clarificó a 24.000 x g durante 30 minutos a 4°C antes de pasarse sobre una columna constituida por 2 mg/ml de perlas de sefarosa 6MB CNBr conjugado con IgG de ratón, el lisado se considera entonces preclarificado. El lisado de LnCap preclarificado se pasó a continuación sobre una columna de sefarosa 6MB con CNBr conjugado con BLA8. La columna de BLA8 se conjugó a razón de 3 mg de BLA8 por ml de perlas hinchadas de sefarosa 6MB con CNBr. Las perlas (tanto de IgG de ratón como de BLA8) se lavaron a continuación tres veces con tampón de lisis antes de la elución con glicina 0,1 M, pH 2,5. Se recogieron los eluidos en fracciones de 1 volumen de columna y se neutralizaron con una concentración final de Tris 0,1 M, pH 8, dando como resultado un pH final de ~7,2. Las fracciones neutralizadas se concentraron a continuación hasta 10% de volumen de fracción con microconcentradores (Centricon 10 de Millipore). El 10% del eluido concentrado se resolvió a continuación por SDS-PAGE e inmunotransferencia Western. Al mismo tiempo, el 30% del eluido se concentró más hasta un volumen compatible para SDS-PAGE y se resolvió por tinción de Commassie.

20 Mediante inmunotransferencia Western el BLA8 alquilado y el eluido de IgG de ratón contra BLA8, triplete de proteínas muy glucosiladas exclusivas para el eluido BLA8 (> 223 kDa, ~200 kDa y 100 kDa) se observó, siendo la banda de 100 kDa la más prominente. Debido a la linealidad de las tres bandas (es decir, 200 kDa es doble de 100 kDa, y la banda > 223 kDa puede ser el triple de la banda de 100 kDa), se supuso que las tres bandas estaban constituidas por una forma monomérica, dimérica y trimérica del antígeno BLA8. El efecto de apilamiento del antígeno purificado indica que el antígeno puede dimerizarse bien en estado natural, pero la concentración está forzando artificialmente a las proteínas a interactuar unas con otras a una frecuencia mayor. Mediante la tinción Commassie, se observó que existía un único doblete de BLA8 a 100 kDa y ~ 200 kDa. Una tercera banda tenue se observó a > 223 kDa. Para confirmar la hipótesis de los autores, ambas bandas de 100 kDa y ~200 kDa se cortaron y se marcaron LO (100 kDa) y HI (~ 200 kDa). Estas dos bandas se sometieron a continuación a análisis espectral de masas.

30 Se siguieron procedimientos similares para identificar y caracterizar los antígenos para los que se obtuvieron el enlace LUCA1, PA2O y SKIN2 de anticuerpos monoclonales y resultados similares.

35 Para determinar el peso molecular del antígeno diana para los BLA8, LUCA1, PA20 y SKIN2 de los MAB por análisis de inmunotransferencia Western, se obtuvieron varias estirpes celulares de cáncer humano comercializadas de la American Type Culture Collection tales como Colo 205, HPAF-II, LnCAP, Panc-1, SK-OV-3, SK-MES, SK-OV-3. Estas estirpes celulares se cultivaron en una mezcla 1:1 de medio F12 (GifcoBRL, nº Cat. 21700-091) y medio DMEM (GifcoBRL, nº Cat. 12100-061) que contenía L-glutamina y suero bovino fetal al 10%. Las células se cultivaron hasta confluencia en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Aproximadamente treinta a cincuenta matraces T₁₇₅ confluentes de cada estirpe celular se recolectaron utilizando EDTA 10 mM en solución salina tamponada con fosfato. Las células recolectadas se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm en una centrifuga GS-6KR tabletop de Beckman. Los sobrenadantes se descartaron, y los sedimentos celulares se volvieron a poner en suspensión en 0,5 ml de agua desionizada y 10 µl de mezcla de inhibidor de proteasa por matraz T₁₇₅ (Sigma nº Cat. P8340). Se congelaron las suspensiones celulares a -80°C y se descongelaron a continuación. Este ciclo congelación/descongelación se repitió durante un total de cinco veces para romper las membranas celulares.

50 Las membranas celulares rotas se recogieron a continuación por centrifugación en una microcentrífuga Biofuge (Haereus) a máxima velocidad durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes contenían las proteínas citoplásmicas y nucleares. Se retiraron los sobrenadantes y se conservaron para análisis posterior. Los sedimentos, que contenían los fragmentos de membranas celulares, se volvieron a poner en suspensión y se disolvieron en aproximadamente 4 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBSS, GifcoBRL, nº Cat. 14175-079) que contenía Empigen BB al 2% (Calbiochem, nº Cat. 324690) y 100 µl de la mezcla de inhibidor de proteasa, pH 7,0. Las proteínas solubles de la membrana celular se incubaron en un rotator a 4°C durante la noche.

55 Los extractos de proteínas de la membrana celular se centrifugaron en una microcentrífuga Biofuge a máxima velocidad durante 15 minutos a 4°C para eliminar cualquier residuo celular insoluble. Los sobrenadantes contenían las proteínas extraídas de la membrana celular. Se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C hasta ser utilizados para los análisis de inmunotransferencia Western.

60 Se separaron los extractos de proteínas de la membrana celular por electroforesis utilizando geles profundos NuPAGE del 4 al 12% (Invitrogen, nº Cat. NP0322). Se diluyeron los extractos 10 veces en tampón de la muestra LDS (Invitrogen, nº Cat. NP007) y se calentaron a 70°C durante 10 minutos, a continuación se centrifugaron en una microcentrífugadora y se agitaron para mezclar. Se cargaron un total de 3,0 µl de extracto de proteína por banda en el gel. Se incluyeron también patrones de peso molecular teñidos previamente (BioRad, nº Cat. 161-0372). Se realizó a continuación la electroforesis según las instrucciones del fabricante. Después de la electroforesis, se transfirieron los geles sobre membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, nº Cat. LC2000), también según las instrucciones del fabricante. Las proteínas transferidas se unieron a las membranas calentando la

nitrocelulosa en PBS en un horno microondas durante tres minutos a alta potencia. Las membranas se incubaron a continuación en tampón de bloqueo durante 30 minutos para reducir las uniones no específicas. Se utilizaron a continuación anticuerpos monoclonales con proteína G para sondear las membranas de nitrocelulosa. Se diluyeron BLA8 (lote 080-06), LUCA1 (lote 102-06), PA20 (lote 102-10) y SKIN2 (lote 083-95) de los MAb hasta aproximadamente 4 µg/ml en tampón de bloqueo. Se incubaron las membranas de nitrocelulosa con 8 ml de los MAb diluidos durante una hora a temperatura ambiente en un rocker (agitador por balanceo). Se utilizó un Western Breeze blotting kit (Invitrogen, nº Cat. WB7103) para revelar las inmunotransferencias Western según las instrucciones del fabricante. Se observó una banda de proteína glucosilada de un peso molecular aproximado de 85 a 90 kD para cada uno de los anticuerpos monoclonales que utilizan la metodología anterior. La intensidad y el patrón de unión a varios extractos de proteínas de la membrana celular fue constante entre todos los anticuerpos en esta familia.

Se realizaron además análisis de inmunotransferencia Western utilizando extractos reducidos de las proteínas de la membrana celular y homogeneizados de sección tisular. Se recolectaron en tubos Eppendorf secciones de mama, riñón, pulmón y piel normales congeladas. Las secciones se lavaron con PBS, y las muestras se centrifugaron a 16.000 rpm en una microcentrifugadora Eppendorf a 4°C durante 15 minutos. Los sedimentos tisulares se disolvieron en 100 µl de Empigen BB al 2% que contenía 20 µl de mezcla de inhibidor de proteasa utilizando un Branson Sonifier 250 durante 30 segundos en hielo.

Los extractos tisulares se centrifugaron a 16.000 rpm en una microcentrifugadora Eppendorf a 4°C durante 15 minutos para eliminar cualquier residuo celular insoluble. Los sobrenadantes contienen las proteínas tisulares extraídas. Se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C hasta ser utilizados en análisis inmunotransferencia Western.

