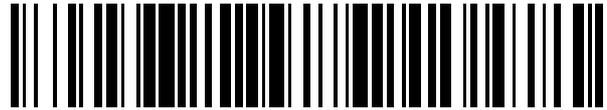


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 103**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006 E 06840528 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **08.10.2008 EP 1976987**

54 Título: **Variantes de Scratch asociados al cáncer**

30 Prioridad:

21.12.2005 US 751965 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.02.2013

73 Titular/es:

VIVENTIA BIOTECHNOLOGIES INC. (100.0%)
7895 Tranmere Drive, Suite 204
Mississauga, ON L5S 1V9 , CA

72 Inventor/es:

CHAHAL, FRANCINA, C.;
MACDONALD, GLEN y
CIZEAU, JEANNICK

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 103 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

Variantes de scratch asociadas al cáncer

CAMPO DE LA INVENCION

5 0001 La invención se refiere a un nuevo antígeno asociado con el cáncer y métodos y composiciones para el tratamiento y detección del cáncer.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

10 0002 En el año 2000, se estimaba que unos 22 millones de personas sufrían de cáncer en el mundo y 6.2 millones de muertes se atribuyeron a esta clase de enfermedad. Cada año, hay cerca de 10 millones de nuevos casos y esta estimación se espera que incremente en un 50% dentro de los próximos 15 años (OMS, Informe Mundial contra el Cáncer. Bernard W. Stewart y Paul Kleihues, eds. IARC Press, Lyon, 2003). Los tratamientos actuales del cáncer se limitan a la cirugía invasiva, terapia de radiación y quimioterapia, todos los cuales causan ya sea potencialmente graves efectos secundarios, toxicidad no específica y/o cambios traumáticos en la propia imagen corporal y/o calidad de vida. El cáncer puede ser resistente a la quimioterapia reduciendo adicionalmente opciones de tratamiento y la probabilidad de éxito. El pronóstico para algunos tipos de cáncer es peor que otros y algunos son casi siempre mortales. En adición, algunos tipos de cáncer, con una tasa de éxito del tratamiento relativamente alta siguen siendo principales causas de muerte debido a sus altas tasas de incidencia.

20 0003 Una de las causas de la insuficiencia de los tratamientos actuales contra el cáncer es la falta de selectividad para los tejidos y las células afectadas. La resección quirúrgica siempre implica la extracción de tejido aparentemente normal como un "margen de seguridad" que puede aumentar la morbilidad y riesgo de complicaciones. Asimismo, siempre elimina parte del tejido sano que puede intercalarse con las células tumorales y que podría potencialmente mantener o restablecer la función del órgano o tejido afectado. La radiación y la quimioterapia matarán o dañarán muchas células normales, debido a su modo de acción no específico. Esto puede dar lugar a graves efectos secundarios tales como náuseas severas, pérdida de peso y energía reducida, pérdida de pelo, etc., así como aumentar el riesgo de desarrollar cáncer secundario en el futuro. Un tratamiento con mayor selectividad para las células cancerosas dejaría a las células normales sin daño mejorando así los resultados, el perfil de efectos secundarios y la calidad de vida.

25 0004 La selectividad del tratamiento del cáncer puede mejorarse mediante focalizando moléculas que son específicas a las células cancerosas y no se encuentra en las células normales. Estas moléculas pueden usarse luego como una diana para el diagnóstico o terapia basados en anticuerpos o para fármacos capaces de alterar sus funciones.

30 0005 Lo poco que se sabe acerca de la proteína Scratch de tipo salvaje, se ha obtenido sobre la base de traducción y análisis conceptual de la secuencia de la proteína hipotética resultante. La expresión del ARNm mamífero Scratch (Scrt) se ha encontrado confinada al cerebro, la médula espinal y las recientemente diferenciadoras neuronas postmitóticas lo que sugiere un papel potencial en la diferenciación neuronal. El gen Scratch de mamíferos humanos se ha mapeado a q24.3 (cromosoma 8) Nakakura et al 2001a, PNAS vol 98 p 4010-4015 y Nakakura et al 2001. Mol. Brain. Res. Vol 95 p 162-166.

35 0006 El Scratch Mamífero comparte un dominio SNAG con otras proteínas de dedos de zinc, tales como SNAI2, SNAI3, GFII y GFIIb. Mientras que unos pocos laboratorios trabajando en dominios SNAG (Batlle E et al. 2000 Nat. Cell Biol, Vol. 2:84-89; Kataoka H et al. 2000. Nucleic Acids Res. Vol. 28:626-633; Grimes HL et al. 1996. Mol. Cell. Biol. Vol: 16:6263-6272; Hemavathy K et al. 2000. Mol. Cell. Biol. Vol: 20:5087-5095) y la funcionalidad del aparato locomotor de caracol han encontrado la sobre-expresión del gen Scrt, la presencia de la propia proteína no se ha demostrado hasta ahora. Basándose en la secuencia hipotética de la proteína, la proteína Scratch debe tener cinco dominios de dedos de zinc y un dominio SNAG responsable de una función en la represión de la transcripción. La secuencia indica que la proteína resultante sería una proteína intra-nuclear y de hecho la expresión del Scratch Mamífero recombinante se ha encontrado confinada a núcleos de células transfectadas (Nakakura et al 2001a, PNAS vol 98 p 4010-4015).

RESUMEN DE LA INVENCION

45 0007 Los presentes inventores han identificado una nueva proteína asociada al cáncer. En consecuencia, la invención proporciona un nuevo antígeno asociado al cáncer que puede usarse en el tratamiento y diagnóstico de cáncer. En particular, el antígeno se asocia con glioblastoma, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, linfoma, cáncer de colon, cáncer gástrico y/o cáncer de próstata.

50 0008 El nuevo antígeno es una variante del Scratch Mamífero. La variante tiene un dominio de transmembrana que está ausente en Scratch de tipo salvaje y como resultado la proteína de la invención es detectable en la superficie celular. En consecuencia, la invención incluye una proteína aislada que comprende, una variante asociada al cáncer del Scratch Mamífero que se expresa en la superficie de las células cancerosas. En una realización de la invención, la variante asociada

al cáncer del Scratch Mamífero comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC ID NO: 1 o una variante de la misma, o la secuencia de aminoácidos definida por la SEC ID NO: 2 o una variante de la misma.

5 0009 Otro aspecto de la invención es una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o una variante de la misma o la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o una variante de la misma, que se expresa en la superficie de las células cancerosas.

0010 La invención también incluye secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican la proteína aislada de la invención, los vectores de expresión recombinantes que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos de la invención y las células huésped que comprenden los vectores de expresión recombinantes de la invención.

10 0011 En otro aspecto de la invención, la invención incluye un método para detectar o controlar el cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de tener cáncer, que comprende la detección de la proteína aislada de la invención en una célula en la muestra, en donde el cáncer se ha indicado, si la proteína aislada es detectada en la célula.

15 0012 Además, la invención incluye métodos de detección o control del cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de tener cáncer, que comprende la detección de la expresión de la variante asociada al cáncer del Scratch Mamífero en la célula en la muestra, en donde el cáncer se ha indicado, si la expresión de la variante asociada al cáncer del Scratch Mamífero es detectada en la célula.

0013 Un aspecto adicional de la revelación es un método de tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto mediante la modulación de la función o expresión de un Scratch Mamífero en la célula cancerosa.

20 0014 La invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de las proteínas aisladas de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos aislados de la invención y/o los vectores de expresión recombinantes de la invención.

0015 Un aspecto adicional de la revelación es el uso de las proteínas aisladas de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos aislados de la invención y/o los vectores de expresión recombinantes de la invención para provocar una respuesta inmune en un sujeto.

25 0016 Otro aspecto de la invención es el uso de las proteínas aisladas de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos aislados de la invención y/o los vectores de expresión recombinantes de la invención para tratar o prevenir el cáncer.

0017 Además, la revelación incluye métodos para el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto o una célula del sujeto una cantidad eficaz de las proteínas aisladas de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos aislados de la invención y/o los vectores de expresión recombinantes de la invención.

30 0018 La revelación también incluye métodos para inducir una respuesta inmune en un sujeto contra la proteína aislada de la invención que comprenden administrar al sujeto o una célula del sujeto una cantidad eficaz de las proteínas aisladas de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos aislados de la invención y/o los vectores de expresión recombinantes de la invención.

0019 Un aspecto adicional de la invención es un método para detectar o controlar el cáncer en un sujeto, que comprende las etapas de:

- 35
- (1) poner en contacto una muestra de ensayo tomada de dicho sujeto con una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno en la célula cancerosa para producir un complejo proteína de unión -antígeno;
 - (2) medir la cantidad de complejo proteína de unión -antígeno en la muestra de ensayo, y
 - (3) comparar la cantidad de complejo proteína de unión -antígeno en la muestra de ensayo a un control.

40 0020 Otras características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos aunque indican realizaciones preferidas de la invención se dan a modo de ilustración solamente, ya que diversos cambios y modificaciones serán evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 0021 La invención será ahora descrita en relación a los dibujos en los cuales:

Figura 1 muestra las estructuras de glicano que participan en la unión de VB3-011 a la proteína de la invención. El sulfato de condroitina A, también conocido como condroitina-4-sulfato, (debido a la presencia de la molécula de sulfato en la posición

4), es una molécula lineal de D-galactosamina y ácido glucurónico de repetición (A). Cuando dos moléculas CSA de este tipo se reticulan a través de un enlace alfa 2-6, la unidad de glicano ahora representa a la reconocida por Hemaglutinina (HA) (B).

5 Figura 2 es una representación esquemática de inmovilización de reactivo HA. En el primer nivel, la especificidad de HA se mejora mediante el bloqueo de los epítomos anti-HA/proteína-G-sefarosa. En el segundo nivel, se inmoviliza con proteína-G-sefarosa, simultáneamente bloqueando cualquier no especificidad derivada debido a la etapa de acoplamiento anti-IgG. Nivel 3, la reacción con etanolamina, asegura que aparte del epítomo HA, todos los demás grupos amino reactivos están bloqueados, por lo tanto aumenta la especificidad para HA.

10 Figura 3 muestra los resultados de una purificación basada en lectina de la proteína de la invención que es detectada por VB3-011. Las lectinas Con-A y WGA debilitaron proteínas no específicas, mientras que HA debilitó sólo una proteína presente en la línea celular positiva y ausente en la negativa (Figura 3A). U87MG, U118MG y A375 presentan una única banda una vez purificadas con HA, mientras que Panc-1 y Daudi no muestran bandas detectables (Figura 3B).

15 La Figura 4 muestra la desaparición del residuo glicano debido a la degradación a temperatura ambiente. Una banda de 50 kDa observada usualmente en IP con el reactivo HA, cuando se deja asentar a temperatura ambiente durante una hora antes de la separación en SDS-PAGE, resultó en la degradación del residuo de glicano, mostrando así la presencia de una banda de proteína carente de la porción de glicano del antígeno a 36 kDa.

Figura 5 muestra la presencia de una mancha de proteína única en el complejo antígeno purificado, en Mw - 36 kDa y pI = 9,7. Esto representa un perfil de Western blot de 2D-PAGE obtenido en la purificación del antígeno VB3-011. La mancha correspondiente del gel se utiliza para fines de identificación.

20 Figura 6 y SEC ID NO: 3 muestran la cartografía completa de los péptidos obtenidos y la cobertura de secuencia de la molécula Scratch Mamífero de tipo salvaje, nº de acceso gi|13775236. Los aminoácidos subrayados representan las secuencias de aminoácidos identificadas del análisis MS.

25 Figura 7 y SEC ID NO: 4 muestran la cobertura de secuencia obtenida para gi|15928387 de la MDA-MB-435S y una comparación de secuencias BLAST para la secuencia derivada de 435S y Scr. MDA-MD-435S muestra la presencia de una versión truncada de Scratch, es decir, 17.823kDa proteína gi|15928387, con 100% de homología con las secuencias 185-366 de la molécula Scratch Mamífero de tipo salvaje.

30 Figura 8 muestra análisis TOF-MS de péptidos obtenidos a partir de línea celular A-375, para detectar la presencia de todos los iones de péptidos en la muestra. Cien análisis a 1200-1400V en el intervalo de 100-1200 amu en un nanospray estático resultaron en la recuperación de un número significativo de péptidos, que cuando se analizaron dieron un ID de proteína como Scratch Mamífero.

Figura 8A representa análisis TOF-MS con todos los iones de carga múltiple de péptidos y Figura 8B representa el espectro deconvuelto de iones de péptidos de una sola carga.

35 Figura 9 muestra análisis TOF-MS de péptidos obtenidos a partir de la línea celular U87MG, para detectar la presencia de todos los iones de péptidos en la muestra. Trescientos análisis a 1200-1400V en el intervalo de 100-1200 amu en un nanospray estático resultaron en la recuperación de un número significativo de péptidos, que cuando se analizó dio un ID de proteína como Scratch Mamífero.

Figura 9A representa el análisis TOF-MS con todos los iones de carga múltiple de péptidos y Figura 9B representa el espectro deconvuelto con iones de péptidos de una sola carga.

40 Figura 10 muestra análisis TOF-MS de los péptidos obtenidos a partir de la línea celular U118MG, para detectar la presencia de todos los iones de péptidos en la muestra. Veintisiete análisis a 1200-1400V en el intervalo de 100-1200 amu en un nanospray estático resultó en la recuperación de un número significativo de péptidos, que cuando se analizó dio un ID de proteína como Scratch Mamífero.

Figura 10A representa el análisis TOF-MS con todos los iones de carga múltiple de péptidos y Figura 10B representa el espectro deconvuelto con iones de péptidos de una sola carga.

45 Figura 11 y SEC ID NO: 1 muestran la cobertura de secuencia de los péptidos recuperados del análisis de espectrometría de masa como se indica en la Tabla 2. Un total de 18 péptidos fueron recuperados de la digestión triptica en-gel y se obtuvo 67% de cobertura de la proteína. Secuencias subrayadas representan las secuencias de péptidos recuperadas. El péptido resaltado incluye secuencias nuevas. Específicamente, las secuencias en negrita son las nuevas secuencias y los que están en cursiva representan coincidencias exactas con Scratch Mamífero.

Figura 12 muestra los resultados de huellas digitales de masas de péptidos para los péptidos recuperados de VB3-011Ag. Las puntuaciones de proteínas superiores a 77 se consideraron significativas. Los únicos identificadores de proteína importantes observados señalaron al antígeno conocido como Scratch Mamífero con una puntuación de 149.

5 Figura 13 muestra que el antígeno identificado, Scratch Mamífero, tiene una puntuación significativa de 149. Debido a la naturaleza del servidor de base de datos y la similitud/homología de proteínas enlazadas, todas las isoformas de esta proteína se consideraron positivas. Fragmentación MS/MS e identidad de péptidos confirma que el antígeno es Scratch Mamífero.

Figura 14 muestra la fragmentación de iones MS/MS del péptido neutro Mr. 2402.978172, apareciendo como una molécula triplemente cargada (802.00000, 3+). La secuencia del péptido coincidía exactamente con el péptido de Scratch.

10 Figura 15 muestra la fragmentación de iones MS/MS del péptido neutro Mr. 2134,985448, apareciendo como una molécula de doble carga (1068.500000, 2+). Las regiones flanqueantes del péptido recuperado coincidían exactamente con el péptido de Scratch, sin embargo el resto de la secuencia no mostró más del 40% de homología en la información de la secuencia.

15 Figura 16 muestra fotografías representativas de tinción inmunohistoquímica de VB3-011 del tejido neuroblastoma (AC) y el tejido de melanoma (DF). Las secciones de tejido son, (A) - Neuroblastoma en etapa temprana (Etapa I, II, III no N-myc amplificado), 3+; (B) - Neuroblastoma no N-myc amplificado de Etapa IV, 2+; (C) - Neuroblastoma n-myc amplificado de Etapa IV, 3+. (D) - Melanoma en etapa temprana (Etapa I - III), 3+, (E) - Melanoma en Etapa IV, 3+; (F) - enfermedad metastásica, 3+. Todas las fotografías se muestran con una ampliación de 400X.

Figura 17 y SEC ID NOS: 5 y 3 muestran un mapa de restricción de Scratch-1.

20 Figura 18 muestra la citotoxicidad *in vitro* de VB6 -011 en un ensayo MTS de VB6-011 con células antígeno-positivas MB-435S (círculo abierto) y células antígeno-negativas Panc-1 (círculo negro). Las células fueron sembradas a 1000 células por pocillo, incubadas con las proteínas Fab-de-bouganin purificadas. Después de la incubación de 5 días, la viabilidad celular se midió y se determinó CI_{50} .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

(A) Definiciones

25 0022 El término "una célula" incluye una sola célula, así como una pluralidad o población de células. La administración de un agente (tal como una proteína asociada al cáncer) a una célula incluye las administraciones *in vitro* e *in vivo*.

30 0023 El término "administrado sistémicamente" como se usa aquí, significa que la terapéutica inmunconjugada y/u otro tipo de terapéutica de cáncer se puede administrar sistémicamente de una manera conveniente, tal como por inyección (subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc), administración oral, inhalación, administración transdérmica o aplicación tópica (por ejemplo, crema o pomada tópica, etc), aplicaciones de supositorios, o por medio de un implante. Un implante puede ser de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Los supositorios generalmente contienen ingredientes activos en el intervalo de 0.5% a 10% en peso.

0024 El término "aminoácido" incluye todos los aminoácidos naturales así como aminoácidos modificados.

35 0025 El término "anticuerpo" como se usa aquí pretende incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede ser de fuentes recombinantes y/o producido en animales transgénicos. El término "fragmento de anticuerpo" como se usa aquí está destinado a incluir fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minibodies, diacuerpos, y multímeros del mismo y fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos pueden ser fragmentados utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, fragmentos F(ab')₂ pueden ser generados por el tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ puede ser tratado para reducir los puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede llevar a la formación de fragmentos Fab. Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minibodies, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también pueden ser sintetizados mediante técnicas recombinantes.

45 0026 Por "al menos condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" se entiende que se seleccionan condiciones que promueven la hibridación selectiva entre dos moléculas complementarias de ácidos nucleicos en solución. La hibridación puede ocurrir a toda o una porción de una molécula de secuencia de ácido nucleico. La porción de hibridación es típicamente al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30, 40 o 50) nucleótidos de longitud. Los expertos en la materia reconocerán que la estabilidad de un dúplex de ácido nucleico, o híbridos, está determinada por la T_m , que en tampones que contienen sodio es una función de la concentración de iones de sodio y la temperatura ($T_m = 81.5^{\circ}C - 16.6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41\%(G+C) - 600/l$), o ecuación similar). Por consiguiente, los parámetros en las condiciones de lavado que determinan la estabilidad híbrida son la concentración de iones de sodio y la temperatura. Con el fin de identificar moléculas que son

- similares, pero no idénticas, a una molécula de ácido nucleico conocida puede suponerse que un desajuste de 1% resultará en aproximadamente una disminución de 1°C en T_m, por ejemplo, si las moléculas de ácidos nucleicos se busca que tengan una identidad > 95%, la temperatura de lavado final se reducirá en unos 5°C. Basándose en estas consideraciones los expertos en la materia será capaz de seleccionar fácilmente las condiciones apropiadas de hibridación. En realizaciones preferidas, son seleccionadas condiciones estrictas de hibridación. A modo de ejemplo las siguientes condiciones se pueden emplear para lograr estricta hibridación: hibridación en 5x cloruro de sodio /citrate de sodio (SSC)/5x solución Denhardt/1.0% SDS a T_m - 5°C sobre la base de la ecuación anterior, seguido por un lavado 0.2x de SSC/0.1% de SDS a 60°C. Condiciones de hibridación moderadamente rigurosas incluyen una etapa de lavado en 3x SSC a 42°C. Se entiende, sin embargo, que interpretaciones estrictas equivalentes se pueden conseguir usando tampones, sales y temperaturas alternativos. Orientación adicional con respecto a las condiciones de hibridación se puede encontrar en: *Protocolos Actuales en Biología Molecular*, John Wiley & Hijos, NY, 2002, y en: Sambrook et al., *Clonación Molecular: un Manual de Laboratorio*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 0027 El término "proteína de unión" como se usa aquí se refiere a proteínas que se unen específicamente a otra sustancia tal como un antígeno asociado al cáncer de la invención. En una realización, las proteínas de unión son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.
- 0028 Por "forma biológicamente compatible adecuada para la administración in vivo" se entiende una forma de la sustancia a ser administrada en la que los efectos tóxicos son superados por los efectos terapéuticos.
- 0029 Los términos "variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero", "antígeno asociado al cáncer de la invención", "antígeno asociado al tumor de la invención" o "proteína aislada de la invención" como se utiliza aquí se refieren a una nueva variante de Scratch Mamífero que se expresa en la superficie de las células cancerosas o una variante de la misma que se expresa también en la superficie de las células cancerosas. En una realización, el nuevo antígeno asociado al cáncer tiene al menos un dominio transmembrana. En realizaciones específicas, el antígeno asociado al cáncer de Scratch Mamífero es una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC ID NO: 1 o una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC ID NO: 2.
- 0030 El término "célula cancerosa" incluye cáncer o células que forman tumores, células transformadas o una célula que es susceptible de convertirse en un cáncer o célula que forma un tumor.
- 0031 Una "sustitución conservadora de aminoácidos", como se usa aquí, es una en la que se sustituye un residuo de aminoácido con otro residuo de aminoácido sin suprimir las propiedades deseadas de la proteína.
- 0032 El término "control" como se usa aquí se refiere a una muestra de un sujeto o un grupo de sujetos que o bien son conocidos por tener cáncer o por no tener cáncer.
- 0033 El término "sistema de liberación controlada" como se usa significa que la terapéutica in vivo puede ser administrada de una forma controlada. Por ejemplo, una microbomba puede suministrar dosis controladas directamente en la zona del tumor, con lo que se regula finamente el tiempo y la concentración de la composición farmacéutica (ver, por ejemplo, Goodson, 1984, en *Aplicaciones Médicas de Liberación Controlada*, vol. 2, pp. 115-138).
- 0034 El término "derivado de un péptido" se refiere a un péptido que tiene uno o más residuos químicamente derivados por reacción de un grupo lateral funcional. Tales moléculas derivadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que los grupos amino libres han sido derivados para formar clorhidratos de amina, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoilo, grupos t-butiloxycarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Grupos carboxilo libres pueden ser derivados para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Grupos hidroxilo libres pueden ser derivados para formar derivados O-acilo o Oalquilo. El nitrógeno de imidazol de histidina puede ser derivado para formar N-im-bencilhistidina. También se incluyen como derivados aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo: 4-hidroxi prolina puede ser sustituido por prolina; 5-hidroxi lisina puede ser sustituido por lisina; 3-metilhistidina puede ser sustituido por histidina; homoserina puede ser sustituido por serina; y ornitina puede ser sustituido por lisina.
- 0035 La frase "detección o control del cáncer" se refiere a un método o proceso para determinar si un sujeto tiene o no tiene cáncer, la extensión del cáncer, la gravedad del cáncer y/o grado del cáncer.
- 0036 El término "administración directa", como se usa aquí, significa que la terapia contra el cáncer se puede administrar, sin limitación, intratumoralmente, intravascularmente, y peritumoralmente. Por ejemplo, la terapia contra el cáncer puede ser administrada por una o más inyecciones directas en el tumor, por perfusión continua o discontinua en el tumor, por introducción de un depósito de la terapéutica del cáncer, por introducción de un aparato de liberación lenta en el tumor, por introducción de una formulación de liberación lenta en el tumor, y/o por aplicación directa en el tumor. Por el modo de

administración "en el tumor," se incluye la introducción de la terapia contra el cáncer a la zona del tumor, o en un vaso sanguíneo o vaso linfático que sustancialmente fluye directamente en la zona del tumor.

0037 Como se utiliza aquí, la frase "cantidad efectiva" significa una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. Las cantidades efectivas de terapia pueden variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo, peso del animal. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas pueden ser administradas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica.

0038 El término "provocar una respuesta inmune" o "inducir una respuesta inmune" como se usa aquí significa la iniciación, activación, causa, mejora, perfección aumento de cualquier respuesta del sistema inmune, por ejemplo, ya sea de una naturaleza humoral o mediada por células. La iniciación o mejora de una respuesta inmune puede ser evaluada utilizando ensayos conocidos por los expertos en la materia incluyendo, pero no limitado a, los ensayos de anticuerpos (por ejemplo ensayos ELISA), ensayos de antígenos de citotoxicidad específicos y la producción de citoquinas (por ejemplo ensayos ELISPOT). Preferiblemente, las proteínas aisladas, secuencias de ácido nucleico o vectores de expresión recombinantes de la presente invención, y el método de la presente invención, desencadena o mejora una respuesta inmune celular, más preferiblemente una respuesta de células T.

0039 El término " anticuerpo VB3-011 " como se usa aquí se refiere a un anticuerpo con la región variable del anticuerpo descrito en WO 97/044461 que se ha demostrado que se une específicamente a una variedad de células cancerosas y no se une significativamente a los tejidos normales o células.

0040 El término "secuencias de ácidos nucleicos aislados" como se usa aquí se refiere a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos, u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Un ácido nucleico aislado es también sustancialmente libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) del que se deriva el ácido nucleico. El término "ácido nucleico" está destinado a incluir ADN y ARN y puede ser bicatenario o monocatenario.

0041 El término "proteínas aisladas" se refiere a una proteína sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Incluye el nuevo antígeno asociado al cáncer de la invención.

0042 "Scratch Mamífero" (gij13775236; gij46397014; gij13129535) es una proteína codificada por un gen que se ha mapeado a q24.3 del cromosoma humano 8. A partir del análisis de la secuencia de la proteína hipotética basada en la traducción conceptual, Scratch Mamífero tiene 5 dominios de dedos de zinc y un dominio SNAG. Se piensa que es una proteína intranuclear. La secuencia de la proteína hipotética se muestra en SEC ID NO: 3.

0043 El término "secuencia de ácido nucleico" como se usa aquí se refiere a una secuencia de nucleósido o monómeros de nucleótidos que consisten en bases que ocurren naturalmente, enlaces de azúcares e intersugar (esqueleto). El término también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros de origen no natural o porciones de los mismos. Las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases de origen natural, incluyendo adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias pueden contener también bases modificadas. Ejemplos de tales bases modificadas incluyen aza y deaza adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina.

0044 El término "muestra" como se usa aquí se refiere a cualquier muestra de fluido, célula o tejido de un sujeto que puede ser ensayada para cáncer.

0045 El término "identidad de secuencia" como se usa aquí se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos. Con el fin de determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de polipéptidos, las secuencias de aminoácidos de estas dos secuencias están alineadas, preferiblemente utilizando el algoritmo de Clustal W (Thompson, JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994, Nucleic Acids Res. 22 (22): 4673-4680), junto con la matriz de puntuación BLOSUM 62 (Henikoff S. y Henikoff J.G., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10915-10919) y una penalización de abertura del espacio de 10 y penalización de extensión del espacio de 0.1, de modo que la coincidencia de orden más alta se obtiene entre dos secuencias en donde al menos 50% de la longitud total de una de las secuencias está implicada en la alineación. Otros métodos que pueden usarse para alinear secuencias son el método de alineación de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 1970, 48: 443), según fue revisado por Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2: 482) de modo que la coincidencia de orden más alta se obtiene entre las dos secuencias y el número de aminoácidos idénticos se determina entre las dos secuencias. Otros métodos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos son generalmente reconocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, los descritos por Carrillo y Lipton (SIAM J. Applied Math., 1988, 48:1073) y los descritos en Biología Molecular Computacional, Lesk, e.d. Oxford University Press, Nueva York, 1988, Biocomputación: Informática y Proyectos de Genómica. En general, los programas de ordenador serán

empleados para este tipo de cálculos. Los programas de ordenador que pueden usarse al respecto incluyen, pero no se limitan a, GCG (Devereux et al., Nucleic Acids Res., 1984, 12: 387). BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., J. Molec. Biol., 1990: 215: 403).

- 5 0046 El término "sujeto" como se usa aquí se refiere a cualquier miembro del reino animal, preferiblemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. En una realización preferida, el sujeto es sospechoso de tener o tiene cáncer.
- 0047 Como se utiliza aquí, la frase "tratar o prevenir cáncer" se refiere a inhibir la replicación de células cancerosas, prevenir la transformación de una célula en una célula formadora de cáncer, inhibir la propagación del cáncer (metástasis), inhibir el crecimiento del tumor, reducir el número de células cancerosas o el crecimiento del tumor, disminuir el grado de malignidad de un cáncer (por ejemplo, diferenciación aumentada), o mejorar los síntomas relacionados con el cáncer.
- 10 0048 El término "variante" como se usa aquí incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la presente invención que realizan sustancialmente la misma función que las proteínas o moléculas de ácidos nucleicos de la invención en sustancialmente la misma manera. Por ejemplo, variantes de proteínas de la invención incluyen, sin limitación, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Variantes de las proteínas de la invención también incluyen adiciones y supresiones a las proteínas de la invención. Además, las secuencias de péptidos variantes y de nucleótidos variantes incluyen análogos y derivados de los mismos. Una variante del antígeno asociado al cáncer de la invención significa una secuencia de proteína que se expresa en células cancerosas pero no en células normales.
- 15

(B) Nuevo Antígeno Asociado al Cáncer

- 20 0049 La invención proporciona un nuevo antígeno asociado al cáncer que se expresa en la superficie de las células cancerosas y no es significativamente expresado en la superficie de las células normales. El nuevo antígeno asociado al cáncer es una variante de Scratch Mamífero. Tiene un dominio de transmembrana que no está presente en Scratch Mamífero. Una secuencia del dominio de transmembrana se muestra en SEC ID NO: 2. Una secuencia de la variante asociada al cáncer se muestra en SEC ID NO: 1.
- 25 0050 En una realización, la invención proporciona una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 1 o una variante de la misma. En otra realización, la invención proporciona una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 2. o una variante de la misma.
- 30 0051 El nuevo antígeno asociado al cáncer es una variante de Scratch Mamífero que se expresa en la superficie de las células cancerosas. En consecuencia, la invención proporciona una proteína aislada que comprende una variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero, en donde la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero se expresa en la superficie de las células cancerosas. En una realización, la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero comprende la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 1. En otra realización, la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero comprende la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 2.
- 35 0052 Una persona experta en la materia apreciará que la invención incluye variantes a las secuencias de aminoácidos de SEC ID NOS: 1-2 en donde tales variantes son también antígenos asociados con el cáncer. Las variantes incluyen equivalentes químicos a las secuencias descritas por la presente invención. Dichos equivalentes incluyen proteínas que realizan sustancialmente la misma función como las proteínas específicas aquí descritas sustancialmente de la misma manera. Por ejemplo, equivalentes incluyen, sin limitación, sustituciones conservadoras de aminoácidos.
- 40 0053 En una realización, las secuencias variantes de aminoácidos de las proteínas aisladas de la invención tienen al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, y aún más preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NOS: 1 o 2.
- 45 0054 La invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica las proteínas aisladas de la invención. En una realización, el ácido nucleico aislado tiene la secuencia mostrada en SEC ID NO: 6. Además, la invención incluye variantes a las secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican las proteínas aisladas de la invención. Por ejemplo, las variantes incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas aisladas de la invención al menos bajo condiciones de hibridación moderadamente severas. Las secuencias de ácidos nucleicos variantes codificarán una proteína que es un antígeno asociado al cáncer.
- 50 0055 La invención incluye el uso de las proteínas aisladas o antígenos asociados al cáncer y las correspondientes secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el uso de las proteínas aisladas de la invención para generar proteínas de unión e inmunocombinados que pueden usarse para tratar o prevenir el cáncer o que pueden utilizarse para detectar o controlar el cáncer en un sujeto. En consecuencia, la invención incluye el uso de las proteínas aisladas y secuencias de ácidos nucleicos de la invención para tratar o prevenir el cáncer y en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer o para el diagnóstico del cáncer.

(C) Composiciones Farmacéuticas, Métodos y Usos del Nuevo Antígeno Asociado al Cáncer

5 0056 La invención proporciona un nuevo antígeno asociado al cáncer que se expresa en la superficie de las células cancerosas y no se expresa significativamente en la superficie de las células normales. Así, el nuevo antígeno asociado al cáncer puede usarse en terapias para tratar y prevenir el cáncer, incluyendo el uso de las proteínas aisladas de la invención para provocar una respuesta inmune *in vivo*. Además, la invención incluye métodos de diagnóstico para el cáncer que comprenden la detección del nuevo antígeno asociado al cáncer.

10 0057 El cáncer puede ser cualquier cáncer que expresa el antígeno asociado al cáncer de la invención en su superficie celular. En una realización de la invención, el cáncer incluye, sin limitación, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de próstata, así como cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de células escamosas, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama (como carcinoma ductal, lobular y de pezón), cáncer de pulmón, linfoma no-Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia (como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, y leucemia mielógena crónica), cáncer cerebral, neuroblastoma, sarcoma, cáncer de recto, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, plasmocitoma, linfoma y melanoma. En una realización preferida, el cáncer incluye, sin limitación, glioblastoma, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, 15 cáncer de ovario, linfoma, cáncer de colon, cáncer gástrico y/o cáncer de próstata.

(i) Composiciones Farmacéuticas

20 0058 Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de la proteína aislada de la invención en una mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del ácido nucleico aislado de la invención en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado. Un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del vector de expresión recombinante de la invención en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado.

0059 Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para tratar o prevenir el cáncer. Además, las composiciones farmacéuticas pueden usarse para provocar una respuesta inmune en un sujeto contra una proteína aislada de la invención.

25 0060 Las composiciones descritas aquí se pueden preparar por métodos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden ser administrados a sujetos, de tal manera que una cantidad efectiva de la sustancia activa se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Ciencias Farmacéuticas de Remington (Ciencias Farmacéuticas de Remington, 20 ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, EE.UU., 2000). Sobre esta base, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, 30 soluciones de las sustancias en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenidas en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isoosmóticas con los fluidos fisiológicos.

35 0061 La inmunogenicidad puede mejorarse significativamente si los agentes inmunizantes (es decir, la proteína aislada de la invención, y/o secuencias de ácido nucleico que codifican en consecuencia, y/o vectores de expresión recombinantes) y/o composición están, independientemente del formato de administración, co-inmunizados con un adyuvante. Comúnmente, los adyuvantes se utilizan como una solución 0.05 a 1.0 por ciento en tampón fosfato salino. Los adyuvantes mejoran la inmunogenicidad de un inmunógeno, pero no son necesariamente inmunogénicos en sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el inmunógeno localmente cerca del sitio de administración para producir un efecto de depósito para facilitar una liberación lenta y sostenida de inmunógeno a células del sistema inmune. Los adyuvantes también pueden 40 atraer células del sistema inmune a un depósito de inmunógeno y estimular tales células para provocar la respuesta inmune. Por ello, las realizaciones de esta invención abarcan composiciones farmacéuticas que además comprenden adyuvantes.

45 0062 Los adyuvantes se han utilizado durante muchos años para mejorar las respuestas inmunes del huésped a, por ejemplo, las vacunas. Los adyuvantes intrínsecos (como los lipopolisacáridos) normalmente son los componentes de bacterias muertas o atenuadas utilizadas como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que están típicamente ligados no covalentemente a antígenos y están formulados para mejorar las respuestas inmunes del huésped. Así, han sido identificados adyuvantes que potencian la respuesta inmune a antígenos administrados por vía parenteral. Algunos de estos adyuvantes son tóxicos, no obstante, y pueden causar efectos secundarios indeseables haciéndolos inadecuados para su uso en humanos y muchos animales. De hecho, sólo se utilizan habitualmente hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio (comúnmente referidos colectivamente como alumbre) como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. La eficacia de alumbre en el aumento de las respuestas de anticuerpos a los toxoides diftérico y tetánico está 50 bien establecida. No obstante, tiene limitaciones. Por ejemplo, el alumbre es ineficaz para la vacunación contra la gripe y provoca de manera desigual una respuesta inmune mediada por células con otros inmunógenos. Los anticuerpos provocados por antígenos alumbre-adyuvante son principalmente del isotipo IgG1 en el ratón, que puede no ser óptimo para la protección por parte de algunos agentes de vacunación.

- 0063 Una amplia gama de adyuvantes extrínsecos puede provocar potentes respuestas inmunes frente a inmunógenos. Estos incluyen saponinas complejadas a antígenos de proteínas de membrana (complejos inmunoestimulantes), polímeros plurónicos con aceite mineral, aceite de micobacterias muertas y mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos tales como muramil dipéptido (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A, y liposomas.
- 5 0064 En un aspecto de esta invención, los adyuvantes útiles en cualquiera de las realizaciones de la invención aquí descrita son como sigue. Los adyuvantes para la inmunización parenteral incluyen compuestos de aluminio (como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, y fosfato de aluminio hidroxido). El antígeno se puede precipitar con, o adsorberse sobre, el compuesto de aluminio según protocolos estándar. Otros adyuvantes tales como RIBI (ImmunoChem, Hamilton, MT) también pueden usarse en administración parenteral.
- 10 0065 Los adyuvantes para la inmunización mucosa incluyen toxinas bacterianas (por ejemplo, toxina del cólera (CT), toxina E. coli lábil al calor (LT), toxina de Clostridium difficile A y toxina de pertussis (PT), o combinaciones, subunidades, toxoides, o mutantes de las mismas). Por ejemplo, una preparación purificada de la toxina del cólera nativa de la subunidad B (CTB) puede ser de utilidad. Son también adecuados fragmentos, homólogos, derivados, y fusión de cualquiera de estas toxinas, siempre que conserven la actividad adyuvante. Preferiblemente, se usa un mutante que tiene toxicidad reducida. Mutantes adecuados han sido descritos (por ejemplo, en WO 95/17211 (Arg-7-Lys TC mutante), WO 96/6627 (Arg-192-Gly LT mutante), y WO 95/34323 (Arg-9-Lys y Glu-129-Gly PT mutante)). Mutantes adicionales LT que pueden usarse en los métodos y composiciones de la invención incluyen, por ejemplo Ser-63-Lys, Ala-69-Gly, Glu-110-Asp, y Glu-112-Asp mutantes. Otros adyuvantes (por ejemplo, un lípido monofosforil bacteriano A (MPLA) de diversas fuentes (por ejemplo, E. coli, Salmonella minnesota, Salmonella typhimurium, o Shigella flexneri, saponinas, o microesferas de polilactida glicolida (PLGA)) también se puede utilizar en administración mucosal.
- 20 0066 Adyuvantes útiles para la inmunización tanto mucosa como parenteral incluyen polifosfazeno (por ejemplo, WO 95/2415), DC-chol (3 b-(N-(N', N'-dimetil aminometano)-carbamoil) colesterol (por ejemplo, Patente US 5,283,185 y WO 96/14831) y QS-21 (por ejemplo, WO 88/9336).
- 25 0067 Un sujeto puede ser inmunizado con una composición farmacéutica que comprende una proteína aislada de la invención, una secuencia aislada de ácido nucleico de la invención y/o un vector de expresión recombinante de la invención por cualquier vía convencional, como conoce un experto en la materia. Esto puede incluir, por ejemplo, inmunización a través de una superficie de la mucosa (por ejemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, pulmonar, tracto intestinal, rectal, vaginal o urinaria), a través de la vía parenteral (por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, o intraperitoneal) o intranodalmente. Las vías preferidas dependen de la elección del inmunógeno, como será evidente para un experto en la materia. La administración se puede lograr en una dosis única o repetida a intervalos. La dosificación apropiada depende de varios parámetros entendidos por los artesanos expertos, tales como el propio inmunógeno (es decir péptido vs. ácido nucleico (y más específicamente un tipo de éstos)), la vía de administración y la situación del animal a vacunar (peso, edad y similares).
- 30 0068 Una persona experta en la materia apreciará que las composiciones farmacéuticas se pueden formular para administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para administración *in vivo*. Las sustancias se pueden administrar a organismos vivos incluyendo seres humanos y animales. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se define como una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de una sustancia puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la proteína recombinante de la invención para producir una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas pueden ser administradas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica.
- 35 0069 La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sistémicamente. La preparación farmacéutica puede administrarse directamente al sitio del cáncer. Dependiendo de la vía de administración, la composición farmacéutica puede estar recubierta de un material para proteger la composición de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.
- 40 0070 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica se suministra al sujeto por administración directa. La invención contempla la composición farmacéutica siendo administrada por lo menos en una cantidad suficiente para alcanzar el punto final, y si es necesario, comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 0071 De acuerdo con otro aspecto, la composición farmacéutica puede administrarse *in vitro*. Por ejemplo, los linfocitos pueden ser retirados de un sujeto con cáncer y estimulados *in vitro* con la composición y luego reinfundidos en el sujeto.
- 50

0072 La invención también proporciona métodos para reducir el riesgo de complicaciones post-quirúrgicas que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la invención antes, durante o después de la cirugía para tratar el cáncer.

5 0073 Las composiciones farmacéuticas que incluyen, sin limitación, polvos liofilizados o soluciones o suspensiones estériles inyectables acuosas o no acuosas, que además pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven las composiciones sustancialmente compatibles con los tejidos o la sangre de un destinatario previsto. Otros componentes que pueden estar presentes en tales composiciones incluyen agua, tensioactivos (tales como Tween), alcoholes, polioles, aceites vegetales y glicerina, por ejemplo. Las soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos, tabletas, o soluciones o suspensiones concentradas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser suministradas, por ejemplo, pero no a modo de limitación, como un polvo liofilizado que se reconstituye con agua estéril o solución salina antes de su administración al sujeto.

10

0074 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen esencialmente composiciones químicamente inertes y no tóxicas que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, soluciones de glicerol, etanol, N-(1 (2,3-dioleiloxi)propil)N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosfotidil-etanolamina (DOPE) y liposomas. Tales composiciones deben contener una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, junto con una cantidad adecuada de vehículo a fin de proporcionar la forma para administración directa al sujeto.

15

0075 La composición puede estar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, las formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, etanol 2- etilarnino, histidina, procaína, etc.

20

0076 En diversas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica es directamente administrada sistémicamente o directamente a la zona del tumor(es).

25 0077 Las composiciones farmacéuticas pueden utilizarse en métodos para tratar animales, incluyendo mamíferos, preferiblemente seres humanos, con cáncer. La dosificación y el tipo de composición farmacéutica a administrar dependerán de una variedad de factores que pueden ser fácilmente controlados en sujetos humanos. Tales factores incluyen la etiología y la severidad (grado y etapa) del cáncer.

30 0078 Los resultados clínicos de tratamientos para el cáncer utilizando las composiciones farmacéuticas de la invención son fácilmente discernibles por un experto en la materia pertinente, tal como un médico. Por ejemplo, las pruebas médicas estándar para medir los marcadores clínicos de cáncer pueden ser un fuerte indicador de la eficacia del tratamiento. Tales pruebas pueden incluir, sin limitación, exploración física, escalas de rendimiento, marcadores de la enfermedad, ECG de 12 derivaciones, mediciones del tumor, biopsia de tejidos, citoscopia, citología, diámetro mayor de cálculos tumorales, radiografía, imagen digital del tumor, signos vitales, peso, registro de eventos adversos, evaluación de episodios infecciosos, evaluación de medicamentos concomitantes, evaluación del dolor, química de sangre o suero, análisis de orina, tomografía computarizada, y análisis farmacocinético. Además, los efectos sinérgicos de una terapia de combinación que comprende las composiciones farmacéuticas de la invención y otra terapia contra el cáncer pueden ser determinados por estudios comparativos con pacientes sometidos a monoterapia.

35

40 0079 Otra realización de la invención es un kit para tratar o prevenir el cáncer que comprende una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la invención, y las indicaciones para el uso de la misma para tratar el cáncer.