Los extractos tisulares, los extractos de proteínas de la membrana celular seleccionados y el antígeno purificado por afinidad para BLA8 de MAb se separaron por electroforesis utilizando geles NuPAGE del 4 al 12% profundos. Los extractos se diluyeron en tampón de muestra LDS (Invitrogen, nº Cat. NP007) que contenía el agente reductor DTT (Invitrogen, nº Cat. NP0004) y se calentaron a 70°C durante 10 minutos, a continuación se centrifugaron en una microcentrifugadora y se agitaron para mezclar. Un total de 6,0 µl de extracto de tejido o proteína o de antígeno purificado por banda se cargó en el gel. Se incluyeron también patrones de peso molecular teñidos previamente (BioRad, nº Cat. 161-0372). La electroforesis se realizó a continuación según las instrucciones del fabricante, incluyendo la adición de antioxidante (Invitrogen, nº Cat. Np0005) al tampón corriente. Después de la electroforesis, se transfirieron los geles sobre membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, nº Cat. LC2000), también según las instrucciones del fabricante. Las proteínas transferidas se unieron a las membranas calentando la nitrocelulosa en PBS en un horno microondas durante 3 minutos a alta potencia. Las membranas se incubaron a continuación en tampón de bloqueo durante 30 minutos para reducir las uniones no específicas. Se utilizaron a continuación anticuerpos monoclonales purificados en proteína-G para sondear las membranas de nitrocelulosa. Se diluyeron BLA8 (lote 080-06), LUCA1 (lote 102-06), PA20 (lote 102-10) y SKIN2 (lote 083-95) de los MAb hasta aproximadamente 4 µg/ml en tampón de bloqueo. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con 8 ml de los MAb diluidos durante una hora a temperatura ambiente en un rocker. Se utilizó un Western Breeze blotting kit (Invitrogen, nº Cat. WB7103) para revelar las inmunotransferencias Western según las instrucciones del fabricante. Se observó una banda de proteína glucosilada de un peso molecular aproximado de 85 a 90 kD para cada uno de los anticuerpos monoclonales que utilizan la metodología anterior. Aunque la intensidad de la unión a la banda de la proteína reducida es menor que cuando no está reducida, la banda fue reconocida todavía por los cuatro Mab. El efecto es más evidente en los extractos de proteínas de la membrana celular que en el antígeno BLA8 purificado, que presenta una unión fuerte para cada uno de los Mab. No se observó ningún antígeno en las muestras de tejido normal.

Se utilizó IgG murina como referencia tanto para las inmunotransferencias Western no reducidas como para las reducidas. La misma concentración de IgG murina se utilizó cuando se utilizaban IgG murinas como sondas de anticuerpo monoclonal. Estas referencias demuestran que existen, de hecho, artefactos de inmunoglobina presentes como bandas de ~ 25 y 50 kD en las inmunotransferencias Western. Estas son debidas a la presencia de cadenas ligeras y pesadas procedentes de IgG endógena presente en las secciones de tejido o como consecuencia de la purificación por afinidad del antígeno BLA8.

EJEMPLO 5. Aislamiento del antígeno del anticuerpo anti-RAAG10 por espectrometría de masas

El anticuerpo anti-RAAG10 purificado era resina Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) acoplado por enlace covalente (Amersham Pharmacia Biotech., nº Cat. 17-0430-01) según las instrucciones del fabricante a una concentración de 2 mg de BLA8 Ab por ml de volumen de lecho de sefrosa hinchado. Se recogieron células LNCap recién cultivadas de 30 matraces de cultivo T-175 confluentes. Las células se sedimentaron por centrifugación, se volvieron a poner en suspensión en tampón de lisis (solución salina equilibrada de Hank (HBSS+) que contenía Triton X-100 al 2%, inhibidores de proteasa y azida sódica al 0,1%) en una relación de 500 µl de tampón de lisis x 1 matraz T175. Las células se retiraron raspando con una espátula para células. La suspensión de células/tampón de lisis se agitó para mezclar y a continuación se clarificó por centrifugación a 24.000 x g durante 45 minutos a 4°C. Se eliminó el lisado clarificado y se volvió a preclarificar frente a sefrosa CNBr

conjugada con IgG de ratón durante 2 horas a 4°C. El lisado preclarificado se pasó a continuación sobre la matriz de sefarosa CNBr BLA8. Las perlas de BLA8 se lavaron extensamente con tampón de lisis (por lo menos 10 volúmenes de columna) antes de la elución con glicina 0,1 M, pH 2,5. Se eluyó la matriz con un total de 5 volúmenes de columna de tampón de elución. El eluido se recogió en fracciones de volúmenes de columna individuales. Cada fracción se concentró independientemente en un concentrador Centricon-10 (Millipore, nº 4206) hasta que el volumen alcanza aproximadamente ~60 µl. El 10% del eluido se resolvió por SDS-PAGE y se analizó por inmunotransferencia Western. El 90% restante se cargó en una sola banda y se resolvió por SDS-PAGE y tinción Commassie. Se observaron tres bandas típicas de glucoproteínas por tinción Commassie a alrededor del intervalo 100, 200 y 250+ kDa, la banda más potente fue la banda de 100 kDa, seguida de la banda de 200 kDa, la banda de 250 KDa fue la más tenue de tinción. Estas bandas se correspondían con las bandas observadas por inmunotransferencia Western y se especuló que representan las formas de monómero (100 kDa), de homodímero (200 kDa) y homotrímero (250+ kDa) de una proteína aislada. Las bandas a 100 kDa y 200 kDa se escindieron y sometieron a análisis espectrofotométrico de masas.

15 EJEMPLO 6. Espectrometría de masas MALDI

El antígeno al que se unen anticuerpos anti-RAAG10 se aísla tal como se describe en los Ejemplos 4 y 5 y se somete a espectrometría de masas MALDI. Los eluidos de la columna de inmunoafinidad se separan por SDS-PAGE, y las bandas se escinden y se extraen. La rodaja de gel se digiere por lo general "en gel" (Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., y Mische, S. M., (1999), *Electrophoresis* 20, 601-605). Los péptidos extraídos se analizan por espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización de láser asistido por la matriz (MALDI-Tof) en un Kratos, AXIMA CFR. Las masas de péptidos se determinaron dentro de 100 ppm y una entrada tiempo ión con un reflectrón en campo curvado se utiliza para el aislamiento de péptidos y la fragmentación por desintegración posfuente (post-source-decay) (PSD). Las investigaciones se realizaron con los Protein Prospector Programs (Clauser, K. R., Baker, P. R y Burlingame, A. L., *Analytical Chemistry*, Vol. 71, 14, 2871 (1999)). MSFit y MStag.

Se identificaron cinco picos de péptidos mayores, a las masa de 1173,6016 (Péptido 1), 1601,7634 (Péptido 2), 1686,9179 (Péptido 3), 1991,0310 (Péptido 4) y 2620,3834 (Péptido 5). Las investigaciones de las bases de datos de proteínas humanas indicaron que los péptidos 2 y 3 podrían haber sido generados a partir de la proteína denominada "homólogo 3 de b7" (número de registro en NCBI 13376852). El análisis de desintegración posfuente de los péptidos seleccionados confirmó la identidad de estos péptidos como la secuencia correcta. Una identificación posterior en las secuencias proteicas supuestas de las bases de datos de EST (secuencia tag expresada) identificó una proteína adicional que contenía los 5 péptidos (con la identidad confirmada por desintegración posfuente). Esta proteína procede de una EST humana y se denomina: 602309922F1 NIH_MGC_88 Homo sapiens ADNc clone IMAGE: 4401173 5'.

Las cinco masas y el análisis PSD emparejó las secuencias en esta supuesta proteína. Las comparaciones de secuencias de ADSN y de la proteína derivada de EST y de la secuencia de ésta del homólogo 3 de B7 indicaron que las partes mayores de las secuencias se solapaban. Las secuencias no idénticas empiezan en el área del terminal amino del homólogo 3 de B7, inmediatamente después de la secuencia señal. Esto indica que el EST es realmente del clon del ADNc de una variante de corte y empalme del homólogo 3 de B7, con la región de codificación que se extiende una cantidad desconocida en la dirección 5'. Ya que el antígeno desglucosilado purificado tiene un peso molecular de aproximadamente 60.000 Daltons (y que del homólogo 3 de B7 tiene un peso molecular de aproximadamente 30.000 Daltons) los datos de la proteína son coherentes con la proteína real que contiene la secuencia de codificación adicional además de la conocida para el homólogo 3 de B7.

Ya que uno de los péptidos (Péptido 4) es muy homólogo de una secuencia en el homólogo 3 de B7 justo antes de un área hidrófoba (supuesto dominio transmembranario) y sin pretender estar vinculado a ninguna teoría o mecanismo particular, puede ser que el antígeno RAAG10 ha provenido de una duplicación de los dominios extracelulares del homólogo 3 de B7 (constituidos por dos dominios similares a Ig), generando una supuesta proteína constituida por 4 dominios similares a Ig, el dominio transmembranario y una "cola" citoplásmica.

La determinación de la estructura exacta del antígeno RAAG10 se determinará utilizando la información de las secuencias existentes para el EST y para el homólogo 3 de B7, utilizando técnicas habituales para ampliar la secuencia del ADNc en la dirección 5' hasta que se identifique el codón AUG de partida. Algunas de las estirpes celulares descritas en cualquier parte en este documento pueden utilizarse como fuentes de bancos de ADNc para este trabajo.