0080 En la mayoría de las terapias aprobadas contra el cáncer, la terapia contra el cáncer se utiliza en combinación con otras terapias anticáncer. En consecuencia, la invención proporciona un método para prevenir o tratar el cáncer utilizando las composiciones farmacéuticas de la invención en combinación con al menos una terapia contra el cáncer adicional. La otra terapia contra el cáncer se puede administrar antes de, superpuesta con, al mismo tiempo que, y/o después de la administración de la composición farmacéutica de la invención. Cuando se administran al mismo tiempo, la composición farmacéutica de la invención y la otra terapia contra el cáncer se pueden administrar en una sola formulación o en formulaciones separadas, y si es por separado, entonces opcionalmente, por diferentes modos de administración. La combinación de una o más composiciones farmacéuticas de la invención y uno u otras más terapias contra el cáncer puede actuar sinérgicamente para combatir el tumor o cáncer. Las otras terapias contra el cáncer incluyen, sin limitación, la radiación y otros agentes terapéuticos contra el cáncer. Las otras terapias contra el cáncer incluyen, sin limitación, 2,2',2"triclorotrietilamina, 6-azauridina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, 6-mercaptopurina, aceglarone, actinomicina aclacinomicinas, altretamina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, ancitabina, oligonucleótidos de angiogenina antisentido, antramcina, azacitidina, azaserina, aziridina, batimastar, oligonucleótidos bcl-2 antisentido, benzodepa,

45

50

5 bicalutamida, bisantreno, bleomicina, buserelina, busulfán, cactinomycin, calusterona, carboplatino, carboquone, carminomicina, carmofur, carmustina, carubicin, carzinoflin, clorambucil, clornafazina, acetato de clormadinona, clorozotocina, cromomicinas, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, defosfamida, demecolcina, denopterin, detorubicin, diaziquona, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, droloxifeno, dromostanolona, edatrexato, eflomitina, acetato de eliptinio, emitefur, enocitabune, epirubicina, epitiostanol, esorubicin, estramustina, etoglucid, etopósido, fadrozol, fenretinida, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido fólico, formestano, fosfestrol, fotemustina, nitrato de galio, gemcitabina, goserelina, hexestrol, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, improsulfan, interferón-alfa, interferón-beta, interferón gamma, interleuquina-2, L-asparaginasa, lentinan, letrozol, leuprolide, lomustina, lonidamina, mannomustina, marcelomicina, mecloretamina, clorhidrato óxido de mecloretamina, medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melengestrol, melfalán, menogaril, mepitiostano, metotrexato, meturedepa, miboplatin, miltefosina, mitobronitol, mitoguazone, mitolactol, mitomicinas, mitotano, mitoxantrona, mopidamol, ácido micofenólico, nilutamida, nimustina, nitracina, nogalamycin, novembichin, olivomicinas, oxaliplatino, paclitaxel, pentostatina, peplomicina, perfosfamida, fenamet, fenesterina, pipobroman, pipsulfan, pirarubicina, piritrexim, plicamicina, ácido podofilínico 2-etil-hidrazida, fosfato poliestradiol, sodio porfímero, porfiromicina, prednimustina, procabazinae, propagermanio, PSK, pteropterina, puromicina, quelamicina, ranimustina, razoxano rodorubicina, roquinimex, sizofican, sobuzoxane, espirogermanio, estreptonigrina, estreptozocina, tamoxifeno, taxotero, tegafur, temozolomida, tenipósido, ácido tenuzónico, testolacone, thiamiprina, tioguanina, tiotepa, Tomudex, topotecan, toremifeno, triaziquona, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenetiofosforamida, trilostano, trimetrexato, triptorelina, trofosfamida, trontecan, tubercidina, ubenimex, mostaza de uracilo, uredepa, uretano, vinblastina, vincristina, zinostatin, y zorubicin, arabinósido de citosina, ozogamicina, tioepa, ciclotosfamida, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, fludarabina, gemcitabina, dacarbazina, temozoamida), hexametilmelamina, LYSODREN, análogos de nucleósidos, alcaloides de plantas (por ejemplo, Taxol, paclitaxel, camptotecina, topotecan, irinotecan (CAMPTOSAR, CPT-11), vincristina, alquiloides de vinca tales como vinblastina) podofilotoxina, epipodofilotoxina, VP-16 (etopósido), citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina), doxorubicina liposomal, dihidroxianthracindiona, mitramicina, actinomicina D, aldesleukina, allutamina, biaomicina, capecitabina, carboplain, clorabusin, ciclarabina, daclinomycin, floxuridhe, acetato de lauprolida, levamisol, lomuslina, mercaptopurino, mesna, mitolanc, pegaspergasa, pentoslatina, picamicina, riuxlmab, campath-1, estraplozocina, tretinoína, oligonucleótidos antisentido VEGF, vindesina y vinorelbina. Las composiciones que comprenden uno o más agentes terapéuticos del cáncer (por ejemplo, FLAG, CHOP) también se contemplan en la presente invención. FLAG comprende fludarabina, arabinósido de citosina (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona. Para obtener una lista completa de productos terapéuticos de cáncer conocidos en la materia, ver, por ejemplo, las últimas ediciones de The Merck Index y la Physician's Desk Reference.

35 0081 Las composiciones farmacéuticas para la terapia de combinación también pueden incluir, sin limitación, antibióticos (por ejemplo, dactinomycin, bleomicina, mitramicina, antramicina), asparaginasa, Bacillus y Guerin, toxina de la difteria, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, agentes anti-mitóticos, abrina, ricina A, exotoxina de Pseudomonas, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador tisular del plasminógeno, agentes antihistamínicos, agentes contra las náuseas, etc.

40 0082 De hecho, la administración de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica de la invención a un paciente en necesidad de dicho tratamiento puede resultar en dosis reducidas de otra terapia contra el cáncer que tiene una eficacia clínica significativa. Tal eficacia de la dosis reducida de la otra terapia contra el cáncer puede no observarse si está ausente la administración con las composiciones farmacéuticas de la invención. En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para tratar un tumor o cáncer que comprende administrar una dosis reducida de otro o más agentes terapéuticos contra el cáncer.

45 0083 Además, la terapia de combinación que comprende la composición farmacéutica de la invención a un paciente en necesidad de dicho tratamiento podrá permitir tiempos de tratamiento relativamente cortos en comparación con la duración o el número de ciclos de regímenes de tratamiento estándar. En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para tratar un tumor o cáncer, que comprende administrar otro o más agentes terapéuticos contra el cáncer con duración relativamente corta y/o en menos ciclos de tratamiento.

50 0084 Así, según la presente invención, las terapias de combinación que comprenden una composición farmacéutica de la invención y otra terapia contra el cáncer pueden reducir la toxicidad (es decir, los efectos secundarios) del tratamiento total del cáncer. Por ejemplo, la toxicidad reducida, en comparación con una monoterapia u otra terapia de combinación, puede observarse al entregar una dosis reducida de una composición farmacéutica de la invención y/u otro agente terapéutico contra el cáncer, y/o cuando se reduce la duración de un ciclo (es decir, el período de una administración única o el período de una serie de estas administraciones), y/o cuando se reduce el número de ciclos.

55 0085 En consecuencia, la invención proporciona una composición farmacéutica de la invención que comprende además una o más terapias anticancerosas adicionales, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

0086 La presente descripción también proporciona un kit que comprende una cantidad efectiva de una composición farmacéutica de la invención, opcionalmente, en combinación con una u otras más terapias contra el cáncer, junto con instrucciones para el uso del mismo para tratar el cáncer.

5 0087 Como se indicó anteriormente, la terapia de combinación con una composición farmacéutica de la invención puede sensibilizar el cáncer o tumor a la administración de una terapia contra el cáncer adicional. En consecuencia, la presente invención contempla terapias de combinación para la prevención, tratamiento y/o prevenir la recurrencia del cáncer, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica de la invención antes de, después de, o simultáneamente con, una dosis reducida de un agente terapéutico contra el cáncer. Por ejemplo, el tratamiento inicial con una composición farmacéutica de la invención puede aumentar la sensibilidad de un cáncer o tumor a la estimulación subsiguiente con una dosis de terapia contra el cáncer. Esta dosis está cerca, o por debajo, del intervalo bajo de dosificaciones estándar cuando el agente terapéutico contra el cáncer se administra solo, o en ausencia de una composición farmacéutica de la invención. Cuando se administran al mismo tiempo, la composición farmacéutica de la invención puede ser administrada por separado del agente terapéutico del cáncer, y opcionalmente, por un modo diferente de administración.

15 0088 En una realización alternativa, la administración de la terapia adicional contra el cáncer puede sensibilizar el cáncer o tumor a la composición farmacéutica de la invención. En tal realización, la terapia adicional contra el cáncer se puede administrar antes de la administración de una composición farmacéutica de la invención.

0089 En una realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende cisplatino, por ejemplo, PLATINOL o PLATINOL-AQ (Bristol Myers), a una dosis que va desde aproximadamente 5 a 10, 11 a 20, 21 a 40, o 41 a 75 mg/m²/ciclo.

20 0090 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende carboplatino, por ejemplo PARAPLATIN (Bristol Myers), a una dosis que va desde aproximadamente 2 a 3, 4 a 8, 9 a 16, 17 a 35, o 36 a 75 mg/m²/ciclo.

0091 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende ciclofosfamida, por ejemplo, CITOXAN(Bristol Myers Squibb), a una dosis que va desde aproximadamente 0.25 a 0.5, 0.6 a 0.9, 1 a 2, 3 a 5, 6 a 10, 11 a 20, o 21 a 40 mg/kg/ciclo.

25 0092 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende citarabina, por ejemplo, CITOSAR-U (Farmacia & Upjohn), en una dosis que va desde aproximadamente 0.5 a 1, 2 a 4, 5 a 10, 11 a 25, 26 a 50, o 51 a 100 mg/m²/ciclo. En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende citarabina liposomal, por ejemplo, DEPOCYT (Chiron Corp.), a una dosis que va desde aproximadamente 5 a 50 mg/m²/ciclo.

30 0093 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende dacarbazina, por ejemplo, DTIC o DTICDOME (Bayer Corp.), a una dosis que va desde aproximadamente 15 a 250 mg/m²/ciclo o que va desde aproximadamente 0.2 a 2 mg/kg/ciclo.

0094 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende topotecán, por ejemplo, HYCAMTIN (SmithKline Beecham), a una dosis que va desde aproximadamente 0.1 a 0.2, 0.3 a 0.4, 0.5 y 0.8, o 0.9 a 1.5 mg/m²/ciclo. En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende irinotecán, por ejemplo, CAMPTOSAR (Farmacia & Upjohn), a una dosis que va desde aproximadamente 5 a 9, 10 a 25, o 26 a 50 mg/m²/ciclo.

35 0095 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende fludarabina, por ejemplo, FLUDARA (Berlex Laboratories), a una dosis que va desde aproximadamente 2.5 a 5, 6 a 10, 11 a 15, o 16 a 25 mg/m²/ciclo.

0096 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende citosina arabinósido (Ara-C) en una dosis que va desde aproximadamente 200 a 2000 mg/m²/ciclo, 300 a 1000 mg/m²/ciclo, 400 a 800 mg/m²/ciclo, o 500 a 700 mg/m²/ciclo.

40 0097 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende docetaxel, por ejemplo, TAXOTERE (Rhône Poulenc Rorer) a una dosis que va desde aproximadamente 6 a 10, 11 a 30, o 31 a 60 mg/m²/ciclo.

0098 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende paclitaxel, por ejemplo, TAXOL (Bristol Myers Squibb), a una dosis que va desde aproximadamente 10 a 20, 21 a 40, 41 a 70, ó 71 a 135 mg/kg/ciclo.

0099 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende 5-fluorouracilo en una dosis que va desde aproximadamente 0.5 a 5 mg/kg/ciclo, 1 a 4 mg/kg/ciclo o 2-3 mg/kg/ciclo.

45 0100 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende doxorubicina, por ejemplo, ADRIAMICIN (Farmacia & Upjohn), DOXIL (Alza), RUBEX (Bristol Myers Squibb), a una dosis que va desde aproximadamente 2 a 4, 5 a 8, 9 a 15, 16 a 30, ó 31 a 60 mg/kg/ciclo.

0101 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende etopósido, por ejemplo, VEPESID (Farmacia & Upjohn), a una dosis que va desde aproximadamente 3.5 a 7, 8 a 15, 16 a 25, o 26 a 50 mg/m²/ciclo.

- 0102 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende vinblastina, por ejemplo, VELBAN (Eli Lilly), a una dosis que va desde aproximadamente 0.3 a 0.5, 0.6 a 0.9, 1 a 2, o 3 a 3.6 mg/m²/ciclo.
- 0103 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende vincristina, por ejemplo, ONCOVIN (Eli Lilly), a una dosis que va desde aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 o 0.7 mg/m²/ciclo.
- 5 0104 En otra realización, la terapia adicional contra el cáncer comprende metotrexato a una dosis que va desde aproximadamente 0.2 a 0.9, 1 a 5, 6 a 10, o 11 a 20 mg/m²/ciclo.
- 0105 En otra realización, una composición farmacéutica de la invención se administra en combinación con al menos un inmunoterapéutico de otro tipo que incluye, sin limitación, rituxan, rituximab, campath-1, ozogamicina, y trastuzumab.
- 10 0106 En otra realización, una composición farmacéutica de la invención se administra en combinación con uno o más agentes anti-angiogénicos que incluyen, sin limitación, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, Serpina (inhibidor de la proteasa serina), anti-trombina, 29 kDa N-terminal y un 40 kDa C-terminal de fragmentos proteolíticos de fibronectina, 16 kDa fragmento proteolítico de prolactina, 7.8 kDa fragmento proteolítico de factor plaquetario-4, un péptido de 13 aminoácidos correspondiente a un fragmento de factor plaquetario-4 (Maione et al., 1991, *Cáncer Res.* 51:2077-2083), un péptido de 14 aminoácidos correspondiente a un fragmento de colágeno I (Tolsma et al., 1993, *J. Cell Biol.* 122:497-511), un péptido de 19 aminoácidos correspondiente a un fragmento de Thrombospondin I (Tolsma et al., 1993, *J. Cell Biol.* 122:497-511), un péptido de 20 aminoácidos correspondiente a un fragmento de SPARC (Sage et al., 1995, *J. Cell. Biochem.* 57:1329-1334), y una variante del mismo, incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 15 0107 En otra realización, una composición farmacéutica de la invención se administra en combinación con un régimen de terapia de radiación. La terapia también puede comprender cirugía y/o quimioterapia. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención se puede administrar en combinación con terapia de radiación y cisplatino (Platinol), fluorouracilo (5-FU, Aduvicol), carboplatino (Paraplatin), y/o paclitaxel (Taxol). El tratamiento con una composición farmacéutica de la invención puede permitir el uso de dosis más bajas de radiación y / o tratamientos de radiación menos frecuentes, que pueden, por ejemplo, reducir la incidencia de dolor de garganta severo que impide la función de tragar que potencialmente resulta en pérdida de peso o deshidratación. no deseada
- 20 0108 En otra realización, una composición farmacéutica se administra en combinación con uno o más citoquinas que incluyen, sin limitación, una linfocina, factores de necrosis tumoral, citoquina de tipo factor de necrosis tumoral, linfotóxina, interferón, proteína inflamatoria de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos monocitos, interleuquina (incluyendo, sin limitación, interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-6, interleuquina-12, interleuquina-15, interleuquina-18), y una variante de la misma, incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 25 0109 En otra realización, una composición farmacéutica de la invención se administra en combinación con una vacuna contra el cáncer o agentes biológicos, incluyendo, sin limitación, células autólogas o tejidos, células no autólogas o tejidos, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, gonadotropina coriónica humana, vacuna viva BCG, complejos micobacterias de la pared celular / ADN, proteínas de linaje de melanocitos y antígenos mutados específicos del tumor.
- 30 0110 En aún otra realización, una composición farmacéutica se administra en asociación con la terapia hormonal. Terapias hormonales incluyen, sin limitación, un agonista hormonal, un antagonista hormonal (por ejemplo, flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprolida (Lupron)), y esteroides (por ejemplo, dexametasona, retinoide, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona dehidrotosterona, glucocorticoide, mineralocorticoide, estrógeno, testosterona, progestina).
- 35 0111 En aún otra realización, una composición farmacéutica se administra en asociación con un programa de terapia génica para tratar o prevenir el cáncer.
- 40 0112 La terapia de combinación puede por tanto aumentar la sensibilidad del cáncer o tumor a la composición farmacéutica de la invención y/o terapia adicional contra el cáncer administrada. De esta manera, pueden ser posibles ciclos más cortos de tratamiento lo que reduce los eventos tóxicos. La duración del ciclo puede variar de acuerdo con la terapia contra el cáncer específica en uso. La invención también contempla la administración continua o discontinua, o dosis diarias divididas en varias administraciones parciales. Una duración de ciclo apropiada para un tipo específico de terapia contra el cáncer será apreciada por el experto en la materia, y la invención contempla la evaluación continua de programas de tratamiento óptimos para cada terapia contra el cáncer. Pautas específicas para expertos en la técnica son conocidas en la materia. Ver, por ejemplo, Therasse et al., 2000, "Las nuevas directrices para evaluar la respuesta al tratamiento en los tumores sólidos. Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer, Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, Instituto Nacional del Cáncer de Canadá," *J Natl Cáncer Inst.* Feb 2;92(3): 205-16.
- 45 0113 Se contempla que una composición farmacéutica de la invención se puede administrar por cualquier método adecuado, tal como inyección, administración oral, por inhalación, transdérmica o intratumoral, mientras que cualquier otro tipo de terapia contra el cáncer puede ser suministrado al paciente del mismo o de otro modo de administración. Además,
- 50

cuando se pretende administrar a un sujeto múltiples terapias contra el cáncer, una composición farmacéutica de la invención y uno o más de los otros agentes terapéuticos contra el cáncer pueden ser entregados por un método, mientras que otros agentes terapéuticos contra el cáncer pueden ser entregados por otro modo de administración.

5 0114 La descripción también proporciona kits que comprenden una cantidad efectiva de una composición farmacéutica de la invención, opcionalmente, en combinación con uno u otros más agentes terapéuticos contra el cáncer, junto con instrucciones para el uso de los mismos.

(ii) Métodos de Diagnóstico

10 0115 El nuevo antígeno asociado al cáncer se expresa en células cancerosas y no es significativamente expresado en células normales, por lo tanto la detección del nuevo antígeno asociado al cáncer se puede utilizar como un método de diagnóstico para el cáncer.

0116 Una realización de la invención es un método para detectar o controlar el cáncer en un sujeto que tiene o sospechoso de tener cáncer, que comprende la detección de una variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero en una célula en la muestra, en donde el cáncer se ha indicado, si la variante asociado al cáncer Scratch Mamífero es detectada en la célula.

15 0117 En una realización de la invención, se proporciona un método para detectar células cancerosas en un sujeto que comprende:

- (a) proporcionar una muestra del sujeto;
- (b) detectar el nivel del antígeno asociado al cáncer en la muestra, y
- (c) comparar el nivel del antígeno asociado al cáncer en la muestra a una muestra de control, en donde niveles incrementados del antígeno asociado al cáncer en comparación con el control indican que el sujeto tiene cáncer.

20 0118 La frase "detectar el nivel del antígeno asociado al cáncer" incluye detectar los niveles del antígeno asociado al cáncer, así como detectar los niveles de moléculas de ácidos nucleicos que codifican el antígeno asociado al cáncer. Ejemplos de métodos para detectar proteínas y ácidos nucleicos se discuten con mayor detalle a continuación.

0119 El antígeno asociado al cáncer preferiblemente comprende la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 2, más preferiblemente, SEC ID NO: 1.

25 0120 El término muestra puede ser cualquier muestra que contiene células cancerosas que se desea detectar incluyendo pero no limitado a, fluidos biológicos (incluyendo sangre, suero, ascitis), extractos de tejidos, células recién cosechadas y lisados de células que han sido incubados en cultivos celulares.

30 0121 El término "muestra de control" incluye cualquier muestra que puede usarse para establecer un nivel normal o base, y puede incluir muestras de tejido tomadas de personas sanas o muestras que imitan fluido fisiológico. La muestra de control también puede ser una muestra del sujeto tomada en otro momento, por ejemplo antes de la terapia del cáncer.

35 0122 El método de la invención puede utilizarse en el diagnóstico y estadificación del cáncer. La invención también puede utilizarse para controlar la progresión de un cáncer y para comprobar si un tratamiento en particular es efectivo o no. En particular, el método puede usarse para confirmar la ausencia o la eliminación de todo el tejido tumoral después de la cirugía, quimioterapia contra el cáncer, y / o terapia de radiación. Los métodos pueden además usarse para controlar la quimioterapia del cáncer y la reaparición del tumor.

0123 En una realización, la invención contempla un método para el control de la progresión del cáncer en un sujeto, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra de un sujeto;
- (b) determinar el nivel de expresión del antígeno asociado al cáncer en la muestra;
- (c) repetir las etapas (a) y (b) en un momento posterior y comparar el resultado de la etapa (b) con el resultado de la etapa (c) en donde una diferencia en el nivel de expresión del antígeno asociado al cáncer es indicativa de la progresión del cáncer en el sujeto.

45 0124 En particular, niveles incrementados del antígeno asociado al cáncer en el momento posterior pueden indicar que el cáncer está progresando y que el tratamiento (si es aplicable) no está siendo eficaz. En contraste, niveles disminuidos del antígeno asociado al cáncer en el momento posterior pueden indicar que el cáncer está en regresión y que el tratamiento (si es aplicable) es eficaz.

0125 Una serie de técnicas se puede utilizar para detectar en una célula la variante de Scratch Mamífero asociada al cáncer. Por ejemplo, pueden usarse proteínas de unión tales como anticuerpos que se unen a la variante de Scratch Mamífero asociada al cáncer en inmunoensayos para detectar expresión en la superficie celular de la variante asociada al

cáncer de Scratch Mamífero. Una persona experta en la materia apreciará que puede usarse una serie de técnicas para detectar y/o cuantificar la expresión en la superficie celular de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero, incluyendo, sin limitación, Western blots, inmunoprecipitación seguida por SDS-PAGE, inmunocitoquímica, FACS, matrices de proteína, y similares.

5 Métodos para Detectar Moléculas de Ácido Nucleico

0126 En una realización, los métodos de la invención implican la detección de moléculas de ácido nucleico que codifican el antígeno asociado al cáncer. Los expertos en la materia pueden construir sondas de nucleótidos para su uso en la detección de secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno asociado al cáncer en las muestras. Sondas adecuadas pueden prepararse basándose en la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID NO: 6 o SEC ID NO: 25. Las sondas adecuadas incluyen moléculas de ácidos nucleicos basados en secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos 5 aminoácidos secuenciales de regiones del antígeno asociado al cáncer, preferiblemente comprenden de 15 a 30 nucleótidos. Una sonda de nucleótidos puede etiquetarse con una sustancia detectable tal como un marcador radiactivo que proporcione una señal adecuada y tenga suficiente vida media tales como ³²P, ³H, ¹⁴C o similares. Otras sustancias detectables que pueden usarse incluyen antígenos que son reconocidos por un anticuerpo específico etiquetado, compuestos fluorescentes, enzimas, anticuerpos específicos para un antígeno etiquetado, y compuestos luminiscentes. Una etiqueta adecuada puede ser seleccionada teniendo en cuenta el ritmo de hibridación y la unión de la sonda al nucleótido a detectar y la cantidad de nucleótidos disponibles para hibridación. Sondas etiquetadas pueden hibridarse a ácidos nucleicos en soportes sólidos tales como filtros de nitrocelulosa o membranas de nilón como se describe en general en Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed.). Las sondas de ácidos nucleicos pueden usarse para detectar genes, preferiblemente en células humanas, que codifican el antígeno asociado al cáncer. Las sondas de nucleótidos pueden ser también útiles en el diagnóstico de trastornos que implican el antígeno asociado al cáncer, en el control de la progresión de estos trastornos, o en el seguimiento de un tratamiento terapéutico. En una realización, las sondas se utilizan en el diagnóstico de, y en el control de la progresión del cáncer, preferiblemente el cáncer ginecológico.

0127 La sonda puede usarse en técnicas de hibridación para detectar genes que codifican el antígeno asociado al cáncer. La técnica generalmente implica poner en contacto e incubar ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ADN recombinante, genes clonados) obtenidos a partir de una muestra de un sujeto u otra fuente celular con una sonda bajo condiciones favorables para el recocido específico de las sondas a secuencias complementarias en los ácidos nucleicos. Después de la incubación, los ácidos nucleicos no recocidos se retiran, y se detecta la presencia de ácidos nucleicos que se han hibridado con la sonda si hay alguno.

0128 La detección de moléculas de ácido nucleico puede implicar la amplificación de secuencias de genes específicos usando un método de amplificación como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), seguido por el análisis de las moléculas amplificadas utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Cebadores adecuados pueden ser rutinariamente diseñados por un experto en la materia.

0129 Las técnicas de hibridación y de amplificación descritas aquí pueden utilizarse para ensayar aspectos cualitativos y cuantitativos de la expresión de genes que codifican el antígeno asociado al cáncer. Por ejemplo, puede aislarse ARN de un tipo de célula o tejido conocido por expresar un gen que codifica el antígeno asociado al cáncer, y ensayarse utilizando técnicas de hibridación (por ejemplo, análisis Northern estándar) o PCR que son conocidos en la materia.

0130 Los cebadores y sondas pueden usarse en los métodos descritos anteriormente *in situ* es decir, directamente sobre secciones de tejido (fijo y/o congelado) del tejido del sujeto obtenido a partir de biopsias o resecciones.

0131 En consecuencia, la presente invención proporciona un método para detectar células cancerosas en un sujeto que comprende:

- (a) proporcionar una muestra del sujeto;
- (b) extraer moléculas de ácidos nucleicos que codifican el antígeno asociado al cáncer o porción del mismo de la muestra;
- (c) amplificar las moléculas de ácidos nucleicos extraídas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa;
- (d) determinar la presencia de moléculas de ácidos nucleicos que codifican el antígeno asociado al cáncer, y
- (e) comparar el nivel de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican el antígeno asociado al cáncer en la muestra a una muestra de control, en donde que niveles incrementados de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican el antígeno asociado al cáncer, en comparación con el control indican que el sujeto tiene cáncer.

0132 En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico codifica un antígeno asociado al cáncer que comprende la SEC ID NO:2, más preferiblemente SEC ID NO:1. En una realización específica, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia mostrada en SEC ID NO:6 o un fragmento de diagnóstico de la misma. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia mostrada en SEC ID NO:25 (que codifica el fragmento transmembrana mostrado en SEC ID NO:2) o un fragmento de diagnóstico de la misma.

0133 Los métodos de la invención descritos aquí también se pueden también realizar utilizando microarrays, tales como matrices de oligonucleótidos, matrices de ADNc, matrices de ADN genómico o matrices de tejido. Preferentemente, las matrices son microarrays de tejidos.

5 0134 En un ejemplo preferido, se utiliza un producto de expresión del ARN que codifica la variante de Scratch Mamífero asociada al cáncer para detectar la expresión de la variante de Scratch Mamífero asociada al cáncer por la célula. Un experto en la materia apreciará que el producto de expresión de ARN se puede detectar o cuantificar mediante la detección de ARNm que codifica la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero o un fragmento de la misma, u oligonucleótidos, ADNc, ADN, ARN, productos de PCR, ADN sintético, ARN sintético, u otras combinaciones de origen natural o nucleótidos modificados que específicamente y/o selectivamente hibridan con el ARNm que codifica la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero o un fragmento de la misma.

0135 Puede usarse una serie de métodos para detectar y/o cuantificar la expresión del ARN de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero por una célula que incluyen RT-PCR, ensayos de protección de nucleasa, tales como ensayos de protección de ribonucleasa y ensayos nucleasa S1, y Northern blots y similares.

15 0136 En una realización particular, los inventores han preparado cebadores de PCR que amplifican tanto la Scratch variante como Scratch de tipo salvaje (SEC ID NO: 26) o sólo la Scratch variante (SEC ID NO: 27) como se describe en el Ejemplo 4. El uso dichos cebadores permite distinguir entre Scratch variante y de tipo salvaje.

20 0137 Los inventores también han determinado que la secuencia de Scratch Mamífero de tipo salvaje contiene un sitio de restricción KpnI en el nucleótido 118 que no está presente en la variante asociado al cáncer. Por lo tanto, para probar si un cáncer expresa la variante, el producto de PCR amplificado puede ser digerido con el enzima de restricción KpnI seguido por electroforesis en gel. Si las células que se ensayan expresan Scratch Mamífero de tipo salvaje entonces se detectarán 2 fragmentos de 67bp y 93bp. Si las células expresan la variante asociada al cáncer entonces el tamaño del producto de PCR será el mismo que el control no digerido.

0138 En consecuencia, la presente invención proporciona un método para detectar células cancerosas o controlar el cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de tener cáncer, que comprende:

- 25 (a) proporcionar una muestra del sujeto;
- (b) extraer moléculas de ácidos nucleicos que codifican Scratch de tipo salvaje o la variante de Scratch asociada al cáncer de la muestra;
- (c) digerir las moléculas de ácidos nucleicos con un enzima de restricción KpnI, y
- 30 (d) determinar el tamaño de las moléculas de ácidos nucleicos digeridas en donde que la presencia de moléculas de ácidos nucleicos no digeridas indica que el sujeto tiene cáncer.

Métodos para Detectar el Antígeno Asociado al Cáncer

35 0139 En otra realización, los métodos de la invención implican la detección del antígeno asociado al cáncer. En una realización, el antígeno asociado al cáncer se detecta utilizando anticuerpos que se unen específicamente al antígeno asociado al cáncer. Los anticuerpos para el antígeno asociado al cáncer se pueden preparar utilizando técnicas conocidas en la materia.

40 0140 Los anticuerpos específicamente reactivos con el antígeno asociado al cáncer, o derivados, tales como conjugados enzimáticos o derivados etiquetados, pueden usarse para detectar el antígeno asociado al cáncer en varias muestras (por ejemplo, materiales biológicos). Pueden usarse como reactivos de diagnóstico o pronóstico y pueden usarse para detectar anomalías en el nivel de expresión de la proteína, o anormalidades en la estructura, y/o localización temporal, tejido, celular, o subcelular del antígeno asociado al cáncer. Los inmunoensayos *in vitro* también pueden usarse para evaluar o controlar la eficacia de las terapias particulares. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse *in vitro* para determinar el nivel de expresión de un gen que codifica el antígeno asociado al cáncer en las células genéticamente modificadas para producir el antígeno asociado al cáncer.

45 0141 Los anticuerpos pueden usarse en cualquier inmunoensayo conocido que se base en la interacción de unión entre un determinante antigénico del antígeno asociado al cáncer y los anticuerpos. Ejemplos de tales ensayos son radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, ELISA), inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, aglutinación en látex, hemaglutinación, y ensayos histoquímicos. Los anticuerpos pueden usarse para detectar y cuantificar el antígeno asociado al cáncer en una muestra con el fin de determinar su función en el cáncer y para diagnosticar el cáncer.

50 0142 En particular, los anticuerpos de la invención pueden usarse en análisis inmuno-histoquímicos, por ejemplo, a nivel celular y subcelular, para detectar un antígeno asociado al cáncer, para localizarlo en células y tejidos particulares, y en sitios específicos subcelulares, y para cuantificar el nivel de expresión.

0143 Técnicas citoquímicas conocidas en la materia para la localización de antígenos mediante microscopía óptica y electrónica pueden usarse para detectar el antígeno asociado al cáncer. Generalmente, un anticuerpo de la invención puede etiquetarse con una sustancia detectable y el antígeno asociado al cáncer puede localizarse en tejidos y células en base a la presencia de la sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: radioisótopos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánidos), etiquetas luminiscentes tales como luminol; etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa), grupos biotín (que pueden ser detectados por avidina marcada por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar por métodos ópticos o calorimétricos), epítopos del polipéptido predeterminados reconocidos por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, etiquetas de epítopo). En algunas realizaciones, las etiquetas están unidas mediante brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. Los anticuerpos también pueden ser acoplados a sustancias densas de electrones, tales como oro coloidal o ferritina, que se visualizan fácilmente por microscopía electrónica.

0144 El anticuerpo o la muestra puede ser inmovilizado sobre un portador o soporte sólido que es capaz de inmovilizar células, anticuerpos, etc. Por ejemplo, el portador o soporte puede ser de nitrocelulosa, o vidrio, poliacrilamidas, gabros, y magnetita. El material de soporte puede tener cualquier configuración posible incluyendo esférica (por ejemplo, bolas), cilíndrica (por ejemplo superficie interior de un tubo o pocillo de ensayo o la superficie externa de una varilla), o plana (por ejemplo hoja, tira de ensayo). También pueden usarse métodos indirectos en los que la reacción antígeno-anticuerpo primario se amplifica por la introducción de un segundo anticuerpo, que tiene especificidad para el reactivo de anticuerpos contra el antígeno asociado al cáncer. A modo de ejemplo, si el anticuerpo que tiene especificidad contra el antígeno asociado al cáncer es un anticuerpo IgG de conejo, el segundo anticuerpo puede ser gamma-globulina de cabra anticonejo etiquetada con una sustancia detectable como se describe aquí.

0145 Cuando se utiliza un marcador radiactivo como una sustancia detectable, el antígeno asociado al cáncer se puede localizar por radioautografía. Los resultados de radioautografía pueden ser cuantificados por determinación de la densidad de las partículas en los radioautogramos por diversos métodos ópticos, o por recuento de los granos.

0146 Pueden usarse anticuerpos etiquetados contra el antígeno asociado al cáncer para localizar tejido tumoral en sujetos sometidos a cirugía es decir, en imágenes. Normalmente para aplicaciones *in vivo*, los anticuerpos se etiquetan con etiquetas radiactivas (por ejemplo, yodo-123, yodo-125, yodo-131, galio-67, tecnecio-99, e indio-111). Preparaciones de anticuerpos etiquetados pueden administrarse a un sujeto por vía intravenosa en un portador apropiado de una vez de varias horas a cuatro días antes de que el tejido se trate por imagen. Durante este período las fracciones libres se eliminan del sujeto y los anticuerpos que quedan son los relacionados con el tejido tumoral. La presencia del isótopo se detecta utilizando una cámara gamma adecuada. El tejido etiquetado puede correlacionarse con marcadores conocidos sobre el cuerpo del sujeto para determinar la ubicación del tumor para el cirujano.

0147 Por consiguiente, en otra realización la presente invención proporciona un método para detectar cáncer en un sujeto que comprende:

- (a) proporcionar una muestra del sujeto;
- (b) contactar la muestra con un anticuerpo que se une al antígeno asociado al cáncer;
- (c) detectar el nivel del antígeno asociado al cáncer en la muestra, y
- (d) comparar el nivel del antígeno asociado al cáncer en la muestra a una muestra de control, donde niveles incrementados del antígeno asociado al cáncer, en comparación con el control indican que el sujeto tiene cáncer.

(iii) Métodos Terapéuticos

0148 Como se mencionó anteriormente, el nuevo antígeno asociado al cáncer está presente en células cancerosas, pero no significativamente en células normales. Así, el nuevo antígeno asociado al cáncer se puede utilizar en métodos terapéuticos para prevenir y tratar el cáncer. Además, el nuevo antígeno asociado al cáncer o fragmentos del mismo pueden usarse para provocar una respuesta inmune *in vivo*, por ejemplo en una vacuna, o *in vitro*.

0149 Una realización de la invención es el uso de una proteína aislada de la invención o fragmento de la misma en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer. Aun otra realización de la invención es el uso de una proteína aislada de la invención o un fragmento de la misma para tratar o prevenir el cáncer. Una realización adicional de la invención es el uso de una proteína aislada de la invención o un fragmento de la misma en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune. Aun otra realización de la invención es el uso de una proteína aislada de la invención o un fragmento de la misma para provocar una respuesta inmune.

0150 La invención también incluye el uso de una secuencia de ácido nucleico aislada de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer. La invención incluye además el uso de una secuencia de ácido nucleico

aislada de la invención para tratar o prevenir el cáncer. Además, la invención incluye el uso de una secuencia de ácido nucleico aislada de la invención en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune. La invención incluye además el uso de una secuencia de ácido nucleico aislada de la invención para provocar una respuesta inmune.

5 0151 Una realización adicional de la invención es el uso del vector de expresión recombinante de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer. Otra realización de la invención es el uso del vector de expresión recombinante de la invención para tratar o prevenir el cáncer. Además, la invención incluye el uso del vector de expresión recombinante de la invención en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un sujeto. Aún otra realización de la invención es el uso del vector de expresión recombinante de la invención para provocar una respuesta inmune en un sujeto.

10 0152 Una realización adicional de la divulgación es un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de una proteína aislada de la invención o un fragmento de la misma a un sujeto o célula en necesidad de la misma. Además, la invención incluye un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de la secuencia de ácido nucleico aislada de la invención a un sujeto o célula en necesidad de la misma. Además, la invención incluye un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz del vector de expresión recombinante de la invención a un sujeto o célula en necesidad de la misma.

15 0153 Otra realización de la descripción es un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto contra una proteína aislada de la invención, que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína aislada de la invención o un fragmento de la misma a un sujeto o célula en necesidad de la misma. Además, la invención incluye un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto contra la proteína aislada de la invención, que comprende administrar una cantidad eficaz de la secuencia de ácido nucleico aislada de la invención a un sujeto o célula en necesidad de la misma. Además, la invención incluye un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto contra la proteína aislada de la invención que comprende administrar una cantidad eficaz del vector de expresión recombinante de la invención a un sujeto o célula necesitado de la misma.

20 0154 Los métodos anteriores incluyen la administración tanto *in vivo* como *in vitro* de la proteína aislada de la invención. Para usos *in vitro*, la proteína puede usarse para estimular los linfocitos obtenidos del paciente que luego son re-infundidos en el sujeto para montar una respuesta inmune contra las células cancerosas que expresan el antígeno asociado al cáncer.

25 0155 Un aspecto adicional de la descripción es un método para tratar o prevenir cáncer en un sujeto mediante la modulación de la actividad o expresión de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero sobre o dentro de una célula cancerosa.

30 0156 El método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto comprende prevenir o disminuir la función de la variante asociada al cáncer de mamífero. En una realización de la invención, se utiliza una proteína de unión de la invención para prevenir o disminuir la función de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero.

0157 En otra realización de la invención, la función de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero se previene o disminuye al disminuir o prevenir la expresión de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero en la célula.

35 0158 Pueden usarse técnicas estándar para prevenir o disminuir la expresión de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero en una célula incluyendo el uso de moléculas antisentido, triple hélice, o de ribozima reactivas a las transcripciones de la variante asociada al cáncer del gen Scratch Mamífero.

40 0159 Por ejemplo, pueden usarse técnicas estándar para la producción de moléculas antisentido de ácido nucleico, es decir, moléculas complementarias a un ácido nucleico sentido que codifica un polipéptido de interés, por ejemplo, complementaria a la hebra de codificación de una molécula de ADN de doble hebra o complementaria a una secuencia de ARNm. En consecuencia, un ácido nucleico antisentido puede formar enlaces de hidrógeno a un ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una hebra codificanet entera, o sólo a una porción de la misma, por ejemplo, la totalidad o parte de la región de codificación de proteína (o marco de lectura abierta). Una molécula antisentido de ácido nucleico puede ser antisentido para la totalidad o parte de una región no codificante de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés. Las regiones no codificantes ("regiones no traducidas 5' y 3' ") son las secuencias 5' y 3' que flanquean la región de codificación y no se traducen en aminoácidos.

45 0160 Un oligonucleótido antisentido puede ser, por ejemplo, de unos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos o más de longitud. Un ácido nucleico antisentido de la invención puede ser construido usando síntesis química y reacciones enzimáticas de ligación utilizando procedimientos conocidos en la materia. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados diversamente diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos acridina sustituidos pueden ser utilizados. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina,

xantina, 4-acetilcitosina, 5-uracilo (carboxihidroxiometil), 5-carboximetilaminometil 2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracil, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2, 2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5 metilaminometiluracil-, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracil, 5-metoxiuracil, 2-metil-6-N-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracil, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, uracilo -5-oxiacético metiléster, ácido uracilo-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3) w, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido se puede producir biológicamente usando un vector de expresión en el que un ácido nucleico ha sido subclonado en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito del ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido a un ácido nucleico diana de interés).

0161 Moléculas de ácidos nucleicos antisentido administradas a un sujeto o generadas in situ de tal manera que se hibridan con o se unen a ARNm celular que codifica el polipéptido de interés para inhibir así la expresión, por ejemplo, por inhibición de la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser por complementariedad de nucleótidos convencionales para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a dúplexes de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una vía de administración de moléculas de ácidos nucleicos antisentido de la invención incluye la inyección directa en un sitio del tejido. Alternativamente, las moléculas de ácidos nucleicos antisentido pueden ser modificadas a células diana seleccionadas y después administradas sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido pueden ser modificadas de manera que se unen específicamente a los receptores o antígenos expresados en una célula seleccionada, por ejemplo, una célula T o célula cerebral, por ejemplo, mediante la vinculación de las moléculas de ácidos nucleicos antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a receptores de la superficie celular o antígenos. Las moléculas de ácidos nucleicos antisentido también se pueden entregar a las células utilizando vectores, por ejemplo, vectores de terapia génica, que se describen a continuación. Para lograr concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren constructos de vectores en los que la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un fuerte promotor pol II o pol III.

0162 Una molécula de ácido nucleico antisentido de interés puede ser una molécula de ácido nucleico α -anomérico. Una molécula de ácido nucleico α -anomérico forma híbridos de doble cadena específicos con ARN complementario en los que, contrariamente a las unidades- α habituales, las hebras corren paralelas entre sí (Gautier et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede comprender también un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) o un análogo ARN-ADN químico (Inoue et al., 1987, *FEBS Lett.* 215:327-330).

0163 Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad de ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico de cadena simple, tal como un ARNm, al que tienen una región complementaria, y también pueden ser generadas utilizando técnicas estándar. Así, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas cabeza de martillo (descrito en Haseloff y Gerlach, 1988, *Nature* 334:585-591)) pueden usarse para escindir catalíticamente transcripciones ARNm para inhibir así la traducción de la proteína codificada por el ARNm. Una ribozima que tiene especificidad para una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés puede ser diseñada en base a la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero. Por ejemplo, puede construirse un derivado de un ARN *Tetrahymena* L-19 IVS en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos a escindir en una Patente US N° 4,987,071 a Cech et al.; y Patente US N° 5,116,742 a Cech et al.. Alternativamente, puede usarse un ARNm que codifica un polipéptido de interés para seleccionar un ARN catalítico con una actividad de ribonucleasa específica de un grupo de moléculas de ARN. Ver, por ejemplo, Bartel y Szostak, 1993, *Science* 261:1411-1418.

0164 Estructuras helicoidales triples también se pueden generar utilizando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de interés puede ser inhibida tomando como diana secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora del gen que codifica el polipéptido (por ejemplo, el promotor y/o potenciador) para formar estructuras helicoidales triples que impiden la transcripción del gen en células diana. Ver generalmente Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene, 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36, y Maher, 1992, *Bioensayos* 14(12):807-15.

0165 En diversas realizaciones, las composiciones de ácidos nucleicos pueden ser modificadas en la fracción base, fracción de azúcar, o esqueleto de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la hibridación, o la solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la cadena principal de fosfato desoxirribosa de los ácidos nucleicos puede ser modificada para generar ácidos nucleicos peptídicos (ver Hyrup et al., 1996, *Química Bioorgánica & Medicinal* 4(1): 5-23). Como se usa aquí, los términos "ácidos nucleicos peptídicos" o "PNAs" se refieren a de ácidos nucleicos mímicos, por ejemplo, mímicos de ADN, en los que se sustituye el esqueleto de fosfato desoxirribosa por un esqueleto pseudopéptido y sólo se retienen las cuatro nucleobases naturales. El esqueleto neutral de PNAs se ha demostrado que permite la hibridación específica de ADN y ARN en condiciones de baja resistencia iónica. La síntesis de oligómeros de PNA puede realizarse usando protocolos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida que se describen en Hyrup et al., 1996, supra; Perry-O'Keefe et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93: 14670-675.

0166 PNAs pueden, por ejemplo, ser modificados, por ejemplo, para mejorar su estabilidad o captación celular, uniendo lipófilos u otros grupos auxiliares a PNA, por la formación de quimeras PNA-ADN, o por el uso de liposomas u otras técnicas de suministro de fármacos conocida en la materia. Por ejemplo, se pueden generar quimeras PNA-ADN que pueden combinar las propiedades ventajosas de PNA y ADN. Tales quimeras permiten que enzimas de reconocimiento de ADN, por ejemplo, ARNasa H y polimerasas de ADN, interactúen con la porción de ADN, mientras que la porción de PNA proporcionaría alta afinidad de unión y especificidad. Quimeras PNA-ADN pueden vincularse utilizando enlazadores de longitudes apropiadas seleccionados en términos de apilamiento de bases, número de enlaces entre las nucleobases, y orientación (Hyrup, 1996, supra). La síntesis de quimeras PNA-ADN puede realizarse como se describe en Hyrup, 1996, supra, y Finn et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24(17):3357-63. Por ejemplo, una cadena de ADN se puede sintetizar en un soporte utilizando química estándar de acoplamiento de fosforamidita y análogos de nucleósidos modificados. Compuestos tales como 5'-(4-metoxitritilo)amino-5'-desoxi-timidina fosforamidita pueden usarse como un enlace entre PNA y el extremo 5' del ADN (Mag. et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17:5973-88). Monómeros PNA se acoplan a continuación de manera escalonada para producir una molécula quimérica con un segmento 5' de PNA y un segmento 3' de ADN (Finn et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24(17):3357-63). Alternativamente, pueden sintetizarse moléculas quiméricas con un segmento 5' de ADN y un segmento 3' de PNA (Petersen et al., 1995, Bioorganic Med. Chem. Lett. 5:1119-1124).

0167 En otras realizaciones, el oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para dirigir los receptores de la célula huésped in vivo), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84:648-652; Publicación Internacional N° WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (ver, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 89/10134). Además, los oligonucleótidos pueden ser modificados con agentes de escisión activados por hibridación (ver, por ejemplo, van der Krol et al., 1988, Bio/Técnicas 6:958-976) o agentes intercalantes (ver, por ejemplo, Zon, 1988, Farm. Res. 5:539-549). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente reticulante activado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión activado por hibridación, etc.