60 EJEMPLO 7. Caracterización del antígeno BLA8

Para identificar al antígeno al que era reactivo BLA8, se realizó un experimento de inmunoprecipitación (Ippt). Para Ippt, se lisaron 10 ml de concentrado de células LnCap con 40 ml de tampón de lisis. El tampón de lisis consistía en una solución salina equilibrada de Hanks (HBSS+) enriquecida con Triton X-100 al 2%, mezcla de inhibidor de proteasa (1 comprimido por cada 5 ml de tampón de lisis de mezcla de proteasa exenta de EDTA mini completa de Roche Molecular Biochemicals), azida sódica al 0,1% y PMSF 2 mM. El lisado celular se clarificó a

24.000 x g durante 30 minutos a 4°C antes de pasarse sobre una columna constituida por 2 mg/ml de perlas de sefarosa 6MB CNBr conjugado con IgG de ratón, considerándose el lisado entonces preclarificado. El lisado de LnCap preclarificado se pasó a continuación sobre una columna de sefarosa 6MB con CNBr conjugado con BLA8. La columna de BLA8 se conjugó a razón de 3 mg de BLA8 por ml de perlas hinchadas de sefarosa 6MB con CNBr. Las perlas (tanto de IgG de ratón como de BLA8) se lavaron a continuación tres veces con tampón de lisis antes de la elución con glicina 0,1 M, pH 2,5. Se recogieron los eluidos en fracciones de 1 volumen de columna y se neutralizaron con una concentración final de Tris 0,1 M, pH 8,0, dando como resultado un pH final de ~7,2. Las fracciones neutralizadas se concentraron a continuación hasta 10% de volumen de fracción con microconcentradores (Centricon 10 de Millipore). El 10% del eluido concentrado se resolvió a continuación por SDS-PAGE e inmunotransferencia Western. Al mismo tiempo, el 30% del eluido se concentró más hasta un volumen compatible para SDS-PAGE y se resolvió por tinción de Commassie.

Mediante inmunotransferencia Western el BLA8 alquilado y el eluido de IgG de ratón contra BLA8, triplete de proteínas muy glucosiladas exclusivas para el eluido BLA8 (> 223 kDa, ~200 kDa y 100 kDa) se observó, siendo la banda de 100 kDa la más prominente. Debido a la linealidad de las tres bandas (es decir, 200 kDa es doble de 100 kDa, y la banda > 223 kDa puede ser el triple de la banda de 100 kDa), se supuso que las tres bandas estaban constituidas por una forma monomérica, dimérica y trimérica del antígeno BLA8. El efecto de apilamiento del antígeno purificado indica que el antígeno puede dimerizarse bien en estado natural, pero la concentración está forzando artificialmente las proteínas a interactuar entre si a una frecuencia mayor. Mediante la tinción Commassie, se observó que había un único doblete de BLA8 a 100 kDa y ~ 200 kDa. Una tercera banda tenue se observó a > 223 kDa. Para confirmar la hipótesis de los autores, ambas bandas de 100 kDa y ~200 kDa se cortaron y se marcaron LO (100 kDa) y HI (~ 200 kDa). Estas dos bandas se sometieron a continuación a análisis espectral de masas.

Por análisis del espectro de masas, las dos bandas (HI y LO) proporcionaron los picos pépticos idénticos, lo que indica que las dos bandas estaban constituidas por el antígeno idéntico, confirmando la hipótesis en el contexto de la presente invención de que las bandas observadas por inmunotransferencia Western y SDS-PAGE eran evidentemente los polímeros del antígeno, que tienen un peso molecular glucosilado de ~100 kDa. Además, por espectrometría de masas se realizó una identificación del antígeno BLA8. Las secuencias peptídicas para el antígeno BLA8 fue un emparejamiento con dos secuencias depositadas en el banco, la primera de las cuales es una proteína B7-H3 identificada recientemente, siendo la segunda una secuencia EST que comparte >90% de homología con la secuencia del dominio extracelular B7-H3 pero está codificando una secuencia mucho mayor. Se ha descubierto que BLA8 está uniendo un nuevo antígeno que es similar a B7-H3. Se denominó a este antígeno B7-H3L.

EJEMPLO 8. Los anticuerpos LUCA1, SKIN2, PA20 y BLA8 se dirigen todos al mismo antígeno

Para confirmar los resultados de la inmunotransferencia Western que demuestra que los anticuerpos LUCA1, SKIN2, PA20 y BLA8 parecen todos estar transfiriendo el mismo antígeno, se realizó una placa ELISA en fase sólida utilizando el antígeno BLA8 purificado procedente de células LnCap. El antígeno purificado se unió a placas NUNC maxisorb (VWR) a una dilución 1:25 (50 µl por pocillo) en solución salina equilibrada de Hank (HBSS+) durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa unida se bloqueó a continuación durante 30 minutos con 200 µl por pocillo de HBSS+ que contenía ASB al 1%. Después del bloqueo LUCA1, SKIN2, PA20 y BLA8 (todos a 0,5 µg/pocillo, diluidos en el tampón de bloqueo) se añadieron a la placa maxisorb y se dejó interactuar durante 1 hora a temperatura ambiente. IgG de ratón y un anticuerpo irrelevante que es reactivo contra las células LnCap se utilizaron, a la misma concentración por pocillo, como referencia negativa. Las placas se lavaron intensamente con HBSS+. El anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón en mono conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (cadena pesada y ligera específica) utilizado a 0,04 µg/pocillo, se añadió a continuación a los pocillos y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron intensamente con HBSS+ y a continuación se expusieron a sustrato TMB para una reacción de cambio de color basada en HRP. La reacción se interrumpió por adición (1:1 frente al sustrato) de ácido fosfórico 1 M. Se leyeron a continuación las reacciones a D.O. 450. Mediante este ELISA, LUCA1, PA20, SKIN2 y BLA8 reaccionaron todos intensamente contra el antígeno BLA8 (por lo menos el doble de D.O. 450 aumentan sobre las referencias negativas) mientras que las referencias negativas presentaban poca a ninguna reactividad.

Al mismo tiempo, se realizó un ELISA de células vivas utilizando los cuatro anticuerpos. Se descubrió que los cuatro anticuerpos presentaban las mismas reactividades celulares. Además, se utilizaron LUCA1, PA20, SKIN2 y BLA8 para la inmunotransferencia Western contra el antígeno purificado BLA8. Los cuatro anticuerpos reaccionaron fuertemente con el antígeno purificado BLA8.

A partir de los dos experimentos realizados, se concluyó que los anticuerpos LUCA1, PA20, SKIN2 y BLA8 reaccionan todos con el mismo antígeno.

EJEMPLO 9. Familia BLA8 y competencia del epítipo

Debido a que se habían generado múltiples anticuerpos contra un solo antígeno, se realizaron

experimentos para determinar si existían diferencias epitópicas entre cuatro de los anticuerpos en la familia BLA8 de los mAb (LUCA1, PA20, SKIN2 y BLA8) debido a limitaciones cuantitativas, solamente LUCA1, PA20 y BLA8 se biotinilaron. Para la biotinilación, se incubaron 250 µg de cada anticuerpo, a una concentración de 2 mg/ml con sulfo-NHS-LC-biotina, a una proporción de 200 µg/mg de anticuerpo, en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. La biotinilación se enfrió mediante la adición de Tris 1M, pH 8,0 hasta una concentración final de 100 mM, La reacción de enfriamiento se dejó incubar durante 20 minutos más a temperatura ambiente. El anticuerpo biotinilado fue a continuación tampón intercambiado en PBS.

Se inmovilizó el antígeno purificado BLA8 en placas NUNC maxisorb mediante una incubación de dos horas, a una concentración de 2 µl por pocillo a una dilución 1:25 en solución salina equilibrada de Hank (HBSS+). La placa recubierta se bloqueó a continuación durante 30 minutos a temperatura ambiente en BSA al 1% que contenía HBSS+. El tampón de bloqueo se retiró a continuación de la placa, y el anticuerpo competidor, LUCA1, PA20 SKIN2 o BLA8 no biotinilados a una valoración de partida de 2 µg/pocillo a 3,8 ng/pocillo (50 µl/pocillo) diluido en tampón de bloqueo, se añadió a los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de los 30 minutos de incubación, el anticuerpo biotinilado (LUCA1, PA20 o BLA8) se introdujo en los pocillos que contenían el anticuerpo competidor a razón de 50 µl/pocillo. Los anticuerpos biotinilados se añadieron a una concentración de 500 mg/ml. La mezcla de anticuerpo competidor y anticuerpo biotinilado se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó intensamente a continuación en HBSS+. Se dejó a continuación estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP), diluida en HBSS+, incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente a razón de 50 µl/pocillo. La placa se lavó más con HBSS+ y se incubó con sustrato TBM para el desarrollo de color basado en HRP. Se interrumpió la reacción mediante la adición de ácido fosfórico 1 M. la placa se leyó a continuación a D.O. 450.