0168 Otro aspecto de la invención es un método para identificar compuestos que son capaces de modular la expresión o la actividad de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero, que puede utilizarse para prevenir o tratar el cáncer. En una realización de la invención, el método para la identificación de un compuesto en cuanto a capacidad de prevenir o tratar el cáncer comprende las etapas:

- (a) poner en contacto una célula que expresa una variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero con un compuesto de ensayo, y
- (b) determinar la expresión o función de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero, y
- (c) comparar la expresión o función de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero con un control, en donde una disminución en la expresión o función de la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero en comparación con el control es indicativa de un compuesto útil para prevenir o tratar el cáncer.

35 **(D) Proteínas de Unión**

0169 Otro aspecto de la invención es una proteína de unión, preferiblemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se une a las proteínas aisladas de la invención. Tal proteína de unión puede ser generalmente referido aquí como "una proteína de unión de la invención", o, preferiblemente, "un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención".

0170 En una realización, la invención incluye una proteína de unión que es específica para una variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero. En una realización preferida, la variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero comprende la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 1 o una variante de la misma, o la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 2 o una variante de la misma. En otra realización, las proteínas de unión se unen a una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 1 o una variante de la misma, o la secuencia de aminoácido definida por la SEC ID NO: 2 o una variante de la misma.

0171 En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende la totalidad o una porción de una región constante de cadena pesada, tales como una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM o IgD. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender la totalidad o una porción de una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda.

0172 Las proteínas aisladas de la invención pueden usarse para preparar anticuerpos monoclonales o policlonales. Pueden usarse métodos convencionales para preparar los anticuerpos. Por ejemplo, ver Goding, J.W., Anticuerpos Monoclonales: Principios y Práctica, 2da Ed., Academic Press, Londres, 1986.

0173 Los anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos, reactivos contra particulares antígenos o moléculas, tales como antígenos o moléculas en una célula de cáncer, también pueden ser generados por bibliotecas de expresión de detección que codifican genes de inmunoglobulina o porciones de los mismos, expresados en bacterias con los

componentes de la superficie celular. Por ejemplo, fragmentos Fab completos, regiones VH y regiones FV pueden expresarse en bacterias usando bibliotecas de expresión de fago (Ver por ejemplo Ward et al., Nature 341:544-546 (1989); Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); y McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)).

5 0174 La invención también proporciona composiciones que comprenden las proteínas de unión de la invención, preferiblemente anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, con un excipiente, portador, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable.

0175 Además, las proteínas de unión de la invención pueden usarse en el diagnóstico del cáncer.

10 0176 En una realización preferida, las proteínas de unión son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a las variantes asociadas al cáncer de Scratch Mamífero que se expresa en la superficie de células cancerosas, preferiblemente una proteína aislada que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEC ID NOS: 1 o 2. Además, las células cancerosas pueden ser evaluadas para determinar su susceptibilidad a los métodos de tratamiento de la invención por, por ejemplo, obtención de una muestra de las células cancerosas y determinación de la capacidad de la muestra para unirse a las proteínas de unión de la invención, preferiblemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

15 0177 En consecuencia, la presente invención incluye métodos, agentes, y kits de diagnóstico que pueden usarse por sí mismos o antes de, durante o después del método terapéutico de la invención con el fin de determinar si o no hay células cancerosas presentes que expresan el antígeno y pueden unirse a las proteínas de unión de la invención, preferiblemente anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

0178 En una realización, la invención proporciona un método para detectar o controlar el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de

20 (1) poner en contacto una muestra de ensayo tomada de dicho sujeto con una proteína de unión que se une de forma específica a un antígeno en la célula cancerosa para producir un complejo proteína de unión -antígeno;
(2) medir la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo; y
(3) comparar la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo a un control.

25 0179 En una realización, el antígeno es una variante asociada al cáncer de Scratch Mamífero, preferiblemente una proteína aislada que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NOS: 1-2.

0180 La invención incluye además un kit para detectar o controlar el cáncer que comprende cualquiera de las proteínas de unión de la invención que se une a un antígeno en la célula cancerosa e instrucciones para el uso del mismo.

30 0181 Para uso en aplicaciones de diagnóstico, las proteínas de unión de la invención, preferiblemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, pueden ser etiquetados con un marcador detectable tal como un radio-opaco o radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I ; un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano; un agente de tratamiento de imagen; o un ión metálico. Como se describe antes, los métodos para adjuntar una etiqueta a una proteína de unión, como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, son conocidos en la materia.

35 0182 Otro aspecto de la invención es un método para detectar o controlar el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de

(1) medir la cantidad de anticuerpos de la invención en una muestra de ensayo tomada de dicho sujeto; y
(2) comparar la cantidad de anticuerpos de la invención en la muestra de prueba a un control.

40 0183 En una realización, la cantidad de anticuerpos de la invención es medida por medición de la cantidad de anticuerpos de la invención en la muestra de ensayo, por ejemplo mediante ELISA. En otra realización, la cantidad de anticuerpos de la invención es medida por medición de niveles de expresión de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención en la muestra de ensayo, por ejemplo mediante RT-PCR.

(E) Preparación de Proteínas de la Invención

45 0184 Un experto en la materia apreciara que las proteínas de la invención, tales como el nuevo antígeno asociado al cáncer, las proteínas de unión, preferiblemente anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, pueden prepararse en cualquiera de varias formas, pero más preferiblemente preparado usando métodos recombinantes.

0185 En consecuencia, las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser incorporadas de una manera conocida dentro de un vector de expresión apropiado que asegure buena expresión de las proteínas de la invención. Los vectores de expresión posibles incluyen pero no se limitan a cósmidos, plásmidos, o virus modificados (por ejemplo retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), siempre que el vector sea compatible con la

- 5 célula huésped utilizada. Los vectores de expresión son "adecuados para la transformación de una célula huésped", lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y las secuencias reguladoras seleccionadas en base a las células huésped a usarse para la expresión, que están ligadas operativamente a la molécula de ácido nucleico. Ligada operativamente pretende significar que el ácido nucleico está ligado a secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico.
- 10 0186 La invención por lo tanto contempla un vector de expresión recombinante de la invención que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, o un fragmento de la misma, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la proteína-secuencia insertada.
- 15 0187 Pueden derivarse secuencias reguladoras adecuadas de una variedad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, de hongos, virales, de mamíferos, o de insectos (por ejemplo, ver las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, Tecnología de Expresión Génica: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). La selección de secuencias reguladoras apropiadas es dependiente de la célula huésped elegida como veremos más adelante, y puede ser fácilmente realizada por un experto en la materia. Ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen: un promotor transcripcional y mejorador o la secuencia de unión de ARN polimerasa, una secuencia de unión a ribosomas, incluyendo una señal de iniciación de la traducción. Adicionalmente, dependiendo de la célula huésped elegida y el vector empleado, otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios adicionales de restricción de ADN, potenciadores, y secuencias que confieren inducibilidad de transcripción se pueden incorporar en el vector de expresión.
- 20 0188 Los vectores de expresión recombinantes de la invención también pueden contener un gen marcador seleccionable que facilita la selección de células huésped transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Ejemplos de genes marcadores seleccionables son genes que codifican una proteína tal como G418 e higromicina que confieren resistencia a ciertas drogas, β -galactosidasa, cloramfenicol acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga, o una inmunoglobulina o porción de la misma tal como la porción Fc de una inmunoglobulina preferiblemente IgG. La transcripción del gen marcador seleccionable se controla por los cambios en la concentración de la proteína marcadora seleccionable tal como β -galactosidasa, cloramfenicol acetiltransferasa, o luciferasa de luciérnaga. Si el gen marcador seleccionable codifica una proteína que confiere resistencia a los antibióticos tal como resistencia a la neomicina las células transformantes pueden ser seleccionadas con G418. Las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren. Esto hace que sea posible visualizar y ensayar para la expresión de vectores de expresión recombinantes de la invención y, en particular para determinar el efecto de una mutación en expresión y fenotipo. Se apreciará que los marcadores seleccionables pueden introducirse en un vector separado del ácido nucleico de interés.
- 25 30 0189 Los vectores de expresión recombinantes pueden contener también genes que codifican una fracción de fusión que proporciona una mayor expresión de la proteína recombinante; solubilidad aumentada de la proteína recombinante, y ayuda en la purificación de la proteína diana recombinante al actuar como un ligando en la purificación de afinidad. Por ejemplo, se puede añadir un sitio de escisión proteolítica a la proteína diana recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la fracción de fusión subsecuente a la purificación de la proteína de fusión. Vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante.
- 35 40 0190 Vectores de expresión recombinantes pueden introducirse en células huésped para producir una célula huésped transformada. Los términos "transformada con", "transfectada con", "transformación" y "transfección" pretenden abarcar la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula por una de muchas posibles técnicas conocidas en la materia. El término "célula huésped transformada" como se usa aquí pretende incluir también las células capaces de glicosilación que han sido transformadas con un vector de expresión recombinante de la invención. Las células procariotas pueden ser transformadas con ácido nucleico, por ejemplo, por electroporación o transformación mediada por calcio-cloruro. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser introducido en células de mamíferos a través de técnicas convencionales tales como la co-precipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección. Métodos adecuados para la transformación y transfección de células huésped se pueden encontrar en Sambrook et al. (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, 3ra Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001), y otros libros de texto de laboratorio.
- 45 50 0191 Las células huésped adecuadas incluyen una amplia variedad de células huésped eucarióticas y células procariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden ser expresadas en células de levadura o células de mamífero. Otras células huésped adecuadas se pueden encontrar en Goeddel, Tecnología de Expresión Génica: Metodos en Enzimología 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Además, las proteínas de la invención pueden ser expresadas en células procariotas, tales como Escherichia coli (Zhang et al., Science 303 (5656): 371-3 (2004)). Además, se puede utilizar un sistema de expresión basado en Pseudomonas, tales como Pseudomonas fluorescentes (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. EE.UU. 2005/0186666, Schneider, Jane C et al).
- 55

- 5 0192 Las células huésped de levadura y hongos adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no se limitan a *Saccharomyces cerevisiae*, los géneros *Pichia* o *Kluyveromyces* y varias especies del género *Aspergillus*. Ejemplos de vectores de expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari et al., Embo J. 6:229-234 (1987)), pMFa (Kurjan y Herskowitz, Cell 30:933-943 (1982)), pJRY88 (Schultz et al., Gene 54:113-123 (1987)), y pYES2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA). Protocolos para la transformación de levaduras y hongos son bien conocidos por los expertos en la materia (ver Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 75:1929 (1978); Itoh et al., J. Bacteriology. 153:163 (1983), y Cullen et al. (BiolTechnology 5:369 (1987)).
- 10 0193 Las células de mamífero adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen, entre otras: COS (por ejemplo, ATCC No. CRL 1650 o 1651), BHK (por ejemplo, ATCC No. CRL 6281), CHO (ATCC No. CCL 61), HeLa (por ejemplo, ATCC No. CCL 2), 293 (ATCC No. 1573) y las células NS-1. Vectores de expresión adecuados para dirigir la expresión en células de mamífero incluyen generalmente un promotor (por ejemplo, derivado de material vírico como poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus de Simio 40), así como otras secuencias de control transcripcional y translacional. Ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen pCDM8 (Seed, B., Nature 329:840 (1987)) y pMT2PC (Kaufman et al., EMBO J. 6:187-195 (1987)).
- 15 0194 Dadas las enseñanzas previstas aquí, promotores, terminadores, y métodos para la introducción de vectores de expresión de un tipo adecuado en células de plantas, aves, e insectos también pueden lograrse fácilmente. Por ejemplo, en una realización, las proteínas de la invención pueden ser expresadas a partir de células vegetales (ver Sinkar et al., J. Biosci (Bangalore) 11:47-58 (1987), que revisa el uso de vectores de *Agrobacterium rhizogenes*; ver también Zambryski et al., Genetic Engineering, Principios y Métodos, Hollaender y Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, Nueva York (1984), que describe el uso de vectores de expresión para células vegetales, incluyendo, entre otros, PAPS2022, PAPS2023 y PAPS2034).
- 20 0195 Las células de insecto adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen células y líneas celulares de especies Bombyx, Trichoplusia o Spodoptera. Vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (células SF 9) incluyen la serie pAc (Smith et al., Mol. Cell Biol. 3:2156-2165 (1983)) y la serie pVL (Luckow, V.A., y Summers, M.D., Virología 170:31-39 (1989)). Algunos sistemas de expresión de células de insectos baculovirus adecuadas para la expresión de las proteínas recombinantes de la invención se describen en PCT/US/02442.
- 25 0196 Alternativamente, las proteínas de la invención también pueden ser expresadas en animales no humanos transgénicos tales como ratones, ratas, conejos, ovejas y cerdos (Hammer et al. Nature 315:680-683 (1985); Palmiter et al. Science 222:809-814 (1983); Brinster et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:4438-4442 (1985); Palmiter y la Célula Brinster 41:343-345 (1985) y Patente de EE.UU. No. 4,736,866).
- 30 0197 Las proteínas de la invención también se pueden preparar por síntesis química utilizando técnicas bien conocidas en la química de proteínas tales como la síntesis de fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Assoc. 85:2149-2154 (1964); Frische et al., J. Pept. Sci. 2(4): 212-22 (1996)) o síntesis en solución homogénea (Houbenweyl, Métodos de Química Orgánica, ed E. Wansch, Vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart (1987)).
- 35 0198 Proteínas de fusión N-terminal o C-terminal que comprenden las proteínas de la invención conjugadas con otras moléculas, tales como proteínas pueden ser preparados por fusión, a través de técnicas recombinantes. Las proteínas de fusión resultantes contienen una proteína de la invención fusionada a la proteína seleccionada o proteína marcadora como se describe aquí. La proteína recombinante de la invención también puede ser conjugada con otras proteínas mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, las proteínas pueden ser acopladas utilizando enlazadores heterobifuncionales que contienen tiol como se describe en WO 90/10457, N-succinimidil-3-(2-piridilditio-propionato) o N-succinimidil-5 tioacetato. Ejemplos de proteínas que pueden usarse para preparar proteínas de fusión o conjugados incluyen proteínas de unión celular, tales como inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, lectinas, insulina, lipoproteína de baja densidad, glucagón, endorfinas, transferrina, bombesina, asialoglicoproteína glutatión-S-transferasa (GST), hemaglutinina (HA) y myc truncado.
- 40 0199 En consecuencia, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la invención, tales como las proteínas aisladas de la invención. Además, la invención proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante de la invención.
- 45 0200 Los siguientes ejemplos no limitativos son ilustrativos de la presente invención:

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento e Identificación de Scratch Asociada a Cáncer

DISEÑO EXPERIMENTAL

0201 Línea celular de melanoma (A-375), líneas celulares de glioma (U118MG y U87MG), línea celular de cáncer de mama (MDA-MB 435S), línea celular pancreática, (PANC-1) y línea celular T (Daudi) fueron utilizadas en el estudio (Tabla 1). Estas líneas celulares fueron seleccionadas en base a los resultados de perfiles de la línea celular tumoral por citometría de flujo.

Crecimiento y Mantenimiento de Líneas Celulares Tumorales

0202 Las líneas celulares en el estudio se adquirieron de ATCC y cultivaron de acuerdo con las orientaciones y recomendaciones de ATCC. Las células fueron cosechadas a 90% de confluencia con viabilidad > 90%.

Caracterización preliminar del antígeno que se une a VB3-011

0203 Los datos preliminares de caracterización se obtuvieron a partir de experimentos diseñados para evaluar la viabilidad del enfoque basado en gel mediante ensayos dot blot, y de los experimentos realizados para determinar la naturaleza del epítipo asociado con los antígenos.

0204 Los datos de estos experimentos clasificaron el antígeno VB3-011 como un antígeno "no-blottable" con una modificación glicano, es decir, el epítipo implicado en la unión a VB3-011 en el antígeno estaba glicosilada.

Enriquecimiento y purificación de VB3-011 Ag

0205 Los datos preliminares del estudio de capacidad de Blott especificaron un método de purificación basado en la lectina como el mejor método de preparación de antígeno para VB3-011. Una experimentación extensa reveló que la modificación de glicano implicó una forma soluble de CS (sulfato de condroitina); dos de ellos (CSB y CSE) tienen limitada distribución tisular. Por ello, la modificación de glicano podría ser atribuible a CSA y a ácido hialurónico en menor medida.

0206 El sulfato de condroitina A (CSA) se compone de unidades repetitivas lineales que contienen D-galactosamina y ácido D-glucurónico. El grupo amino de galactosaminas en la unidad básica de sulfato de condroitina A es acetilado, dando N-acetilgalactosamina; hay un grupo sulfato esterificado a la posición-4 en N-acetil-galactosamina (Fig. 1A) (Sugahara K et al. 1988. J. Biol. Chem. Vol. 263:10168-10174; Sugahara K et al. 1991. Eur. J. Biochem. Vol. 202:805-811; Prydz K y Dalen KT. 2000. J. Cell Sci. Vol. 113:193-205). Cuando estas unidades lineales repetitivas se reticulan (α 2-6) en los puntos de ramificación en C2 de la segunda y C6 de la primera cadena de carbono de tal manera que están presentes una sola unidad de glicano que representa más de una cadena lineal de CSA, excepto para la sulfatación, se asemeja al glicano, Neu5Ac (α 2→6) Gal (β 1→4) Glucuronato, reconocida por HA (Fig. 1B).

0207 Dos o más moléculas de CSA cuando se reticulan juntas se asemejan a la glicano - Neu5Ac (α 2→6) Gal (β 1→4) Glucuronato, reconocida por hemaglutinina (HA), Azumi et al., (1991) mostró que la actividad de una hemaglutinina aislada de los hemocitos de la ascidia, Halocynthia roretzi era inhibida por la heparina, sulfato de condroitina, y lipopolisacárido (LPS), pero no por los mono y disacáridos tales como N-acetil-galactosamina, galactosa, y melibiosa. La hemaglutinina mostró capacidad de unión a la heparina, sulfato de condroitina y LPS, como se demuestra por cromatografía heparina-Sefarose y experimentos de centrifugación, respectivamente (Ajit Varki et al eds. 1999. Fundamentos de Glicobiología). De manera similar, se demostró que una Hemaglutinina de micobacterias se une a sulfato de heparan y Hemaglutinina de influenzae Hemofilii se une a CSA con un enlace adicional a 2-6 (Azumi K et al. A1991. Dev. Comp. Immunol. Vol. 15(02-01):9-16; Menozzi FD et al. 1996. J. Exp. Med., Vol. 184(3):993-1001). Sulfato de Heparán y sulfato de condroitina A difieren en epimerización de C5. Por lo tanto, se genera un nuevo reactivo que permita la purificación basado en lectina como sigue. HA recombinante se inmovilizó a anticuerpos anti-HA por acoplamiento con Dimetilpimelimidato (DMP), de tal manera que cuando se usa como un agente de PI, HA reconoce la CSA asociada con el antígeno en la superficie celular. Las preparaciones de membrana fueron purificadas por afinidad con HA-inmovilizada, y los eluatos se sometieron a SDS-PAGE y análisis BM, posteriormente se probaron con anticuerpo VB3-011.

Purificación basada en lectina

0208 Molécula de HA recombinante que se une específicamente al glicano - Neu5Ac (α 2→6) Gal (β 1→4) Glc, se hizo unir al anticuerpo anti-HA durante 2 horas a temperatura ambiente en un Nutator, seguido por unión del complejo HA-anti-HA a la proteína-G-sefarosa. Esto fue seguido por un paso de centrifugación para deshacerse de la fracción no ligada. El complejo inmovilizado fue luego reticulado usando Dimetilpimelimidato (DMP) que se conoce que reticula proteínas presentes en proximidad cercana. El agente de reticulación en exceso o sin utilizar y el material no ligado se separaron por un paso breve de centrifugación. Los grupos amina no específicos que podrían haber surgido como subproducto de la etapa de reticulación se neutralizaron con Trietanolamina durante dos horas a temperatura ambiente. El reactivo basado en lectina

así creado se lavó a fondo con PBS y almacenó con PBS que contenía 0.05% de NaN_3 a 2-8°C. Aparte del reactivo-HA, Con-A-agarosa y WGA-agarosa se utilizaron también como reactivos de purificación por afinidad para detectar una mejor recuperación del antígeno.

5 0209 Un mínimo de 500 μg de proteína de membrana se utilizó para la purificación basada en lectina. Una etapa de pre-aclarado utilizando proteína G-Sefarose sola fue el primer paso en la purificación del antígeno antes de la adición del reactivo. Un total de 15-20 μL del reactivo se utilizó como agente precipitante en la mezcla. Las mezclas lectina-antígeno se mezclaron por la noche a 4°C usando condiciones de tampón que simulaban las condiciones fisiológicas. Se tuvo cuidado para asegurar que se utilizaran inhibidores de la proteasa en cada paso del proceso de aislamiento de antígenos.

10 0210 Los complejos antígeno-lectina se centrifugaron, se lavaron con RIP-A tampón de lisis y se eluyeron con 0.2 M de glicina pH 2.5. Los sobrenadantes que representan las fracciones no unidas fueron almacenados para ensayar las proteínas que no se aislaron por purificación de afinidad. Purificaciones basadas en lectina se llevaron a cabo en dos líneas celulares de glioma (U118MG y U87MG), una línea celular de melanoma (A-375), una línea celular epitelial (MDA-MB-435S) y dos líneas celulares negativas (PANC-1, y Daudi).

Análisis basado en gel y Western Blott

15 0211 1D-PAGE: Las proteínas purificadas se sometieron a condiciones de reducción de preparación de la muestra y se analizaron posteriormente por SDS-PAGE/Western Blot. Cuando se utilizaron condiciones de reducción, los antígenos aislados fueron tratados con tampón de muestra que contiene 1% de p-mercaptoetanol a 65 ° C durante 15 minutos. Los blots resultantes se probaron con VB3-011 y los anticuerpos secundarios correspondientes se conjugaron con HRP, para visualizar las proteínas purificadas por quimioluminiscencia.

20 0212 2D-PAGE: Las proteínas purificadas fueron separados por electroforesis bidimensional en gel para resolver cualquier efecto de apilamiento de proteína que puede haber ocurrido en el análisis 1D-PAGE. La electroforesis 2D en gel resolvió proteínas de acuerdo con sus puntos isoelectricos (pI) en la primera dimensión y en base a sus pesos moleculares en la segunda dimensión. Las proteínas así resueltas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, durante la noche, y procesaron como en el caso de 1DPAGE. Western blots se exploraron con VB3-011 y las proteínas reaccionantes se visualizaron por quimioluminiscencia.