Del ensayo de competencia, se pensó que PA20 y SKIN2 intercompitieron, indicando que comparten el mismo epítipo. LUCA1 y BLA8, mientras tanto se compararon solo por ellos mismos, lo que indica que están unidos a distintos epítopos. Por lo tanto, en la familia BLA8 de anticuerpos, PA20, KID1 y SKIN2 unen un epítipo, los autores se refieren como epítipo A; LUCA1, KID13 y GB8 unen a un epítipo, los autores se refieren al epítipo B; y BLA8 se une al epítipo los autores se refieren al epítipo C.

EJEMPLO 10. Clonación de RAAG10

Clonación del ADN complementario completo en B7H3. Una genoteca de la célula cancerosa de ovario humano SKOV3 construido en el vector pCMV-SPORT6 de Gateway™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) se transfirió a las células de ovario de hámster chino (CHO) utilizando protocolo habitual. Los transfectantes que expresan el antígeno BLA8 en la superficie celular se enriquecieron por "adhesión celular sobre plástico" dos veces en el anticuerpo BLA8. Después del enriquecimiento se lisaron las células para liberar el ADN. El lisado en bruto se utilizó como plantilla para la clonación de B7H3 por reacción en cadena de la polimerasa (RCP). En resumen, un par de cebadores específicos para B7H3 (transcrito: 5'-AGCCGCCTCACAGGAAGATGCT-3', y complementario 5'-CCCTGGTCCTCATGGTCAGGCTAT-3') se diseñaron para flanquear el marco de lectura abierto (ORF) del B7H3 basándose en las secuencias EST disponibles en el GeneBank. La RCP se realizó combinando 1,5 µl de lisado celular con 50 pmoles de cada uno de los cebadores específicos para B7H3, H₂O exenta de nucleasa 1 x tampón de RCP, 200 µM de cada uno de los dNTP y 2,5 U de Platinum High-Fidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla de reacción se incubó a 94°C durante 2 min., seguido de 28 ciclos de desnaturalización de la plantilla a 94°C a 10 s y hibridación/ ampliación del cebador a 68°C durante 3 min y una ampliación final a 68°C durante 10 min. Se resolvió una alícuota del producto de la RCP en gel de agarosa al 1,2% y se observó por tinción con bromuro de etidio. Se identificó una banda predominante a aproximadamente 1,6 kb, se purificó en gel y se clonó en el vector de expresión para pTarget™ de mamífero (Promega Madison, WI). Los transformantes se caracterizaron por análisis del fragmento de restricción utilizando *HindIII*, y la orientación de la inserción del ADNc fue determinada por RCP. Los clones con patrones de restricción similares y orientación correcta se seleccionaron para secuenciado de nucleótidos. Se descubrió un ORF de 1605 pb de siete procedente de siete de estos clones, y todos ellos se solapaban con las secuencias EST de B7H3 disponibles en el GeneBank. La autenticidad de estos clones de ADNc se confirmó más expresándolos en las células CHO seguido de tinción con anticuerpo BLA8.

Construcción y caracterización de mutantes B7H3. Para determinar qué dominio(s) de B7H3 era(n) responsable(s) de la unión de cada miembro de la familia de anticuerpos BLA8, se construyeron una serie de mutantes de B7H3, expresados en células CHO y caracterizados por varios procedimientos. En resumen, un clon de ADNc pTargetB7H3 con la tinción más intensa por el anticuerpo BLA8 se seleccionó y sometió a digestión con diferentes combinaciones de enzimas de restricción que flanquearon (*BamHI* y *NotI*) o situado dentro del ADNc de B7H3 (*Eco47III*). Después de las ligaduras, una serie de mutantes se crearon como se resume en la Tabla 1. La autenticidad de cada mutante se comprobó por RCP y digestión con la enzima de restricción *HindIII*. Al menos tres clones de cada mutante se transfirieron en células CHO utilizando el protocolo habitual. Las células CHO transfectadas con mutantes B7H3 se seleccionaron a continuación en 1 mg/ml de G418 durante 2 semanas. Se utilizaron varios procedimientos para analizar el contenido en B7H3 de diferentes compartimentos d la célula: 1) Inmunohistoquímica (IHQ) se utilizó para la localización de B7H3 inmunorreactivo en la superficie o dentro d los transfectantes; 2) se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-RCP) para la detección de la expresión de ARNm en los transfectantes; 3) se utilizó ELISA en sándwich para la detección de

B7H3 secretor en el sobrenadante del cultivo. Los resultados obtenidos para cada procedimiento eran de por lo menos tres experimentos independientes.

Tinción inmunohistoquímica de células CHO transfectadas con mutantes de B7H3. La presencia de B7H3 inmunorreactivo en los transfectantes se puso de manifiesto por IHQ. Para determinar si B7H3 se expresaban en la superficie de las células CHO, se realizó IHQ en células vivas. En resumen, se incubaron las células con 10 µg/ml con familia de anticuerpos BLA8 (BLA8, LUCA1 o PA20) a 37°C durante 1 h. Se lavaron las células tres veces en mezcla de nutriente F12 de Hamk exenta de suero y medio de Eagle modificado por Dulbecco (F12/DMEM, 1:1. v/v), se fijó en etanol al 100% enfriado en hielo durante 15 min y a continuación se secó completamente con aire. La actividad de la peroxidasa endógena se enfrió incubando las células con H₂O₂ al 2%/PBS enfriada en hielo durante 15 min. Después del enjuague con PBS se bloquearon las células con suero de cabra normal al 5%/PBS durante 1 h y a continuación se incubaron con 2 µg/ml de fragmento de anti-IgG+IgM (H+L) de cabra con fragmento F(ab')₂ de AffiniPure conjugado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch Labs., West Grove, PA) en tampón de bloqueo durante 1 h. Después de los lavados, B7H3 inmunorreactivo en la superficie de las células se observó incubando las células con tampón de acetato sódico (pH 5,0) que contenía 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y H₂O₂. Para la detección de B7H3 inmunorreactivo en células CHO se realizó la IHQ con células fijadas en un procedimiento similar al descrito anteriormente, se fijaron en primer lugar las células en etanol al 100% enfriado en hielo y se secaron completamente con aire. Después del enfriado de la actividad de peroxidasa endógena, se lavaron las células, se bloquearon y a continuación se incubaron con 10 µg/ml de la familia de anticuerpos BLA8 a 37°C durante 1 h. Después de los lavados, se incubaron las células con el mismo anticuerpo conjugado con peroxidasa. Se desarrolló la señal de la tinción después de los lavados. Se obtuvo la referencia negativa tificando las células CHO transfectadas con tampón Tris con la familia de anticuerpos BLA8. Se evaluó la tinción bajo un microscopio invertido y los resultados se resumen en la Tabla 3 en las columnas IHQ. Los resultados se calificaron como "+" para la tinción positiva, "±" para la tinción positiva débil o "-" para la tinción negativa.

Detección de la expresión del ARNm de B7H3 por RT-RCP. La RT-RCP se realizó para determinar si el ARNm de B7H3 se expresaba realmente en los transfectantes. Se aisló ARN completo de las células CHO transfectadas con mutantes de B7H3 por reactivo TriSOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se cuantificó por absorbancia a 260 nm. Aproximadamente 2 a 3 µg de ARN completo se transcribió a la inversa con 0,5 µg de oligo-dT₁₅ utilizando sistema de transcripción inverso con RNase H⁻ Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante. Se realizó la RCP combinando 1 µl de producto de transcripción inversa con 50 pmoles cada uno de los cebadores de B7H3 (para detalles, por favor véase la Tabla 2), H₂O exenta de nucleasa, 1 x tampón de RCP, 200 µM de cada uno de los dNTP y 2,5 U de U de Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un estado de ciclación similar al descrito anteriormente. El producto resultante de la RCP se volvió a disolver en gel de agarosa al 1,2% y se observó por tinción con bromuro de etidio. Los resultados se resumieron en la Tabla 3 bajo la columna RCP y se calificaron "+" para los mutantes con el amplicón correcto detectado o "-" para ningún amplicón detectado.

Detección de B7H3 inmunorreactivo en el sobrenadante del cultivo por ELISA. Para explorar la posibilidad de si alguno de los B7H3 se segregó en lugar de anclar en la superficie de la célula, se desarrolló un ELISA en sándwich para ensayar el contenido de B7H3 inmunorreactivo en el sobrenadante del cultivo. En resumen, la placa de ELISA de 96 pocillos se recubrió con 4 µg/ml de anticuerpo BLA8 en tampón de carbonato (pH 9,0) a 4°C durante la noche. La placa se lavó con Tween-20/PBS al 0,05% y se bloqueó con BSA al 3%/PBS durante 1 h. Duplicados de los sobrenadantes del cultivo (4 veces dilución de 10 veces comenzando desde puro hasta 1/1000) y patrón de antígeno BLA8 (8 veces dilución de 2 veces partiendo de 16 µg/ml hasta 125 ng/ml) se prepararon en PBS que contenía BSA al 3% y Tween-20 al 0,05% y se dejaron incubar durante 1 h. Después de los lavados la placa se incubó con 4 µg/ml de anticuerpo LUCA1 biotinilado en ASB al 3%/PBS durante 1 h. Se lavó la placa y se incubó con reactivo Vectastain Elite ABC (Vector Labs., Burlingame, CA) durante otra hora. Después de los lavados, el B7H3 unido se observó por desarrollo del color en tampón citrato-fosfato que contenía o-fenilendiamina y H₂O₂. La intensidad del color deseado se obtuvo por la adición de H₂SO₄ 2,5 N. Se determinó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas ELISA Emax de Molecular Devices (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) interfazado con el programa Softmax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se obtuvieron blancos utilizando el sobrenadante de las células CHO transfectadas con tampón Tris. Los resultados se resumieron en la Tabla 3 bajo la columna ELISA, y se clasificaron como "+" cuando la lectura de absorbancia era mayor que la de los blancos o "-" cuando la lectura de absorbancia era igual o inferior a la de los blancos.

Tabla 1. Mutagénesis de B7H3 por enzimas de restricción		
Denominación del mutante	Enzima(s) de restricción utilizada(s)	Restos de aminoácidos con respecto a B7H3 completo
B7H3 completo	Ninguno	1-534
ΔC	<i>Eco47III</i>	Δ132-349
C	<i>Eco47III</i>	132-349
Δ5'	<i>BamHI</i> & <i>Eco47III</i>	350-534
Δ5's	<i>BamHI</i> & <i>Eco47III</i>	132-534
Δ3'	<i>Eco47III</i> & <i>NotI</i>	1-131
Δ3's	<i>Eco47III</i> & <i>NotI</i>	1-349

Tabla 2. Cebadores utilizados en la detección del transcrito ARNm de B7H3 por RT-RCP

Transflectante	Cebadores utilizados	Tamaño aproximado del amplicón
B7H3 completo	transcrito : 5'-AGCCGCCTCACAGGAAGATGCT-3' antitranscrito: 5'-AGCGGCCACCTGCAGGCTGACGGCA-3'	440 bp & 1.1 kb
ΔC	transcrito: 5'-AGCCGCCTCACAGGAAGATGCT-3' antitranscrito: 5'-GGGAATGTCATAGGCTGCCCTGTGAT- 3'	760 bp
C	transcrito: 5'-CCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCCT-3' antitranscrito: 5'-CACGGCTCCTGTGGGGCTTCTCT-3'	330 bp
Δ5'	transcrito : 5'-CCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGT-3' antitranscrito: 5'- CCCTGGTCCCTCATGGTCAGGCTAT-3'	220 bp
Δ5's	transcrito : 5'-CCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGT-3' antitranscrito: 5'- CCCTGGTCCCTCATGGTCAGGCTAT-3'	220 bp
Δ3'	transcrito : 5'- AGCCGCCTCACAGGAAGATGCT-3' antitranscrito: 5'-CAGGGCTCCTGTGAGGCAGAACCA-3'	110 bp
Δ3's	transcrito : 5'- AGCCGCCTCACAGGAAGATGCT-3' 5'-CACGGCTCCTGTGGGGCTTCTCT-3'	770 bp

Tabla 3. Caracterización de mutantes de B7H3 por varios procedimientos

Transflectante	BLA8 IHQ	LUCA1 IHQ	PA20 IHQ	RT-PCR	ELISA
B7H3 completo (1-534 aa)	+	+	+	+	-
CHO transflectadas con tampón Tris	-	-	-	-	-
ΔC (Δ132-349 aa)	+	+	-	+	-
C(132-349aa)	-	-	-	+	-
Δ5'(350-534 aa)	-	-	-	+	-
Δ5's (132-534 aa)	-	-	-	+	-
Δ3' (1-131 aa)	-	-	-	+	-
Δ3's (1-349 aa)	+/-	+/-	+/-	+	+ ¹

¹ La concentración d B7H3 inmunorreactivo en el sobrenadante de "mutante Δ 3's" fue aproximadamente 2,148 ± 0,48 µg/ml.

Una representación en diagrama de B7H3 y sus mutantes se muestra en la Fig. 2.

5

EJEMPLO 11. Inmunohistoquímica para la unión de anticuerpos de la anti-familia RAAG10 a tejidos con tumor

Se incorporaron muestras de tejido congelado en el compuesto OCT y se congelaron rápidamente en isopentano con nieve carbónica. Se cortaron criosecciones con el microtomo Leica 3050 CM a espesores de 5 µm y se montaron congelados en portaobjetos de vidrio. Se fijaron las secciones con etanol a -20°C y se dejaron secar al aire durante la noche a temperatura ambiente. Las secciones fijadas se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Para inmunohistoquímica las secciones de tejido se recuperaron y en primer lugar se incubaron en tampón de bloqueo (PBS, suero de cabra normal al 5%) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se incubaron con el anticuerpo anti-RAAG10 y anticuerpos monoclonales de referencia diluidos en tampón de bloqueo (5 µg/ml) durante la noche. Las secciones se lavaron a continuación tres veces con el tampón de bloqueo. Se detectaron anticuerpos monoclonales unidos con anti-IgG de ratón en cabra + conjugados de peroxidasa con F(ab')₂ de IgM (H+L) y la peroxidasa sustrato diaminobenzidina (1 mg/ml, n° Cat. D 5637 de Sigma) en tampón de acetato sódico 0,1 M, pH 5,05 y peróxido de hidrógeno al 0,003% (n° de Cat. H1009 de Sigma). Las secciones teñidas se contaron teñidas con hematoxilina y se examinaron al microscopio Nikon.

20

En algunos casos, se utilizaron tejidos con formaldehído empapados en parafina para inmunohistoquímica después de utilizar los procedimientos de recuperación de antígenos apropiados. Uno de dichos procedimientos de recuperación de antígenos se describe en Mangham e Isaacson, *Histopatología* 35:129-33 (1999). Otros procedimientos de recuperación y/o detección de antígenos pueden utilizarse por un experto en la materia. Los resultados de experimentos similares realizados utilizando tejidos congelados o cuando proceda, tejidos fijados con recuperación de antígeno y detección polyMica se realizaron. La unión del anticuerpo anti-RAAG10 a una variedad de tejidos normales y con cáncer se evaluó. En todos los casos, la unión del antígeno en tejidos fijados de referencia se correlacionó con la de los tejidos congelados. Los resultados procedentes de los tejidos congelados se utilizaban solamente si los dos no se emparejaban en los controles. Por conveniencia, la Tabla 4 muestra los resultados combinados de la tinción de 5 tipo principales de tumores con anticuerpo anti-RAAG10 utilizando tejidos de tumor congelados procedentes de 5 fuentes diferentes. Para cada tipo de tumor, los números de tumores positivos al ensayo para el antígeno del anticuerpo anti-RAAG10, es decir, RAAG10, y el número total de dichos tumores analizados se muestra (+/total). El porcentaje de tumores que se unen al anticuerpo anti-RAAG10 se indica también.

30

Tabla 4. Resumen de la frecuencia de la unión del anticuerpo anti-RAAG10 a RAAG10 en los tipos principales de tumor

Colon	3/6
Pulmón	6/6
Mama	2/2
Próstata	3/4
Sarcoma	1/1
Total	78,94% (15/19)

La Tabla 5 muestra los resultados combinados de la tinción de 5 tipos de tumor metastásico con el anticuerpo anti-RAAG10 utilizando tejidos de tumor fijados o congelados. Para cada tipo de tumor, los números de tumores positivos al ensayo para el antígeno del anticuerpo anti-RAAG10 y el número total de dichos tumores ensayados se presenta (+/total) el porcentaje de tumores que unen el anti-RAAG10 se indica también. Como se muestra en la Tabla 5 el anti-RAAG10 se unió a aproximadamente 94% de los tipos de tumor metastásico ensayados.