Extracción del péptido e ID del antígeno

30 0213 Extracción de péptido de digestiones tripticas en gel y en solución: Se realizaron digestiones tripticas con la tripsina grado secuenciación en un proceso de extracción de péptido de 20-horas resultando finalmente en la extracción de los péptidos que se analizaron en un QSTAR Pulsar-I (ESI-QToF-MS/MS), equipado con una nanofuente con un caudal de trabajo de 20-50 nL/min. Los péptidos se ionizan y se detectan como moléculas cargadas doblemente, triplemente o cuádruplemente que luego son refinadas a sus respectivas masas. La secuenciación De-novo de las proteínas identificadas se realizó también siempre que era posible. Los péptidos se extrajeron a partir de líneas celulares positivas y negativas para asegurar que era el antígeno correcto. Masas de péptidos extraídos de los espectros de masa se utilizaron directamente para identificar el antígeno de acuerdo con los datos MOWSE obtenidos en bases de datos de proteínas que son accesibles a través del motor de búsqueda MASCOT. Los péptidos fueron extraídos tanto de rebanadas de gel y en-solución (U118MG, U87MG, A-375, 435S) y se sometieron a un análisis MS.

RESULTADOS

Inmovilización del reactivo HA

40 0214 La molécula de HA recombinante no es un anticuerpo y por lo tanto no se une a la proteína-G-sefarosa directamente como un compañero de inmovilización. Con el fin de hacer posible que esta molécula sea funcional en procesos de purificación de antígenos, HA fue unido a anticuerpos anti-HA que se unen específicamente a HA, la molécula se inmovilizó utilizando proteína-G-sefarose de una manera secuencial. Esto no sólo inmovilizaría el complejo sino que podría bloquear cualquier interacción no específica que podría surgir de la presencia del anti-HA, como se muestra esquemáticamente en la Figura 2. El complejo inmovilizado HA-anti-HA se estabilizó posteriormente utilizando pimelimidato de dimetilo, un agente de reticulación que mantuvo las proximidades de los diversos reactivos. El complejo final generó unas pocas aminas reactivas en el proceso, distinto al sitio reactivo de unión en la molécula de HA. Estos grupos reactivos fueron bloqueados permanentemente usando 1 M trietanolamina, garantizando así la máxima exposición del sitio reactivo en la molécula de HA.

Purificación de lectina

50 0215 Todas las reacciones de purificación se realizaron con proteínas pre-aclaradas. Mayores tiempos de incubación fueron utilizados para minimizar la no especificidad y mejorar la estabilidad de complejos cognados antígeno-anticuerpo. Seis

líneas celulares (A-375, U118MG, U87MG, MDA-MB-435S, Panc-1 y Daudi) se utilizaron en el estudio. Condiciones reductoras para la preparación de muestras fueron empleadas antes de la resolución de los antígenos aislados en SDS-PAGE. Las Western blots se sondaron con VB3-011 para asegurar que el antígeno purificado es el socio de unión cognado para VB3-011.

5 1D-PAGE/Análisis Western

0216 Cuando se utilizó reactivo HA, sólo una banda específica se detectó después de la separación en un 1D-PAGE a -50 kDa en condiciones reductoras (Figura 3A) en antígeno-línea celular positiva (A-375), que estaba ausente en la línea celular negativa (PANC-1). Se observaron interacciones no específicas con Con-A y lectinas WGA que indican que el glicano presente en el antígeno VB3-011 fue el reconocido por HA. La línea celular de glioma (U118MG y U87MG) también mostró la presencia de una banda única en ~50 kDa cuando se purificó utilizando el reactivo de HA (Figura 3B). Cuando las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora antes de su separación en SDS-PAGE, una banda predominante en ~36 kDa y una débil banda 50 kDa se observaron en antígeno-línea celular positiva (A-375, y U118MG U87MG) (Figura 4).

Análisis 2D-PAGE

0217 Con el fin de determinar puntos isoelectrónicos (pI) y evaluar la posibilidad de apilamiento de proteínas en el análisis 1D-PAGE, los antígenos purificados por HA se separaron en electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE), en donde la separación en la primera dimensión es sobre la base de pI y la segunda dimensión sobre la base del peso molecular. Los geles se transfirieron luego a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a procesamiento estándar de Western Blot. Dado que las cantidades requeridas para la detección de proteínas en un gel 2D es ~4 veces mayor que el requisito de un gel 1D, se agruparon antígenos purificados a partir de 4 reacciones separadas para un análisis 2D-PAGE. Dos geles separados se procesan simultáneamente para análisis Western blot para asegurar que las proteínas detectadas en los geles teñidos con Coomassie son los mismos que los observados en los Western blots. Los Western blots 2D se sondaron con VB3-011 y detectaron por ECL (chemiluminescence). Como puede verse en la Figura 5, una sola mancha se detectó a ~36 kDa / pI = 9.7±02.

25 Extracción de péptido y análisis de proteína

0218 Las membranas A-375, U 87MG y U118 MG se utilizaron para purificar antígeno(s) que liga específicamente a VB3-011. Una banda de ~50 kDa fue observada en las tres líneas celulares, como se muestra en las Figuras 3A y 3B. Las bandas de proteínas fueron extirpadas de los geles teñidos con Coomassie y utilizadas en la digestión en-gel para extraer péptidos para el análisis MS.

0219 Las proteínas de banda gel-1D y manchas-2D fueron digeridas con tripsina para liberarlas del gel y se analizaron en un sistema de fase inversa LC-MS/MS. Las identidades de las proteínas se revelaron por análisis de base de datos usando herramientas bioinformáticas. Los datos primarios incluyeron péptidos obtenidos como se indica en el espectro TOF-MS, datos de fragmentación de MS/MS, y una lista de proteínas sugeridas incluyendo contaminantes que no coinciden con el pI o el peso molecular de la proteína aislada. Para obtener el análisis MS/MS los espectros se presentaron directamente en los motores de búsqueda Mascot disponibles en www.Matrixscience.com.

Análisis espectral de masas

0220 El análisis de péptidos se realizó en dos formas:

- Todos los péptidos recuperados y reconstruidos a sus masas correctas se utilizaron directamente en un paso de huellas dactilares de masa del péptido para obtener una identificación de la proteína.
- Los péptidos que eran abundantes y bien ionizados fueron elegidos para fragmentación MS/MS adicional de iones, en donde los iones 'y' e 'b' se utilizaron para deducir sus estructuras primarias. Estas secuencias se investigaron entonces para homologías en la base de datos de proteínas para la identificación de proteínas.

0221 Los péptidos se ionizan y se detectan como moléculas cargadas doblemente, triplemente o cuádruplemente, en un sistema LC-MS/MS en oposición a la detección como simplemente cargadas en ionización Matrix asistida tal como en MALDI. Péptidos diferencialmente cargados se refinaron posteriormente a sus masas respectivas, en la etapa de reconstrucción de masas. Estas masas de péptidos se analizaron luego directamente por un motor de búsqueda mascot basado en ciencia matricial para la identificación de antígenos. Masas de péptidos extraídos de los espectros de masas se utilizaron directamente para identificar el antígeno de acuerdo con las puntuaciones MOWSE obtenidas en bases de datos de proteínas que son accesibles a través de motores de búsqueda como MASCOT, SEQUEST y Prospector. QSTAR-pulsar-I fue utilizado y seleccionado para todas las identidades de proteínas, ya que incluye las adiciones más recientes a la base de datos de proteínas de Pepsea es compatible con MASCOT.

Análisis de mancha 2D

0222 Proteínas extirpadas in situ del gel-2D identificaron Scratch. El pI y el peso molecular corresponden claramente con Scratch Mamífero. Se recuperó un total de cobertura de secuencia del 37% con 15 péptidos coincidentes, cada péptido mostrando una homología del 100% a la proteína original (Ver Figura 6).

5 Análisis de la banda 50 kDa purificada a partir de las líneas celulares de glioma y melanoma

0223 Los datos obtenidos de los espectros de masas de las tres líneas celulares, (U87MG, U118MG y A375) apuntan hacia Scratch Mamífero como el antígeno que se une a VB3-011. De todas las líneas celulares evaluadas, las líneas celulares de glioma (U87MG y U118MG) mostraron las identidades con mayor puntuación. A-375, una línea celular de melanoma también mostró una sobre-expresión del antígeno. Aparte de las líneas celulares antes mencionadas, las líneas de células epiteliales, tales como MDA-MB-435S, PC-3, 549-A y 1-CFPAC se rastrearon también de la misma manera, pero a excepción de MDA-MB-435S, que mostró la presencia de una versión truncada de Scratch, es decir, proteína 17.823kDa gi|5928387, con 100% de homología con las secuencias 158-366 de la molécula Scratch original. Ver la Figura 7 (SEC ID NO: 4). Las preparaciones de membrana de cada una de estas líneas celulares se utilizaron para purificar por afinidad el antígeno VB3-011 utilizando el reactivo HA. El resto de las líneas de células epiteliales no mostró proteínas detectables.

15 0224 Se obtuvieron escaneos TOF-MS tanto de un modo manual como un modo IDA para recuperar el número máximo de péptidos para una identificación significativa. Ver Figuras 8-10.

0225 La lista de péptidos recuperados y sus posiciones asignadas a la secuencia desde Scratch Mamífero son como se indican en la figura 11 (SEC ID NO:1) y en la Tabla 2 (SEC ID NOS: 2 y 7 a 24). Todos los péptidos representados se obtuvieron por secuenciación *de novo*.

20 Fragmentación MS/MS del péptido 2402.1206 y 2134.9614

0226 Una cabeza de nanopulverización discreta instalado en una nanofuente se utilizó para el propósito. La energía de colisión fue 48V, cortina de gas y gas CAD se mantuvieron a 25 y 6, respectivamente, y la muestra se sometió a ciclo durante 1,667 minutos (100 ciclos) para obtener fragmentación estable de iones de masa. La fragmentación MS/MS de dos de los péptidos (2402.978172 - 802.00000, 3+; 2134.985448 - 1068.500000, 2+) dio lugar a los iones de fragmentos que se muestran en las Figuras 14 y 15. Mientras que uno de los péptidos, 'PELATAAGGYINGDAAVSEGYAADAF' (SEC ID NO:7) de la masa del péptido 2402.97812, mapeado 100% a una secuencia de Scratch, el péptido, RFLAAFLAAAGPFGFALGPSSV (SEC ID NO:2), de la masa del péptido 2134.985448, mostraron 100% de homología en las secuencias flanqueantes pero no con la secuencia en el medio, lo que indica una identificación de una nueva secuencia. La presencia de esta secuencia es responsable del único dominio de transmembrana disponible en la proteína. La secuencia Scratch Mamífero disponible en la base de datos es el resultado de traducción conceptual y no tiene ningún dominio de transmembrana en la secuencia. La secuencia de proteína recuperada muestra 67% de homología con la proteína Scratch Mamífero disponible en la base de datos e indicativa de estar presente en la superficie celular debido a la presencia de un dominio de transmembrana. El resto de los péptidos derivados de los espectros claramente emparejó las secuencias de Scratch Mamífero, y por lo tanto fueron retirados como impactos mayores. Los datos de fragmentación de iones confirman aún más la identidad de una forma novedosa de Scratch como el antígeno cognado para VB3-011.

0227 Las figuras 12 y 13 identifican Scratch Mamífero como el antígeno.

DISCUSIÓN

0228 VB3-011, un MAb IgG, se generó a partir de linfocitos de sangre periférica (PBL) aislados de un paciente diagnosticado con un astrocitoma de grado II, utilizando tecnologías de plataforma registradas por Viventia Hybridomics™ y ImmunoMine™ (Ver WO97/044461). El anticuerpo exhibe reactividad a una línea celular huésped u otras cada una de las cuales es representativa de diferentes indicaciones de cáncer. A pesar de esta demostración de amplia reactividad tumor – tipo de célula, VB3-011 muestra una unión limitada al tejido normal. El antígeno VB3-011 fue clasificado como antígeno "no-blottable" con una modificación glicano, atribuible a la CSA.

0229 Puesto que las moléculas CSA se caracterizan por estructuras (1-4) GlcNAc/Glucuronato también se parecen a la lectina-Neu5Ac ($\alpha 2 \rightarrow 6$) Gal ($\beta 1 \rightarrow 4$) Glucuronato, reconocido por Hemaglutinina (HA). Un nuevo reactivo que permitiría la purificación basada en lectina se generó utilizando HA recombinante fue inmovilizado a anticuerpo anti-HA como un agente de purificación. Las preparaciones de membrana se purificaron por afinidad con HA-inmovilizada, y los eluatos se sometieron a SDS-PAGE y análisis WB, posteriormente se sondaron con anticuerpo VB3-011. VB3-011 detectó una proteína de ~50 kDa en 1D-PAGE que luego resolvió en una banda de ~36 kDa en análisis 2D-PAGE. Análisis LC-MS/MS de los puntos 1D y 2D identificó Scratch Mamífero como el antígeno con peso molecular 36 kDa (de ~50 kDa observado por análisis WB de 1 D-PAGE), atribuyendo así el resto de la presencia del glicano, 4-sulfatado, Neu5Ac ($\alpha 2 \rightarrow 6$) Gal ($\beta 1 \rightarrow 4$)

Glucuronato. La detección de un punto 36 kDa en 2D-PAGE coincidía con el peso molecular y punto isoelectrico [(pI), es decir, 9.7±0.2] característicos de Scratch Mamífero.

0230 Las secuencias de proteínas recuperadas por secuenciación de novo del análisis de iones de fragmentos MS/MS, dieron como resultado 67% de cobertura con 16 de los 17 péptidos que muestran 100% de homología con la secuencia de Scratch Mamífero encontrada en la base de datos (gi|13775236). Un péptido, RFLAAFLAAAGPFGFALGPSSV (SEC ID NO:2), de la masa de péptido 2134.985448, mostró 100% de homología en las secuencias flanqueantes pero no con la secuencia en el medio, lo que indica una identificación de una nueva secuencia. La presencia de esta secuencia es responsable del único dominio de transmembrana disponible en la proteína y coloca a Scratch en la superficie celular como opuesto al citosol. Este es el primer informe que ilustra Scratch Mamífero como un antígeno tumoral de la superficie celular.

Ejemplo 2: Expresión de Scratch Asociada a Tumor

0231 Un anticuerpo específico para Scratch Mamífero se ensayó para especificidad tumoral usando TMAs HD fijados en formalina. Ver Tabla 3 para los tejidos normales y Tabla 4 para la unión a membrana específica de tumor. No hubo detección del antígeno de Scratch en la membrana de tejido normal. Sin embargo, se encontró tinción de membrana fuertemente positiva en una variedad de tejidos tumorales.

Ejemplo 3: Localización de Scratch como Diagnóstico de Cáncer

0232 Localización aberrante de la proteína Scratch como un indicador de cáncer: La proteína Scratch de tipo salvaje tiene un patrón de expresión limitado dentro del núcleo de las células como se describe por Nakakura et al, 2001. Sin embargo, la expresión en el caso de los tipos de tejidos tumorales y los tipos celulares de cáncer se ha establecido en la membrana y en el citoplasma de las células por los inventores. Utilizando técnicas conocidas en la materia tales como citometría de flujo, inmunohistoquímica, Western Blot de fracciones de membrana de células se puede establecer la expresión aberrante de la proteína Scratch y variantes de la misma en la membrana y en el citoplasma de las células cancerosas. Este cambio de localización puede usarse como un indicativo de diagnóstico de cáncer.

0232 Expresión en la membrana de proteínas de Scratch variantes ha sido establecida tanto por citometría de flujo como por Western Blot de fracciones de membrana de tipos de células cancerosas tales como U-87MG, A-375, MDA-MB-435S, U118 MG-. Esto se muestra en la Tabla 1, y las Figuras 3, 4 y 15.

Ejemplo 4: Detección de ARNm variante como indicación de Cáncer

0234 Metodología RT-PCR para la detección sensible de ARNm variante de Scratch Mamífero que contiene dominio de transmembrana: El ARN mensajero será aislado a partir de diferentes tipos de células tumorales y ADN de primera hebra complementaria (ADNc) se sintetizará utilizando la enzima transcriptasa inversa y un cebador oligo dT. El ADNc se utilizará entonces para comprobar la expresión del ARNm Scratch de tipo salvaje y posibles variantes y específicamente la transmembrana mutante por PCR usando los siguientes cebadores:

Cebador 5' 1: para peso y variante (correspondiente a los nucleótidos 51 a 82)

5'-GCC CTG CAG GAG GGA AGC GCC TAC CGC CGC (SEC ID NO:26)

Cebador 5' 2: para la variante de transmembrana (correspondiente a los nucleótidos 76 a 105)

5'-CGC GCC CGC TTX1 TTX2 GCX3 GCX3 TTX1 TTX2 GCX3 (SEQ ID NO:27)

Donde X1 es T o C, X2 es A o G y X3 es A, G, C, o T

Cebador 3': (correspondiente a los nucleótidos 183 a 210)

5'-TGC CAT GTA CTC CGG GGG CGA CGG CCC (SEC ID NO:28)

La reacción de PCR incluía un volumen de reacción de 50 µL conteniendo:

10X tampón de PCR	5 µL
2 mM de dNTPs	5 µL
Cebador 5'	20 pmol
Cebador 3'	20 pmol
Taq ADN polimerasa	2.5 U
Plantilla de ADN	50 ng

5

0235 Las condiciones de ciclado de PCR fueron: 94°C durante 1 min., 62°C durante 1 min, y 72°C durante 30 segundos, para un total de 30 ciclos seguido de una extensión final de 10 min. a 72°C.

10

0236 Electroforesis en un gel de agarosa al 1% demostrará que la banda de interés de 159 pb está presente en reacciones usando el cebador 1 y 140 pb en las reacciones usando el cebador 2 si el mutante de transmembrana está presente.

15

0237 El análisis de secuencia de Scratch Mamífero de tipo salvaje reveló un sitio de restricción *KpnI* (posición 118) que no está presente en la variante. Por lo tanto, para ensayar si la forma variante se expresa en células tumorales, el producto de PCR amplificado será digerido con la enzima de restricción *KpnI* seguido de electroforesis en un gel de agarosa 1,5%. Si las células tumorales expresan Scratch Mamífero de tipo salvaje, entonces serán detectados dos fragmentos de 67 y 92 pb bajo la lámpara UV. En contraste, si las células tumorales expresan una variante de Scratch, que carece del sitio *KpnI* entonces el tamaño del fragmento de PCR será idéntico al de control sin digerir. Usando los cebadores específicos para la región transmembrana de Scratch Mamífero variante (cebador #2) un fragmento de PCR sólo se podrá encontrar en muestras que contienen la variante con el dominio transmembrana, identificando de este modo la variante específica.

Ejemplo 5: Detección de Secuencia de ADN Genómico como una Indicación de Cáncer

20

0238 El gen codificante para la proteína de Scratch Mamífero humano ha sido localizado en el cromosoma 8 q24.3 y consta de 2 exones. La secuencia del gen para la variante de Scratch unida a la membrana asociada al cáncer se puede determinar fácilmente utilizando técnicas de secuenciación de genes conocidas en la materia, tales como la amplificación por PCR específica de exón, o secuenciación directa del ADN que se inicia de los cebadores a la secuencia conocida.

25

0239 Una vez que la secuencia del gen mutado es conocida pueden usarse ensayos de diagnóstico basados en su detección para evaluar a los pacientes. Arrays de chips de ADN pueden ser creados uniendo los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias sentido y antisentido tanto del gen de tipo salvaje como el mutado. El ADN genómico puede ser aislado de la sangre entera periférica o de tejidos tumorales. El gen de interés se amplifica luego mediante PCR con cebadores que corresponden tanto a la secuencia de tipo salvaje y a las mutaciones esperadas y se etiqueta con una sonda apropiada (generalmente fluorescente). El ADN es luego hibridizado a los oligonucleótidos en el chip y el patrón de fluorescencia determinado con un lector fluorescente. Comparando el patrón de fluorescencia con un mapa de las ubicaciones conocidas de las secuencias de oligonucleótidos la secuencia de gen de pacientes con puede establecerse como tipo salvaje o mutante. (Cooper et al 2004)

30

0240 Los arrays para mutaciones comunes en el gen p53 (Affymetrix) entre otros ya están comercialmente disponibles y servicios personalizados de array también están disponibles.

35

Ejemplo 6: Cáncer Variante Asociada a Scratch como un Objetivo para las Inmunotoxinas

0241 VB6-011 es un inmunoc conjugado de buganina modificada conjugada con un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína Scratch Mamífero en la superficie celular tumoral. El tratamiento de las células que expresan Scratch variante que contiene un dominio transmembrana en la superficie celular da lugar a la captación específica del inmunoc conjugado y la muerte celular y posterior.

40

Citotoxicidad de proteínas VB6-011

0242 La citotoxicidad de VB6-011 se midió mediante un ensayo MTS. Brevemente, las células positivas al antígeno y negativas al antígeno se sembraron a 1000 células por pocillo y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Posteriormente, concentraciones variables de VB6-011 y de-buganina se añadieron a las células y después de 5 días, se determinó la viabilidad celular.

0243 Las líneas celulares positivas y negativas al antígeno se incubaron con diferentes concentraciones de VB6-011 desde 1 nM a 1 mM. Después de 5 días de incubación, el IC₅₀ calculado de VB6-011 fue 350 nM. (Figura 18) (Tabla 5) En contraste, no se pudo determinar IC₅₀ con las líneas celulares negativas al antígeno.

5 0244 Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a lo que actualmente se consideran los ejemplos preferidos, se debe entender que la invención no se limita a los ejemplos descritos. Por el contrario, la invención está destinada a cubrir diversas modificaciones incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

TABLA 1

Línea celular	MF*
A375	11.5
U118MG	6.1
U87MG	4.6
MDA-MB-435S	4.6
PANC-1 DAUDI	2.1 1.1

0245 Tabla 1: aumento de la fluorescencia media para VB3-011 respecto a un control de coincidencia de isotipo para cada línea celular utilizada en el estudio.

10

TABLA 2

Inicio	Fin	Masa del péptido	Descripción (Secuencia del péptido)
28	50		A.RFLAAFLAAAGPFGFALGPSSV.Y (SEC ID NO:2)
92	117		R.PELATAAGGYINGDAAVSEGYAADAF.F (SEC ID NO:7)
4	8	592,7360	R.SFLVK.K (SEC ID NO:8)
12	26	1601,6900	K.LDAFSSADLESAYGR.A (SEC ID NO:9)
62	74	1345,5360	K.GPSPEPMYAAAVR.G (SEC ID NO:10)
75	123	4719,1140	R. GELGPAAAGSAPPPTPRPELATAAGGYINGDAAVSEGYAADAFFITDGR. S (SEC ID NO:11)
128	158	2457,4690	K.ASNAGSAAAPSTASAAAPDGDAGGGGGAGGR.S (SEC ID NO:12)
159	167	786,8430	R.SLGSGPGGR.G (SEC ID NO:13)
172	179	731,7640	R.AGAGTEAR.A (SEC ID NO:14)
180	190	840,8940	R.AGPGAAGAGGR.H (SEC ID NO:15)
199	208	1099,1660	K.TYATSSNLSR.H (SEC ID NO:16)
215	222	888,9760	R.SLDSQLAR.R (SEC ID NO:17)
230	247	2085,5280	K.VYVSMAMPAMHLLTHDLR.H (SEC ID NO:18)
256	268	1598,8890	K.AFSRPWLLQGHMR.S (SEC ID NO:19)
284	288	578,6260	K.AFADR.S (SEC ID NO:20)
293	302	1157,3120	R.AHMQTHSAFK.H (SEC ID NO:21)
312	316	564,6820	K.SFALK.S (SEC ID NO:22)

317	321	623,7070	K.SYLNK.H (SEC ID NO:23)
330	348	1642,8320	K.GGAGGPAAPAPPQLSPVQA. (SEC ID NO:24)

0246 Tabla 2: La lista de péptidos, junto con sus respectivas masas calculadas obtenidas después de la etapa de reconstrucción es como se ha dado en la tabla anterior.