Tabla 5. Resumen de la frecuencia de la unión del anticuerpo anti-RAAG10 en tipos de tumor metastásico

Metástasis de mama	9/9
Carcinoma bronquial metastásico	0/1
Metástasis renal	5/5
Metástasis de tiroides	1/1
Carcinoma metastásico de células claras	1/1
(continuación)	
Total	94,1% (16/17)

EJEMPLO 12. Resultado de la inmunocitoquímica de CellArray™

Se utilizó anticuerpo anti-RAAG10 monoclonal para ensayar la reactividad con varias estirpes celulares de diferentes tipos de tejidos. Las células de diferentes estirpes celulares creadas se retiraron de la superficie del cultivo utilizando proteasas, compuesto concentrado y empapado en OCT. Se congelaron las células y se seccionaron, a continuación se tiñeron utilizando un protocolo IHQ habitual. La tecnología CellArray™ se describe en el documento WO 01/43869. Los resultados se puntuaron como “+” para la tinción positiva débil, “++” para la tinción positiva moderada, “+++” para la tinción positiva intensa y “-” para la tinción negativa. Los resultados de los experimentos de unión CellArray™ que muestran la unión del anticuerpo anti-RAAG10 a varias estirpes celulares (incluyendo estirpes de células cancerosas) se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Unión de anticuerpos a estirpes celulares

Denominación de la célula	ATTCC nº	Órgano	Tipo de célula	BLA8	LUCA1	PA20	SKIN2
HMEC	CC-2551*	Mama	Epitelial de mama humana	+++	+	+	+
WI-38	CCL-75	Pulmón	Fibroblastos de pulmón fetal humano	+++	fc+	++	fc+
RL-65	CRL-10354	Pulmón	Célula clara de rata	-	-	-	-
COS7	CRL-1651	Riñón	Mono verde africano	+++	nc	+	fc+
SK-BR-3	HTB-30	Mama	Adenocarcinoma	+	nc	+	+/-
BT-474	HTB-20	Mama	Glándula mamaria, mama, carcinoma del conducto	+++	+++	+++	+++
MCF7	HTB-22	Mama	Adenocarcinoma	+++	+++	+++	+++
HT29	HTB-38	Colon	Adenocarcinoma colorrectal	+++	+	++	++
SW480	CCL-228	Colon	Adenocarcinoma colorrectal	++	+/-	+/-	+/-
ES-2	CRL-1978	Ovario		++	+	++	+
SK-OV-3	HTB-77	Páncreas	Adenocarcinoma	+++	+++	+++	++
9926	RAVEN	Páncreas	Línea de cáncer pancreático desarrollada en Raven	+	+	+	+/-
PANC-1	CRL-1469	Páncreas	Carcinoma epitelioideo ductal	++	+/++	+	+

AsPC-1	RL-1682	Páncreas	Adenocarcinoma	++	+	++	++
Capan-1	HTB-79	Páncreas	Adenocarcinoma	++	+/-	+	+
293	CRL-1573	Riñón		+++	++	+++	+++
(continuación)							
CFPAC-1	CRL1918	Páncreas	Adenocarcinoma del conducto dl páncreas, fibrosis quística	+++	++	++	+++
HPAF-II	CRL1997	Páncreas	Adenocarcinoma	++	+/-	+	+
Hs 700T	HTB-147	Metástasis en pelvis	Adenocarcinoma	+++	+++	+++	+++
Hs 766T	HTB-134	Páncreas	Carcinoma	++	+	+	+
786-O	CRL-1932	Riñón	Adenocarcinoma de células renales	+++	+++	+++	+++
Caki-2	HTB-47	Riñón	Carcinoma	+++	+++	+++	+++
A498	CRL-7908	Riñón	Carcinoma	+++	++	+++	+++
BHK-21	CCL-10	Riñón	Riñón normal dorado de hámster sirio	-	-	-	-
LNCaP	CRL-1740	Próstata	Carcinoma	+++	+++	+++	+++
PC3	CRL-1435	Próstata	Adenocarcinoma	++	+	+/-	+/-
22RV1	CRL-2505	Próstata	Carcinoma	+++	+	++	+++
DU145	HTB-81	Próstata	Carcinoma	+++	+/+++	+++	+++
A549	CCL-185	Pulmón	Carcinoma	+	+	+/-	+/-
Ca130	RAVEN	Pulmón	Línea de cáncer pulmonar denominación Raven	++	++	++	++
SK-MES-1	HTB-58	Pulmón	Carcinoma epidermoide	+++	+++	+++	+++
Calu 3	HTB-55	Pulmón	Adenocarcinoma	+++	++	+++	++
Concentración de MAbs = 5 µg/ml, protocolo normal *CC – 2551 - Biowhittaker							

EJEMPLO 13. Unión del anticuerpo anti-RAAG10 a tejidos tumorales y normales

5 Se congelaron y montaron tejidos normales y los tejidos tumorales obtenidos por ectomía quirúrgica. Se cortaron criosecciones con el microtomo Leica 3050 CM a espesores de 5 µm y se montaron descongelados en portaobjetos recubiertos de vectabaun. Se fijaron las secciones con etanol a -20°C y se dejaron secar con aire durante la noche a temperatura ambiente. Se utilizó anticuerpo primario anti-RAAG10 a una dilución de 1 a 100 (concentración final de 1 µg/ml). Se recuperaron las secciones de tejido y en primer lugar se incubaron en tampón de bloqueo (PBS, 5% de suero de cabra normal) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se incubaron con el anticuerpo anti-RAAG10 y anticuerpos monoclonales de referencia diluidos en tampón de bloqueo (5 µg/ml) durante la noche. Las secciones se lavaron a continuación tres veces con el tampón de bloqueo. Se detectaron los anticuerpos monoclonales unidos con conjugados de peroxidasa con F(ab')₂ anti-IgG de ratón en cabra + IgM (H+L) y la peroxidasa sustrato diaminobenzidina (1 mg/ml, nº Cat. D 5637 de Sigma) en tampón de acetato sódico 0,1 M, pH 5,05 y peróxido de hidrógeno al 0,003% (nº Cat. H1009 de Sigma). Las secciones teñidas se tiñeron para el contador con hematoxilina y se examinaron al microscopio Nikon. Se utilizó el kit de detección PolyMICATM para determinar la unión del anticuerpo anti-RAAG10.

20 Los resultados se puntuaron como “+” para la tinción positiva débil, “++” para la tinción positiva moderada, “+++” para la tinción positiva fuerte y “-” para la tinción negativa. La Tabla 7 presenta la unión del anticuerpo anti-RAAG10 a muestras de tejido tumoral. Los resultados de la tinción de tejidos normales con anticuerpo anti-RAAG10 se muestran en la Tabla 8.

25 Los resultados que utilizan un protocolo relativamente más sensible (ABC o Dako Envision) mostraban tinción en tejidos normales de suprarrenales, de útero, piel, pulmón, riñón, páncreas, hígado y próstata.

Se observó tinción del estroma (tejido conectivo) en tejidos normales de pulmón, colon, duodeno, corazón, pulmones, ovario, próstata, músculo esquelético, piel, estómago y útero. El tejido cerebral normal fue negativo.

Tabla 7: Anticuerpos RAAG10 que se unen a tejidos tumorales								
<i>Protocolo habitual, concentración en Abs = 5 µg/ml</i>								
Número de colonias	BLA8		SKIN2		LUCA1		PA20	
Mama								
Número de tumor	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma
6AB3	++	-	+	-	+	-	+	-
805A	+ / ++	+++	+	+++	+	++	+	+++
Colon								
Número de tumor	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma
1C62	-	+++	-	++	-	++	-	++
13FB	+	+++	-	++	+	+++	+	++
27FD	++	+++	+	+++	-	++	-	++
4ECD	-	++	-	+	-	+	-	-
689F	-	+++	-	++	-	++	-	++
Pulmón								
Número de tumor	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma
273	+ / ++	+++	+	+++	-	+	-	++
34B	++*	+++	-	++	-	++	-	++
425	+	+++	-	+	-	++	-	++
E27	++	++	++	++	+ / +++*	++	+	++
380E	+++	++	+	+	+ / ++	++	+	++
1495	++	++	+	++	+	++	-	++
Próstata								
Número de tumor	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma	Tumor	Estroma
1886	-	-	-	-	-	-	-	-
209	+++	-	++	-	+ / +++	-	++	-
470	++	-	++	-	++	+	+	-
1D2C	+ / ++	-	++	-	++	-	+ / +++	-

* = tinción focal

Tabla 8. Anticuerpos anti familia-RAAG10 que se unen a tejidos normales				
<i>Protocolo habitual, concentración en Abs = 5 µg/ml</i>				
	BLA8	LUCA1	PA20	SKIN2
Piel				
Epidermis basal	-	Débil +	-	Débil +
Vasos	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -
Glándulas sudoríparas	-	-	-	-
Estroma	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -
Pulmón				
Alvéolos	Débil +	+ / -	- / +	- / +
Epitelio bronquial	-	-	-	-
Hígado				
Hepatocitos	- / +	- / +	- / +	- / +
Células de Kupffer	+	+	+	+ / -
Vasos	-	-	-	-
Páncreas				
Acinos	- / +	- / +	Débil +	Débil +
Conductos	-	-	-	-
Islotes	- / +	- / +	+ / -	+ / -
Estroma	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -
Riñón				
Vasos	-	-	-	-
Estroma	+ / -	-	-	-
Glomérulos	-	+ / -	-	-

EJEMPLO 14. Interiorización de un anticuerpo anti-RAAG10 y anti-IgG de ratón conjugada a una toxina

5 MAb-ZAP (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) es anti-IgG de ratón conjugada con saporina, una toxina que inhibe la síntesis de las proteínas. Esta toxina es impermeable a la membrana celular. Si un anticuerpo monoclonal se une a un antígeno de la superficie celular que es interiorizable, el conjugado de la toxina puede unirse al monoclonal unido y ser interiorizado, destruyendo opcionalmente la célula. Siendo dependiente de la interiorización para la demostración de la actividad tóxica, el MAb-ZAP puede servir para evaluar si o no si un antígeno dado servirá como diana adecuada para cualquier tóxico que sea dependiente de la interiorización para expresar efectos tóxicos en la célula. Como tal, el MAb-ZAP sirve como modelo para dichas toxinas dependientes de la interiorización, tales como los maitanzinoides y los calicheamicinas.

10 Para probar la interiorización de un anticuerpo anti-RAAG10 e anti-IgG de ratón conjugado con saporina y el efecto de inhibición del crecimiento de las células tumorales después de la interiorización de la proteína saporina inhibidora de la síntesis, se utilizó en este ensayo el anticuerpo LUCA1 anti-RAAG10 monoclonal de ratón. Las células de carcinoma escamoso de pulmón humano, SK-MES-1, se retiraron de los matraces de la solución madre con EDTA 10 mM y se centrifugaron. Se volvieron a poner en suspensión las células a 50.000/ml en medio apropiado y 100 micromoles por pocillo se colocaron en placas de 96 pocillos. Se añadió inmediatamente el anticuerpo LUCA1 a los pocillos apropiados en forma de 10 x concentrado, para preparar una concentración final de 10 microorg./ml. Después de 15 minutos a temperatura ambiente se añadió MAb-ZAP (nº de Cat. IT-04, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) se añadieron a los pocillos apropiados como un concentrado 10 veces, para preparar la concentración final desde 0,01 pM hasta 10⁴ pM. Después de 4 días de cultivo, se añadió MTT (5 mg/ml de solución madre de PBS, dilución 1:10 en el pocillo) durante 4 h a 37°C. El medio se retiró a continuación de todos los pocillos y se añadieron 100 microl/pocillo de DMSO. Las placas se removieron suavemente para solubilizar el precipitado azul de MTT y se leyeron las placas en un lector de placas a 540 nm. La medición de la D. O. del MTT de color tetrazolio reducido es un sustituto para el número de células.

25 Como se representa en la figura 1, hubo una disminución en la tinción con MTT en las células en las células SK-MES-1 en presencia (línea llena) de anticuerpo monoclonal LUCA1 en comparación con la tinción en ausencia (línea de puntos) de LUCA1 cuando se añadió MAb-ZAP, lo que indica que el crecimiento de las células SK-MES-1 de carcinoma escamoso de pulmón humano se inhibió en presencia de anticuerpo monoclonal LUCA1 y MAb-ZAP (anti-IgG de ratón conjugado con saporina inhibidor de síntesis de proteínas). La divergencia de las líneas a las concentraciones mayores de MAb-ZAP indica que LUCA1 está interiorizado. Se han realizado experimentos similares con LUCA1 en las estirpes de células tumorales SK-OV-3 y LNCaP. Se han obtenido resultados similares de interiorización en estas tres estirpes celulares con anticuerpos monoclonales BLA8 y KID2, que son otros dos anticuerpos anti-RAAG10 dirigidos a otros epítomos aparte del que se dirige LUCA1.

30 Debe apreciarse que los ejemplos y las formas de realización descritos en la presente memoria son proporcionados únicamente a título ilustrativo y que varias modificaciones o cambios a la luz de los mismos resultarán evidentes para los expertos en la materia, estando comprendidos dentro del espíritu y las generalidades de la presente solicitud. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes mencionadas en la presente memoria están incorporadas a la misma como referencia en su totalidad para todos los fines en la misma medida que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual estuvieran específica o individualmente indicadas para su incorporación como referencia.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de inmunoglobulina sustancialmente purificado o un fragmento que se une al antígeno del mismo, que se une a una parte de B7-H3L que está expuesta en la superficie de una célula viva *in vitro* o *in vivo*, y puede interiorizarse en una célula cancerosa que expresa dicha parte expuesta de B7-H3L.

5 2. Polipéptido de inmunoglobulina purificado o fragmento que se une al antígeno según la reivindicación 1, en el que dicha célula cancerosa se selecciona de entre un tumor de las glándulas suprarrenales, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, un cáncer de vejiga, un cáncer de huesos, un cáncer cerebral y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, un tumor del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello de útero, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma renal de células cromóforas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso cutáneo benigno, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, una fibrogénesis imperfecta ossium, una displasia fibrosa del hueso, un cáncer del conducto biliar y de vesícula biliar, una enfermedad de gestación trofoblástica, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, un insulinooma, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer renal, una leucemia, un tumor benigno lipomatoso/lipoma, un tumor maligno lipomatoso/liposarcoma, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer pulmonar, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, un tumor neuroendocrino, un cáncer de ovario, un cáncer pancreático, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina del nervio periférico, un feocromocitoma, un tumor de la hipófisis, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer renal metastásico, un tumor rabdoide, un rdbomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer epidermoide, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un tímoma, un cáncer metastásico del tiroides y un cáncer de útero.

25 3. Secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de inmunoglobina o un fragmento que se une al antígeno del mismo expresado por una estirpe celular, en la que la estirpe celular es un hibridoma seleccionado de entre ATCC nº PTA-4217, ATCC nº PTA-4218, ATCC nº PTA-4244 y ATCC nº PTA-4245.

4. Ácido nucleico según la reivindicación 3, en el que el ácido nucleico está unido funcionalmente a un activador.

30 5. Ácido nucleico según la reivindicación 4, en el que el ácido nucleico está contenido en un vector de expresión.

6. Estirpe celular transfectada, transformada o infectada con un vector que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 3 ó 4.

7. Procedimiento para producir un polipéptido de inmunoglobulina sustancialmente purificado o un fragmento que se une al antígeno del mismo, que comprende:

35 (a) cultivar una estirpe celular transformada con el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en condiciones en las que se expresa el polipéptido de inmunoglobulina o el fragmento que se une al antígeno; y

(b) recolectar el polipéptido de inmunoglobulina o el fragmento expresado.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la estirpe celular es un hibridoma.

40 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el hibridoma se selecciona de entre el grupo constituido por ATCC nº PTA-4217, ATCC nº PTA-4218, ATCC nº PTA-4244 y ATCC nº PTA-4245.

10. Composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina purificada o el fragmento que se une al antígeno según la reivindicación 1 ó 2, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 11. Composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal o de un fragmento que se une al antígeno del mismo que se une a una parte de B7-H3L que está expuesta en la superficie de una célula viva *in vitro* o *in vivo*; y puede interiorizarse dentro de una célula cancerosa que expresa dicha parte expuesta de B7-H3L; junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que la composición comprende un resto terapéutico adicional.

13. Estirpe celular aislada seleccionada de entre ATCC nº PTA-4217, ATCC nº PTA-4218, ATCC nº PTA-4244 y ATCC nº PTA-4245 o su descendencia.

14. Procedimiento para suministrar un agente quimioterapéutico a una célula cancerosa *in vitro* que comprende administrar a dichas células una composición que comprende un anticuerpo anti-B7-H3L asociado al agente quimioterapéutico, en el que dicha célula cancerosa expresa B7-H3L, y una parte de dicho B7-H3L está expuesta sobre la superficie de dicha célula;

5 dicho anticuerpo anti-BH-3L se une a dicha parte de B7-H3L que está expuesta sobre la superficie de dicha célula y puede interiorizarse en dicha célula cancerosa; y

10 dicha célula cancerosa es una célula cancerosa de un tumor de las glándulas suprarrenales, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, un cáncer de vejiga, un cáncer de huesos, un cáncer cerebral y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, un tumor del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello de útero, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma renal de células cromóforas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso cutáneo benigno, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un fibrogénesis imperfecta ossium, una displasia fibrosa del hueso, un cáncer del conducto biliar y vesícula biliar, una enfermedad de gestación trofoblástica, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, un insulinooma, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer renal, un leucemia, un tumor benigno lipomatoso/lipoma, un tumor maligno lipomatoso/liposarcoma, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer pulmonar, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, un tumor neuroendocrino, un cáncer de ovario, un cáncer pancreático, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina del nervio periférico, un feocromocitoma, un tumor de la hipófisis, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer renal metastásico, un tumor rabdoide, un rhabdomyosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer epidermoide, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico o, un timoma, un cáncer metastásico del tiroides y un cáncer de útero.

15 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo anti-B7-H3L procede de un hibridoma seleccionado de entre ATCC nº PTA-4217, ATCC nº PTA-4218, ATCC nº PTA-4244 y ATCC nº PTA-4245 o su descendencia.