TABLA 3: Evaluación TMA de la Reactividad de Fragmento de Unión al Antígeno con tejidos normales por IHC

Tejido	Lugar de tinción	Matriz #	Elemento	Resultado*	Comentarios
Suprarrenal	Citoplasma	1	Corteza	+	Si resultado
	Ninguno	1 & 2	Medula	0	
	Citoplasma	2	Corteza	1	
Médula Ósea	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
Cerebro	Ninguno	1	Neuronas	0	
	Ninguno	1	Neuronas	Rastreo	
	Citoplasma	1	Astrocitos	1	
	Citoplasma	2	Astrocitos	Rastreo	
Mama	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
Cartílago	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
Colon	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
Corazón	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
Riñón	Ninguno	1 & 2	Glomérulos	0	
	Citoplasma	1 & 2	Túbulos (Proximal & Distal)	1	
Hígado	Citoplasma	1 & 2	Hepatocitos	1	
	Citoplasma	1	Conductos biliares	0 a 1 +	
	Ninguno	2	Conductos biliares	0	
Pulmón	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
Ovario	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
Páncreas	Citoplasma	2	Acinos	2	Células dispersas
	Citoplasma	1	Acinos	Rastreo a 3+	
	Ninguno	1 & 2	Células ductales	0	
	Ninguno	2	Células de islotes	0	

	Citoplasma	1	Células de islotes	Rastreo	
Nervio Periférico	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
Próstata	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
Glándula Salival	Citoplasma	1 & 2	Células ductales	1	
	Ninguno	1 & 2	Acinos	0	
Músculo Esquelético	Ninguno	1 & 2	No aplicable	0	
Piel	Ninguno	1 & 2	No aplicable	0	
Bazo	Ninguno	1 & 2	No aplicable	0	
Estómago	Ninguno	1 & 2	No aplicable	0	
Testículo	Citoplasma	1	Células germinales	Rastreo	
	Ninguno	2	Células de Leydig	0	
	Ninguno	2	Células germinales	0	
	Citoplasma	1	Células de Leydig	1	
Tiroides	Ninguno	1 & 2	No Aplicable	0	
* La puntuación se evaluó en una escala de 0 a 4+, con 0 = no tinción y trazo siendo menor que 1+, pero mayor que 0. Grados 1+ a 4+ representan aumento de la intensidad de la tinción, con 4+ siendo fuerte tinción, de color marrón oscuro.					

Tabla 4: Análisis de Tumor TMA para Fragmento de Unión al Antígeno

Tejido	Tinción de membrana	Resultado	Comentarios
Linfoma	7/10	1 a 3+	Tinción de membrana fuerte
Carcinoma de mama	27/31	1 a 3+	Tinción de membrana fuerte
Carcinoma de colon	23/26	1 a 3+	Reactividad prominente membrana
Melanoma	13/14	1 a 3+	Reactividad prominente membrana
Carcinoma de próstata	17/20	1 a 2+	La mayoría fueron fuertemente positivas
Carcinoma de Células Escamosas de Cérvix	22/24	1 a 2+	Mayoría - fuertemente positiva
Adenocarcinoma de Cérvix	9/9	1 a 2+	Mayoría - fuertemente positiva
Sarcoma de Kaposi	7/8	1 a 2+	La mayoría fueron fuertemente

			positivas
* La puntuación se evaluó en una escala de 0 a 4+, con 0 = no tinción y trazo siendo menor que 1+, pero mayor que 0. Grados 1+ a 3+ representan aumento de la intensidad de la tinción, con 4+ siendo fuerte tinción, de color marrón oscuro.			
nd: no determinado			

TABLA 5: Caracterización biológica de VB6-011

	Afinidad	Saturación VB6 conc. (Pg/ml)	Concentración (□g/mL)*	IgG	IC ₅₀ (nM)
VB6-011	2.10 ⁻⁶	250	180		350
ND: no determinado. * Concentración de IgG que inhibe 50% de la unión VB6.					

REFERENCIAS

- 5 0247
1. Fundamentos de Glicobiología. Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1999.
 2. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Herramienta básica de búsqueda de alineación local. *J Mol. Biol.* 1990;215:403-410.
 3. Azumi K, Yokosawa H, Ishii S. Lipopolisacárido induce la liberación de una metalo-proteasa de hemocitos de las ascidias, *Halocynthia roretzi*. *Dev.Comp Immunol.* 199;15:1-7.
 4. Baldari C, Murray JA, Ghiara P, Cesareni G, Galeotti CL. Un péptido líder novedoso que permite la secreción eficaz de un fragmento de interleuquina 1 beta humana en *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1987;6:229-234.
 5. Bartel DP, Szostak JW. Aislamiento de las nuevas ribozimas de un gran número de secuencias aleatorias [ver comentarios]. *Science* 1993; 261:1411-1418.
 6. Battle E, Sancho E, Franci C et al. El caracol factor de transcripción es un represor de la expresión del gen E-cadherina en células tumorales epiteliales. *Nat. Cell Biol.* 2000;2:84-89.
 7. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD. Factores que afectan a la eficacia de la introducción de ADN foráneo en ratones mediante microinyección de óvulos. *Proc Natl.Acad.Sci. EE.UU.* 1985;82:4438-4442.
 8. Carrillo H, Lipman D. El problema de Alineación de Secuencia Múltiple en Biología. *SIAM.J.Appi.Math.* 1988;48:1073-1082.
 9. Cullen D, Gray GL, Wilson LJ et al. Expresión Controlada y Secreción de la Quimosina Bovina en *Aspergillus Nidulans*. *Nat. Biotech* 1987;5:369-376.
 10. Devereux J, Haerberli P, Smithies O. Un conjunto completo de programas de análisis de secuencia para el VAX. *Nucleic Acids Res.* 1984;12:387-395.
 11. Finn PJ, Gibson NJ, Fallon R, Hamilton A, Brown T. Síntesis y propiedades de oligómeros quiméricos de ADN-PNA. *Nucleic Acids Res* 1996;24:3357-3363.
 12. Frische K, Meldal M, Werdelin O et al. Síntesis de varias columnas de una biblioteca de células T que estimulan análogos Tn-antigénicos de glicopéptidos para la caracterización molecular de la especificidad de células T-glicano. *J Pept.Sci.* 1996;2:212-222.
 13. Gautier C, Morvan F, Rayner B et al. Alfa-ADN. IV: Alfa-anómeros y beta-anómero tetrathymidylates unidos covalentemente a oxazolopiridocarbazol intercalante. Síntesis, propiedades fisicoquímicas y de unión poli (rA). *Nucleic Acids Res* 1987;15:6625-6641.
 14. Gennaro AR. Ciencias Farmacéuticas de Remington. Easton, PA: Mack Publishing Company, 2000.
 15. Goding JW. Anticuerpos Monoclonales: Principios y Prácticas: Academic Press; 1986.
 16. Goeddel DV. Sistemas para la expresión génica heteróloga. *Metodos Enzymol.* 1990;185:3-7.
 17. Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, Tschlis PN. El Gfi-1 proto-oncogénica contiene un nuevo dominio represor transcripcional, SNAG, e inhibe la detención en G1 inducida por Iretirada de interleuquina-2. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:6263-6272.
 18. Hammer RE, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM, Mayo KE. La expresión de la hormona del crecimiento humano del factor de liberación en ratones transgénicos en mayor crecimiento somático. *Nature* 1985;315:413-416.
 19. Haseloff J, Gerlach WL. Enzimas de ARN simples con nuevas y muy específicas actividades endoribonuclease. *Nature* 1988;334:585-591.

20. Helene C. La estrategia anti-gen: control de la expresión génica por triplex formadora de oligonucleótidos. *Anticancer Drug Des* 1991;6:569-584.
21. Helene C, Thuong NT, Harel-Bellan A. Control de la expresión génica en triple hélice oligonucleótidos formadores. La estrategia antígeno. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1992;660:27-36.
- 5 22. Hemavathy K, Guru SC, Harris J, Chen JD, Ip YT. Slug Humano es un represor que se localiza en sitios de transcripción activa. *Mol.Cell Biol.* 2000;20:5087-5095.
23. Henikoff S, Henikoff JG. Matrices de sustitución de aminoácidos a partir de bloques de proteínas. *Proc Natl.Acad.Sci.EE.UU.* 1992;89:10915-10919.
- 10 24. Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformación de la levadura. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1978; 75:1929-1933.
25. Huse WD, Sastry L, Iverson SA et al. Generación de una gran biblioteca combinatoria del repertorio de inmunoglobulina en fago lambda. *Science* 1989;246:1275-1281.
26. Hyrup B, Nielsen PE. Ácidos nucleicos peptídicos (PNA): Síntesis, Propiedades y aplicaciones potenciales. *Bioorg.Med Chem.* 1996;4:5-23.
- 15 27. Inoue H, Hayase Y, Imura A et al. Síntesis y estudios de hibridación sobre dos ribonucleótidos nona(2'-O-metil) complementarios. *Nucleic Acids Res* 1987;15:6131-6148.
28. Inoue H, Hayase Y, Iwai S, Ohtsuka E. Secuencia de hidrólisis dependiente de ARN utilizando férulas de oligonucleótidos modificados y RNasa H. *FEBS Lett.* 1987;215:327-330.
29. John Wiley & Hijos. *Protocolos Actuales en Biología Molecular.* Nueva York, Nueva York: John Wiley & Hijos; 2006.
- 20 30. Kataoka H, Murayama T, Yokode M et al. Un nuevo factor de transcripción relacionada caracol SMUC regula actividades factor de transcripción hélice-helixloop básicos a través de motivos E-box específicos. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:626-633.
31. Kaufman RJ, Murtha P, Davies MV. Eficiencia de traducción de ARNms policistronic y su utilización para expresar genes heterólogos en células de mamífero. *EMBO J* 1987;6:187-193.
- 25 32. Kurjan J, Herskowitz I. Estructura de un gen de levadura de feromonas (MF alfa): un precursor de factor alfa putativo contiene cuatro copias en tándem del factor alfa maduro. *Cell* 1982;30:933-943.
33. Lemaitre M, Bayard B, Lebleu B. Actividad antivirica específica de una secuencia poli (L-lisina)-conjugado oligodesoxirribonucleótido complementaria al sitio de iniciación del ARN de la proteína N del virus de estomatitis vesicular. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84:648-652.
- 30 34. Lesk A. *Biología Molecular Computacional: Fuentes y Metodos para el Análisis de Secuencias.* Nueva York, Nueva York: Oxford University Press, 1988.
- 35 35. Letsinger RL, Zhang GR, Sun DK, Ikeuchi T, Sarin PS. Colesterilo conjugadas con oligonucleótidos: síntesis, propiedades y actividad como inhibidores de la replicación del virus de inmunodeficiencia humano en cultivo celular. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989;86:6553-6556.
- 36 36. Luckow VA, Summers MD. Alto nivel de expresión de genes extraños no fusionados con vectores de expresión de virus polidrosos nuclear Autografa californica. *Virología* 1989;170:31-39.
- 37 37. Mag M, Engels JW. Síntesis y escisión selectiva de oligodesoxirribonucleótidos que contienen enlaces fosforamidato internucleotídicos no quirales. *Nucleic Acids Res.* 1989;17:5973-5988.
- 40 38. Maione TE, Gray GS, Hunt AJ, Sharpe RJ. La inhibición del crecimiento del tumor en ratones mediante un análogo de factor plaquetario 4 que carece de afinidad por la heparina y conserva la actividad angiostático potente. *Cáncer Res* 1991;51:2077-2083.
- 39 39. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Anticuerpos de fagos: fago filamentoso que muestra dominios variables del anticuerpo. *Nature* 1990;348:552-554.
- 40 40. Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M et al. Identificación de una hemaglutinina de unión a heparina presente en micobacterias. *J Exp.Med* 1996;184:993-1001.
- 45 41. Merrifield RB. Síntesis de Péptidos en Fase Sólida 3: Una síntesis mejorada de la Bradiquinina. *Bioquímica* 1964;3:1385-1390.
- 42 42. Nakakura EK, Watkins DN, Sriuranpong V et al. Scratch Mamífero participa en la diferenciación neuronal en células de carcinoma embrionario P19. *Brain Res. Res.Mol.Brain.* 2001;95:162-166.
- 50 43. Nakakura EK, Watkins DN, Schuebel KE et al. Scratch Mamífero: un represor transcripcional de la familia Caracol neural específica. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:4010-4015.
- 44 44. Needleman SB, Wunsch CD. Un método general aplicable a la búsqueda de similitudes en la secuencia de aminoácidos de dos proteínas. *J Mol.* 1970;48:443-453.
- 45 45. Palmiter RD, Norstedt G, Gelinás RE, Hammer RE, Brinster RL. Genes de fusión GH metalotioneína-humanos estimula el crecimiento de los ratones. *Ciencia* 1983;222:809-814.
- 55 46. Palmiter RD, Brinster RL. Ratones transgénicos. *Cell* 1985;41:343-345.
- 47 47. Perry-O'Keefe H, Yao XW, Coull JM, Fuchs M, Egholm M. Hibridación pre-gel de ácido nucleico péptido: una alternativa a la hibridación southern. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:14670-14675.
- 48 48. Petersen KH, Jensen DK, Egholm M, Nielsen PE, Buchardt O. Una síntesis del enlazador de PNA-ADN de N-((4,4'-dimetoxitritiloxi)etil)-N-(timin-1-ilacetil)glicina. *Bioorganic Med Chem Letts* 1995;5:1119-1124.
- 60 49. Prydz K, Dalen KT. Síntesis y clasificación de los proteoglicanos. *J Cell Sci.* 2000;113 Pt 2:193-205.

50. Sage EH, Bassuk JA, Yost JC, Folkman MJ, Lane TF. La inhibición de la proliferación de células endoteliales por SPARC es mediada a través de una secuencia Ca(2+) de unión a mano EF. *J Cell Biochem.* 1995;57:127-140.
51. Sambrook J, MacCallum P, Russell D. *Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- 5 52. Schultz LD, Tanner J, Hofmann KJ et al. Expresión y secreción en levaduras de una glicoproteína de la envuelta 400-kDa derivado del virus Epstein-Barr. *Gene* 1987;54:113-123.
53. Seed B. Un ADNc LFA-3 codifica una proteína de membrana de fosfolípido ligado homólogo a su receptor CD2. *Nature* 1987;329:840-842.
- 10 54. Sinkar VP, White FF, Gordon MP. *Biología Molecular del Plásmido Ri - Una Revisión.* *J.Biosci.* 1987;11:47-57.
55. Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. La producción de interferón beta humano en células de insecto infectadas con un vector de expresión de baculovirus. *Mol.Cell Biol.* 1983;3:2156-2165.
56. Smith TF, Waterman MS. Comparación de Biosecuencias. *Avances en Matemáticas Aplicadas* 1981;2:482-489.
- 15 57. Sugahara K, Yamashina I, De WP, Van HH, Vliegenthart JF. Los estudios estructurales sobre glicopéptidos sulfatados de la región de unión de carbohidratos y proteínas de condroitin-4-sulfato proteoglicanos de condrosarcoma enjambre de ratas. Demostración de la estructura Gal (4-O-sulfato) beta 1-3Gal beta 1-4XYL beta 1-O-Ser. *J Biol. Chem.* 1988;263:10168-10174.
58. Sugahara K, Masuda M, Harada T et al. Estudios estructurales sobre oligosacáridos sulfatados derivados de la región de unión de carbohidratos y proteínas de los proteoglicanos de sulfato de condroitina del cartílago de ballena. *Eur.J Biochem.* 1991;202:805-811.
- 20 59. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA et al. Nuevas directrices para evaluar la respuesta al tratamiento en tumores sólidos. Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer, Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, Instituto Nacional del Cáncer de Canadá. *J Natl.Cáncer Inst.* 2000;92:205-216.
60. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: mejorar la sensibilidad de la alineación progresiva de secuencias múltiples a través de la ponderación de secuencia, brecha sanciones de posición específica y la elección de la matriz de peso. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.
- 25 61. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ et al. Los péptidos derivados de dos dominios separados de la proteína de la matriz trombospondina-1 tienen actividad anti-angiogénica. *J Biol Cell.* 1993;122:497-511.
62. van der Krol AR, Mol JN, Stuitje AR. Modulación de la expresión de genes eucariotas por ARN complementario o secuencias de ADN. *Biotécnicas* 1988;6:958-976.
- 30 63. Wansch Eed. Houben-Weyl: *Métodos de Química Orgánica.* Stuttgart: Thieme, 1987.
64. Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. Actividades de unión de un repertorio de dominios variables de inmunoglobulina individuales secretadas a partir de *Escherichia coli*. *Nature* 1989;341:544-546.
65. Organización Mundial de la Salud. *Informe Mundial sobre el Cáncer.* Ginebra, Suiza: OMS Press, 2003.
- 35 66. Zambryski P, Herrera-Estrella L, DeBlock M, Van Montagu M. En: Setlow J, Hollaender A, eds. *Ingeniería Genética: Principios y Métodos.* Vol. 6. Nueva York, Nueva York: Plenum Press, 1984:253-278.
67. Zhang Z, Gildersleeve J, Yang YY et al. Una nueva estrategia para la síntesis de glicoproteínas. *Ciencia* 2004;303:371-373.
68. Zon G. Análogos de oligonucleótidos como potenciales agentes quimioterapéuticos. *Farm.Res* 1988; 5:539-549.

LISTA DE SECUENCIAS

- 40 0248
<110> VIVENTIA BIOTECH INC.
CHAHAL, Francina C.
MACDONALD, Glen
CIZEAU, Jeannick
- 45 <120> NUEVO ANTIGENO ASOCIADO AL CÁNCER
<130> 10241-90
<140>
<141>
<150> US 60/751,965
- 50 <151> 2005-12-21

<160> 28

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 347

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Arg Ser Phe Leu Val Lys Lys Val Lys Leu Asp Ala Phe Ser
1 5 10 15

Ser Ala Asp Leu Glu Ser Ala Tyr Gly Arg Ala Arg Phe Leu Ala Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Ala Ala Gly Pro Phe Gly Phe Ala Leu Gly Pro Ser Ser
35 40 45

Val Tyr Asp Gly Asp Ala Glu Ala Ala Leu Leu Lys Gly Pro Ser Pro
50 55 60

Glu Pro Met Tyr Ala Ala Ala Val Arg Gly Glu Leu Gly Pro Ala Ala
65 70 75 80

Ala Gly Ser Ala Pro Pro Pro Thr Pro Arg Pro Glu Leu Ala Thr Ala
85 90 95

Ala Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Asp Ala Ala Val Ser Glu Gly Tyr Ala
100 105 110

Ala Asp Ala Phe Phe Ile Thr Asp Gly Arg Ser Arg Arg Lys Ala Ser
115 120 125

ES 2 395 103 T3

Asn Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Pro
 130 135 140

Asp Gly Asp Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Arg Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Ser Gly Pro Gly Gly Arg Gly Gly Thr Arg Ala Gly Ala Gly Thr Glu
 165 170 175

Ala Arg Ala Gly Pro Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Arg His Ala Cys
 180 185 190

Gly Glu Cys Gly Lys Thr Tyr Ala Thr Ser Ser Asn Leu Ser Arg His
 195 200 205

Lys Gln Thr His Arg Ser Leu Asp Ser Gln Leu Ala Arg Arg Cys Pro
 210 215 220

Thr Cys Gly Lys Val Tyr Val Ser Met Pro Ala Met Ala Met His Leu
 225 230 235 240

Leu Thr His Asp Leu Arg His Lys Cys Gly Val Cys Gly Lys Ala Phe
 245 250 255

Ser Arg Pro Trp Leu Leu Gln Gly His Met Arg Ser His Thr Gly Glu
 260 265 270

Lys Pro Phe Gly Cys Ala His Cys Gly Lys Ala Phe Ala Asp Arg Ser
 275 280 285

Asn Leu Arg Ala His Met Gln Thr His Ser Ala Phe Lys His Phe Gln
 290 295 300

Cys Lys Arg Cys Lys Lys Ser Phe Ala Leu Lys Ser Tyr Leu Asn Lys
 305 310 315 320

His Tyr Glu Ser Ala Cys Phe Lys Gly Gly Ala Gly Gly Pro Ala Ala
 325 330 335

Pro Ala Pro Pro Gln Leu Ser Pro Val Gln Ala
 340 345

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 395 103 T3

<400> 2

Ala Arg Phe Leu Ala Ala Phe Leu Ala Ala Ala Gly Pro Phe Gly Phe
1 5 10 15

Ala Leu Gly Pro Ser Ser Val Tyr
20

<210> 3

<211> 348

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 395 103 T3

Met Pro Arg Ser Phe Leu Val Lys Lys Val Lys Leu Asp Ala Phe Ser
 1 5 10 15

Ser Ala Asp Leu Glu Ser Ala Tyr Gly Arg Ala Arg Ser Asp Leu Gly
 20 25 30

Ala Pro Leu His Asp Lys Gly Tyr Leu Ser Asp Tyr Val Gly Pro Ser
 35 40 45

Ser Val Tyr Asp Gly Asp Ala Glu Ala Ala Leu Leu Lys Gly Pro Ser
 50 55 60

Pro Glu Pro Met Tyr Ala Ala Ala Val Arg Gly Glu Leu Gly Pro Ala
 65 70 75 80

Ala Ala Gly Ser Ala Pro Pro Pro Thr Pro Arg Pro Glu Leu Ala Thr
 85 90 95

Ala Ala Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Asp Ala Ala Val Ser Glu Gly Tyr
 100 105 110

Ala Ala Asp Ala Phe Phe Ile Thr Asp Gly Arg Ser Arg Arg Lys Ala
 115 120 125

Ser Asn Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala
 130 135 140

Pro Asp Gly Asp Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Arg Ser Leu
 145 150 155 160

Gly Ser Gly Pro Gly Gly Arg Gly Gly Thr Arg Ala Gly Ala Gly Thr
 165 170 175

ES 2 395 103 T3

Glu Ala Arg Ala Gly Pro Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Arg His Ala
 180 185 190