16. Anticuerpo anti-B7-H3L asociado al agente quimioterapéutico, para inhibir el crecimiento de las células cancerosas en un sujeto, en el que

20 dicha célula cancerosa expresa B7-H3L, y una parte de dicho B7-H3L está expuesta sobre la superficie de dicha célula;

25 dicho anticuerpo anti-BH-3L se une a dicha parte de B7-H3L que está expuesta sobre la superficie de dicha célula y puede interiorizarse en célula cancerosa; y

30 dicha célula cancerosa es una célula cancerosa de entre un tumor de las glándulas suprarrenales, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, un cáncer de vejiga, un cáncer óseo, un cáncer cerebral y de médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, un tumor del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello uterino, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma renal de células cromóforas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso cutáneo benigno, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un fibrogénesis imperfecta ossium, una displasia fibrosa del hueso, un cáncer del conducto biliar y de vesícula biliar, una enfermedad de gestación trofoblástica, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, un insulinooma, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer renal, una leucemia, un tumor benigno lipomatoso/lipoma, un tumor maligno lipomatoso/liposarcoma, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer pulmonar, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, un tumor neuroendocrino, un cáncer de ovario, un cáncer pancreático, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina del nervio periférico, un feocromocitoma, un tumor de la hipófisis, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer renal metastásico, un tumor rabdoide, un rhabdomyosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer epidermoide, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico o, un timoma, un cáncer metastásico del tiroides y un cáncer de útero.

35 17. Anticuerpo anti-B7-H3L según la reivindicación 16, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal expresado por la estirpe celular en el que la estirpe celular es un hibridoma seleccionado de entre ATCC nº PTA-4217, ATCC nº PTA-4218, ATCC nº PTA-4244 y ATCC nº PTA-4245 o su descendencia.

40 18. Procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una célula cancerosa en un sujeto que comprende poner en contacto las células del sujeto con un anticuerpo anti-B7-H3L *in vitro* y detectar un complejo de B7-H3L de las células y el anticuerpo, si existe, en el que

55

dicha célula cancerosa expresa B7-H3L, y una parte de B7-H3L que está expuesta sobre la superficie de dicha célula y puede interiorizarse en dicha célula;

dicho anticuerpo anti-BH-3L se une a dicha parte de B7-H3L que está expuesta sobre la superficie de dicha célula y puede interiorizarse en dicha célula cancerosa; y

5 dicha célula cancerosa es una célula cancerosa de tumor de las glándulas suprarrenales, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, un cáncer de vejiga, un cáncer óseo, un cáncer cerebral y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, un tumor del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello de útero, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma renal de células cromóforas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso cutáneo benigno, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un fibrogénesis imperfecta ossium, un displasia fibrosa del hueso, un cáncer del conducto biliar y de vesícula biliar, una enfermedad de gestación trofoblástica, un tumores de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, un insulinooma, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer renal, un leucemia, un tumor benigno lipomatoso/lipoma, un tumor maligno lipomatoso/liposarcoma, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer pulmonar, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, un neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, un tumor neuroendocrino, un cáncer de ovario, un cáncer pancreático, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina del nervio periférico, un feocromocitoma, un tumor de la hipófisis, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, unl trastorno hematológico raro, un cáncer renal metastásico, un tumor rabdoide, un rabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer epidermoide, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico o, un timoma, un cáncer metastásico del tiroides y un cáncer de útero.

10

15

20

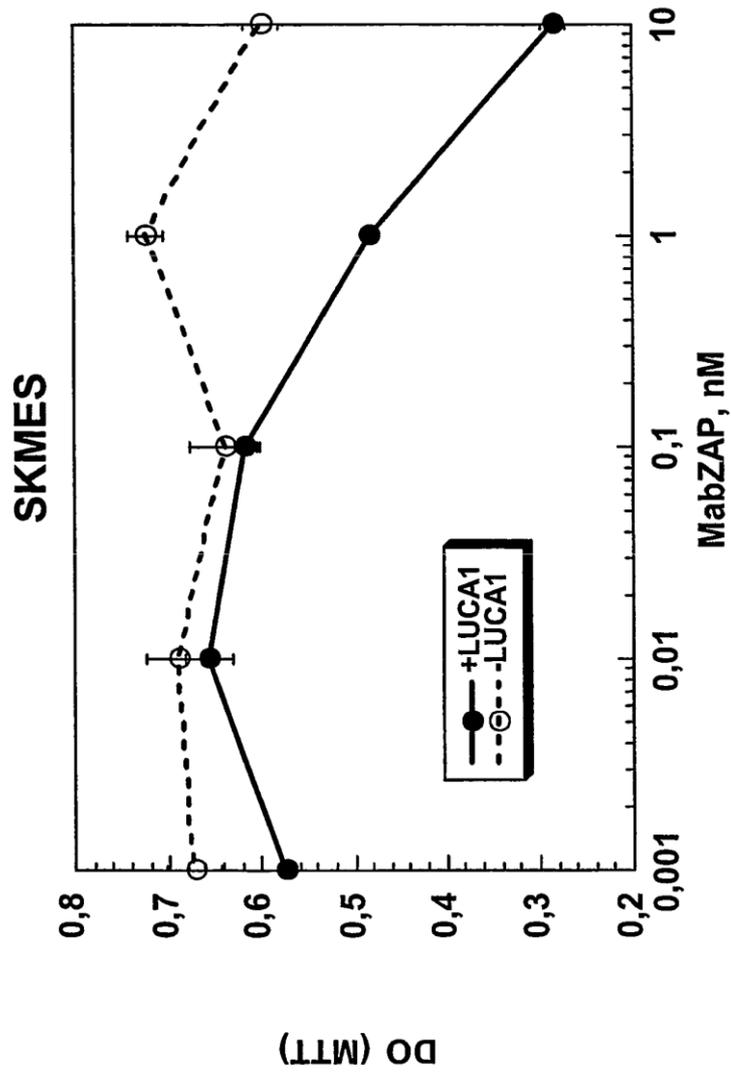


FIGURA 1

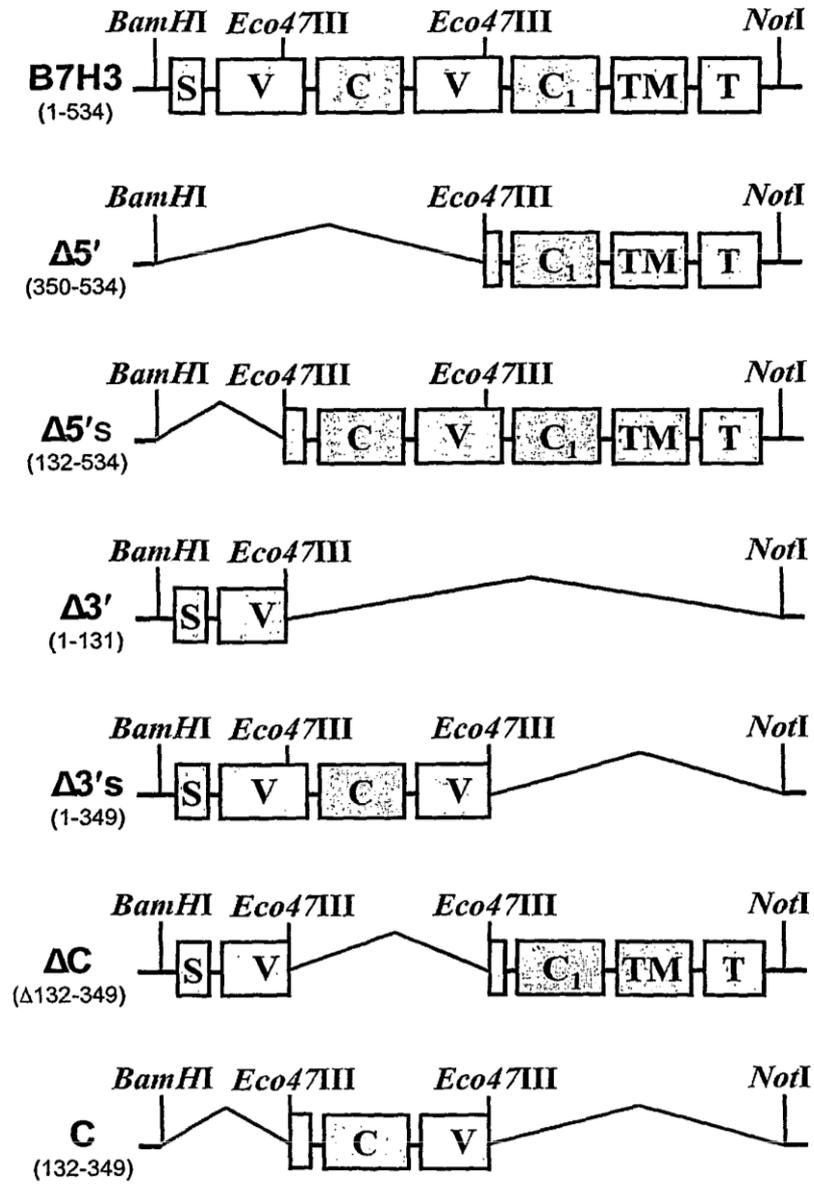


FIGURA 2