Cys Gly Glu Cys Gly Lys Thr Tyr Ala Thr Ser Ser Asn Leu Ser Arg
 195 200 205

His Lys Gln Thr His Arg Ser Leu Asp Ser Gln Leu Ala Arg Arg Cys
 210 215 220

Pro Thr Cys Gly Lys Val Tyr Val Ser Met Pro Ala Met Ala Met His
 225 230 235 240

Leu Leu Thr His Asp Leu Arg His Lys Cys Gly Val Cys Gly Lys Ala
 245 250 255

Phe Ser Arg Pro Trp Leu Leu Gln Gly His Met Arg Ser His Thr Gly
 260 265 270

Glu Lys Pro Phe Gly Cys Ala His Cys Gly Lys Ala Phe Ala Asp Arg
 275 280 285

Ser Asn Leu Arg Ala His Met Gln Thr His Ser Ala Phe Lys His Phe
 290 295 300

Gln Cys Lys Arg Cys Lys Lys Ser Phe Ala Leu Lys Ser Tyr Leu Asn
 305 310 315 320

Lys His Tyr Glu Ser Ala Cys Phe Lys Gly Gly Ala Gly Gly Pro Ala
 325 330 335

Ala Pro Ala Pro Pro Gln Leu Ser Pro Val Gln Ala
 340 345

<210> 4

<211> 164

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 395 103 T3

Ala Gly Ala Gly Gly Arg His Ala Cys Gly Glu Cys Gly Lys Thr Tyr
 1 5 10 15

Ala Thr Ser Ser Asn Leu Ser Arg His Lys Gln Thr His Arg Ser Leu
 20 25 30

Asp Ser Gln Leu Ala Arg Arg Cys Pro Thr Cys Gly Lys Val Tyr Val
 35 40 45

Ser Met Pro Ala Met Ala Met His Leu Leu Thr His Asp Leu Arg His
 50 55 60

Lys Cys Gly Val Cys Gly Lys Ala Phe Ser Arg Pro Trp Leu Leu Gln
 65 70 75 80

Gly His Met Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gly Cys Ala His
 85 90 95

Cys Gly Lys Ala Phe Ala Asp Arg Ser Asn Leu Arg Ala His Met Gln
 100 105 110

Thr His Ser Ala Phe Lys His Phe Gln Cys Lys Arg Cys Lys Lys Ser
 115 120 125

Phe Ala Leu Lys Ser Tyr Leu Asn Lys His Tyr Glu Ser Ala Cys Phe
 130 135 140

Lys Gly Gly Ala Gly Gly Pro Ala Ala Pro Ala Pro Pro Gln Leu Ser
 145 150 155 160

Pro Val Gln Ala

5 <210> 5

<211> 1047

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10 <400> 5

ES 2 395 103 T3

atgccaggt ccttcctggt caagaaggtc aaacttgacg cgttctcttc ggccgacctg 60
 gagagcgcct acggacgcgc ccgcagcgac ctcggcgcgc cactgcacga taaagggtag 120
 ctcagcgact acgtggggcc ctcgtccgtc tacgatggcg acgccgaggc tgcgctgctc 180
 aaagggccgt cgccggagcc catgtacgca gcagctgtgc gtggagagct ggggccggcg 240
 gctgcagggt ctgcgccgcc gccacccccg cggccggagc tggccaccgc tgcgggcggc 300
 tacatcaacg gcgacgcggc cgtcagcgag ggctacgcgg cggacgcctt cttcatcacc 360
 gacgggcgct cgcggcgtaa ggcttccaat gccggctctg ccgccgctcc ctccacagcc 420
 tcggcggcgg cccccgacgg cgacgccgga ggcggggggc gggcggggcg gcgcagcttg 480
 ggatccgggc cggggggccg gggcggcacg cgcgcggggg caggcaccga ggcgcgcgcg 540
 gggccagggg ccgcaggtgc tggcggcccg cacgcgtgcg gcgagtgcgg caaaacatac 600
 gccacgtcgt cgaacctgag ccgccacaag cagacgcacc gcagcctgga cagccagctg 660

 gcgcggcgct gcccgacgtg cggcaagggtg tacgtgtcca tgccggccat ggccatgca 720
 ctgctcacgc acgacctgcg ccacaagtgc ggcgtgtgcg gcaaagcctt ctcgcggccc 780
 tggctgctgc agggccacat gcgctcgcac accggcgaga aacccttcgg ctgcgcgcac 840
 tgcggcaagg ccttcgccga ccgctccaac ctgcgcgcgc acatgcagac gcattcggcc 900
 ttcaagcact tccagtgcaa gcgctgcaa aagagcttcg cgctcaagtc ctatctcaac 960
 aagcactacg agtcggcctg cttcaagggc ggcgccggag gccccgcggc tcctgcgcg 1020
 ccacagctca gccctgtgca ggcctag 1047

<210> 6

5 <211> 1044

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> caráct. misc.

10 <222> (87)..(87)

<223> n = t o c

<220>

<221> caráct. misc.

<222> (90)..(90)

15 <223> n = g o a

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (93)..(93)

<223> n = a, t, g o c

5

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (96)..(96)

<223> n = a, t, g o c

<220>

10

<221> caráct. mísc.

<222> (99)..(99)

<223> n = t o c

<220>

<221> caráct. mísc.

15

<222> (102)..(102)

<223> n = g o a

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (105)..(105)

20

<223> n = a, t, g o c

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (108)..(108)

<223> n = a, t, g o c

25

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (111)..(111)

<223> n = a, t, g o c

<220>

30

<221> caráct. mísc.

<222> (114)..(114)

<223> n = a, t, g o c

<220>

<221> misc feature

ES 2 395 103 T3

<222> (117)..(117)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 <221> caráct. mísc.
 5 <222> (120)..(120)
 <223> n = t o c
 <220>
 <221> caráct. mísc.
 <222> (123)..(123)
 10 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 <221> caráct. mísc.
 <222> (126)..(126)
 <223> n = t o c
 15 <220>
 <221> caráct. mísc.
 <222> (129)..(129)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 20 <221> caráct. mísc.
 <222> (132)..(132)
 <223> n = g o a
 <400> 6

atgccagggt ccttcoctggt caagaaggtc aaacttgacg cgttctcttc ggccgacctg	60
gagagcgcct acggaocgcg ccgcttnttn gengcntnt tngcngcngc nggnccnttn	120
ggnttngent tngggccctc gtccgtctac gatggcgacg ccgaggetgc gctgctcaa	180
gggccgtcgc cggagcccat gtacgcagca gctgtgcgtg gagagctggg tccggcggct	240
gcagggctctg cgcgcgcgcc caccgcgcgc ccggagctgg ccaccgctgc gggcggctac	300
atcaacggcg acgcggccgt cagcgagggc tacgcggcgg acgccttctt catcaccgac	360
gggcgctcgc ggcgtaaggc ttccaatgcc ggetetgccg ccgctccctc cacagcctcg	420
gcggcggccc ccgacggcga cgcggaggc gggggcgggg cgggcgggcg cagcttggga	480
tccgggccgg ggggcccggg cggcacgcgc gcgggggag gcaccgaggc gcgcgcgggg	540
ccaggggccg caggtgctgg cggccggcac gcgtgcggcg agtgcggcaa aacatacgcc	600

ES 2 395 103 T3

acgtcgtcga acctgagccg ccacaagcag acgcaccgca gcctggacag ccagctggcg 660
 cggegetgcc cgacgtgctg caaggtgtac gtgtccatgc cggccatggc catgcacctg 720
 ctcacgcacg acctgcgcca caagtgcggc gtgtgcggca aagccttctc gcggccctgg 780
 ctgctgcagg gccacatgct ctgcacacc ggcgagaaac ccttcggctg cgcgcactgc 840
 ggcaaggcct tcgccgaccg ctccaacctg cgcgcgcaca tgcagacgca ttcggccttc 900
 aagcacttcc agtgcaagcg ctgcaagaag agcttcgcgc tcaagtccta tctcaacaag 960
 cactacgagt cggcctgctt caagggcggc gccggaggcc ccgcggtctc tgcgccgcca 1020
 cagctcagcc ctgtgcaggc ctag 1044

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Pro Glu Leu Ala Thr Ala Ala Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Val Ser Glu Gly Tyr Ala Ala Asp Ala Phe Phe
 20 25

<210> 8

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Arg Ser Phe Leu Val Lys Lys
 1 5

<210> 9

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Lys Leu Asp Ala Phe Ser Ser Ala Asp Leu Glu Ser Ala Tyr Gly Arg
 1 5 10 15

Ala

20 <210> 10

<211> 15

ES 2 395 103 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Lys Gly Pro Ser Pro Glu Pro Met Tyr Ala Ala Ala Val Arg Gly
1 5 10 15

5 <210> 11

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

10

Arg Gly Glu Leu Gly Pro Ala Ala Ala Gly Ser Ala Pro Pro Pro Thr
1 5 10 15

Pro Arg Pro Glu Leu Ala Thr Ala Ala Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Asp
20 25 30

Ala Ala Val Ser Glu Gly Tyr Ala Ala Asp Ala Phe Phe Ile Thr Asp
35 40 45

Gly Arg Ser
50

<210> 12

<211> 33

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Ala Ser Asn Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Ser Thr Ala Ser Ala
1 5 10 15

Ala Ala Pro Asp Gly Asp Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Arg
20 25 30

Ser

<210> 13

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 395 103 T3

<400> 13

Arg Ser Leu Gly Ser Gly Pro Gly Gly Arg Gly
1 5 10

<210> 14

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Arg Ala Gly Ala Gly Thr Glu Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 15

10 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Ala Gly Pro Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Arg His
1 5 10

15 <210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Lys Thr Tyr Ala Thr Ser Ser Asn Leu Ser Arg His
1 5 10

20

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Ser Leu Asp Ser Gln Leu Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 18

<211> 20

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 395 103 T3

<400> 18

Lys Val Tyr Val Ser Met Pro Ala Met Ala Met His Leu Leu Thr His
 1 5 10 15

Asp Leu Arg His
 20

<210> 19

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Ala Phe Ser Arg Pro Trp Leu Leu Gln Gly His Met Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 20

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Lys Ala Phe Ala Asp Arg Ser
 1 5

15 <210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Ala His Met Gln Thr His Ser Ala Phe Lys His
 1 5 10

20

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 22

Lys Ser Phe Ala Leu Lys Ser
 1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 23

Lys Ser Tyr Leu Asn Lys His
1 5

<210> 24

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Lys Gly Gly Ala Gly Gly Pro Ala Ala Pro Ala Pro Pro Gln Leu Ser
1 5 10 15

Pro Val Gln Ala
20

<210> 25

10 <211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> caráct. mísc.

15 <222> (6)..(6)

<223> n = t o c

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (9)..(9)

20 <223> n = g o a

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (12)..(12)

<223> n = a, t, g o c

25 <220>

<221> caráct. mísc.

<222> (15)..(15)

<223> n = a, t, g o c

<220>

30 <221> caráct. mísc.

<222> (18)..(18)

<223> n = t o c

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (21)..(21)

5 <223> n = g o a

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (24)..(24)

<223> n = a, t, g o c

10 <220>

<221> caráct. mísc.

<222> (27)..(27)

<223> n = a, t, g o c

<220>

15 <221> caráct. mísc.

<222> (30)..(30)

<223> n = a, t, g o c

<220>

<221> caráct. mísc.

20 <222> (33)..(33)

<223> n = a, t, g o c

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (36)..(36)

25 <223> n = a, t, g o c

<220>

<221> caráct. mísc.

<222> (39)..(39)

<223> n = t o c

30 <220>

<221> caráct. mísc.

<222> (42)..(42)

<223> n = a, t, g o c

<220>

- <221> caráct. misc.
 <222> (45)..(45)
 <223> n = t o c
 <220>
- 5 <221> caráct. misc.
 <222> (48)..(48)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
- 10 <221> caráct. misc.
 <222> (51)..(51)
 <223> n = g o a
 <400> 25
cgcttnttng cngcnttntt ngcngengen ggnccnttng gnttngcntt ngggccctcg 60
tccgtc 66
- <210> 26
- 15 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> primer
- 20 <400> 26
 gccgacctgg agagcgccta cggacgcgcc 30
 <210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
- 25 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> primer
 <220>
 <221> caráct. misc.
- 30 <222> (12)..(12)
 <223> n = t o c
 <220>
 <221> caráct. misc.

<222> (15)..(15)
 <223> n = g o a
 <220>
 <221> caráct. mísc.
 5 <222> (18)..(18)
 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 <221> caráct. mísc.
 <222> (21)..(21)
 10 <223> n = a, t, g o c
 <220>
 <221> caráct. mísc.
 <222> (24)..(24)
 <223> n = t o c
 15 <220>
 <221> caráct. mísc.
 <222> (27)..(27)
 <223> n = g o a
 <220>
 20 <221> caráct. mísc.
 <222> (30)..(30)
 <223> n = a, t, g o c
 <400> 27
 cgcgcccgc tntngcngc nttntngcn 30
 25 <210> 28
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 30 <223> primer
 <400> 28
 tgcgtacatg ggctccggcg acggccc 27

REIVINDICACIONES

1. Una variante de Scratch Mamífero, en la que la variante de Scratch Mamífero comprende un dominio transmembrana y se expresa en la superficie de las células cancerosas.
- 5 2. La variante de Scratch Mamífero según la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO:1 o una variante de la misma, y en donde la variante de Scratch Mamífero comprende un dominio transmembrana y se expresa en la superficie de las células cancerosas.
3. La variante de Scratch Mamífero según la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID NO:2 o una variante de la misma, y en donde la variante de Scratch Mamífero comprende un dominio transmembrana y se expresa en la superficie de las células cancerosas.
- 10 4. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica una variante de Scratch Mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. La secuencia de ácido nucleico aislada según la reivindicación 4 que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO:6.
- 15 6. La secuencia de ácido nucleico aislada según la reivindicación 4 que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO:25.
7. Un vector de expresión recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. Una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 7.
- 20 9. Un método para detectar células cancerosas o controlar el cáncer en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer, que comprende detectar la variante de Scratch Mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un fragmento de la misma, en una célula en una muestra del sujeto, en donde el cáncer es indicado si la variante de Scratch Mamífero se detecta en la célula.
- 25 10. El método según la reivindicación 9, que comprende:
 - (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo que se une a la variante de Scratch Mamífero;
 - (b) detectar el nivel de la variante de Scratch Mamífero en la muestra; y
 - (c) comparar el nivel de la muestra con una muestra de control, en donde niveles aumentados de la variante de Scratch Mamífero en comparación con el control indica que el sujeto tiene cáncer.
- 30 11. Un método para detectar células cancerosas o controlar el cáncer en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer, que comprende detectar la secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en una muestra del sujeto, en donde el cáncer es indicado, si se detecta la secuencia de ácido nucleico en donde el método comprende
 - (a) extraer las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 de una muestra del sujeto;
 - 35 (b) amplificar las moléculas de ácido nucleico extraídas utilizando un cebador que tiene la secuencia mostrada en SEC ID NO:27 en la reacción en cadena de la polimerasa;
 - (c) determinar la presencia de moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína, y
 - (d) comparar el nivel de la secuencia de ácido nucleico en la muestra con una muestra de control, en donde niveles incrementados de la secuencia de ácido nucleico en comparación con el control indican que el sujeto tiene cáncer.
 - 40
- 45 12. Un método para detectar células cancerosas o controlar el cáncer en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer, que comprende:
 - (a) extraer moléculas de ácido nucleico que codifican Scratch de tipo salvaje o la variante de Scratch según las reivindicaciones 1 a 3 de una muestra del sujeto;
 - (b) digerir las moléculas de ácido nucleico con un enzima de restricción KpnI, y
 - (c) determinar el tamaño de las moléculas de ácidos nucleicos digeridas en donde la presencia de moléculas de ácido nucleico no digeridas indica que el sujeto tiene una predisposición a desarrollar cáncer.
 - 50
13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de la variante de Scratch Mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en mezcla con un diluyente o portador adecuado.
14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la secuencia de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en mezcla con un diluyente o portador adecuado.
15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del vector de expresión recombinante de la reivindicación 7 en mezcla con un diluyente o portador adecuado.
- 55 16. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende además un adyuvante.
17. Uso de la variante de Scratch Mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una secuencia de ácido nucleico aislada según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, o el vector recombinante de la reivindicación 7 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer o provocar una respuesta inmune.

18. Una variante de Scratch Mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una secuencia aislada de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, o el vector recombinante de la reivindicación 7 para el tratamiento o prevención del cáncer o para la provocación de una respuesta inmune.

5

19. Un método de identificación de compuestos por su capacidad para prevenir o tratar el cáncer, que comprende las etapas:

10

- (a) contactar una célula que expresa la variante de Scratch Mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con un compuesto de ensayo;
- (b) determinar la expresión o función de la variante de Scratch Mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
- (c) comparar la expresión o función de la variante de Scratch Mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con un control, en donde una disminución en la expresión o función de la variante de Scratch Mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en comparación con el control es indicativa de un compuesto útil para prevenir o tratar el cáncer.

15

20

25

30

FIGURA 1

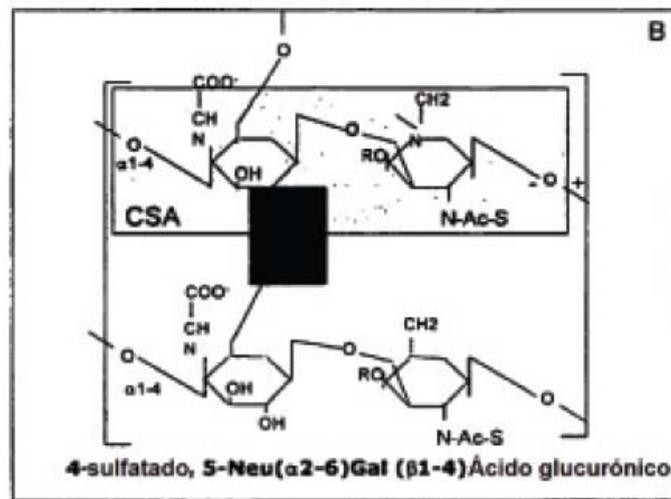
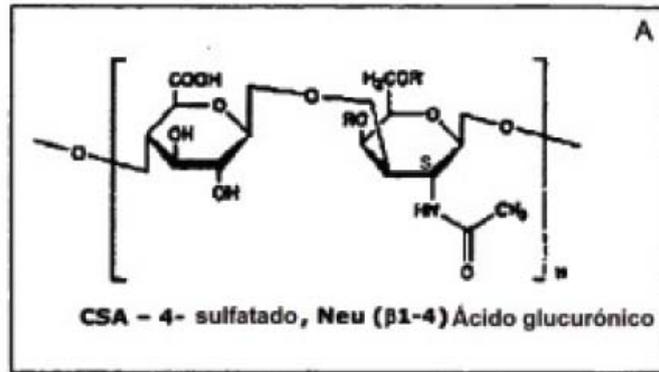
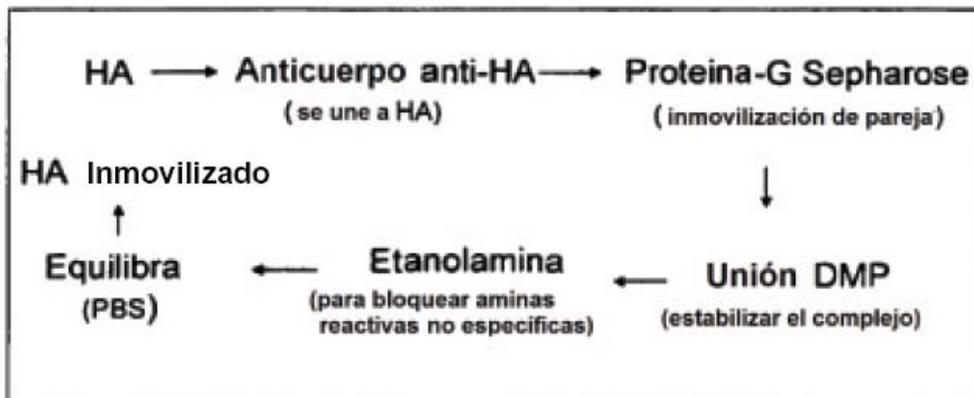


FIGURA 2



ES 2 395 103 T3

FIGURA 3

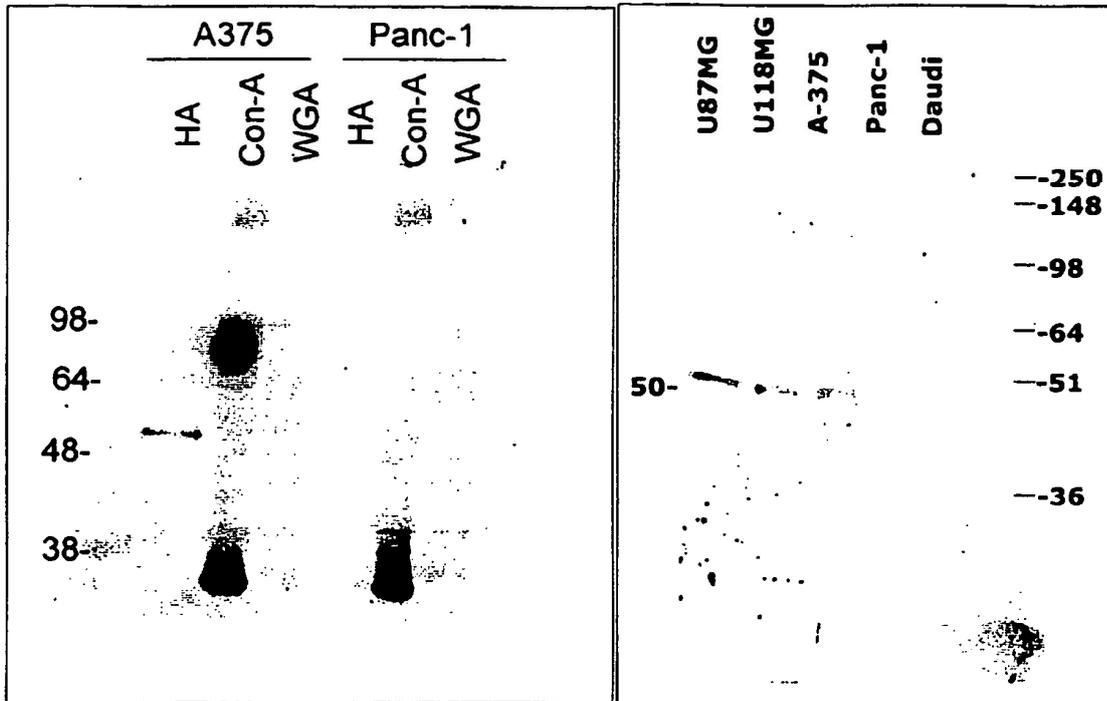


FIGURA 4

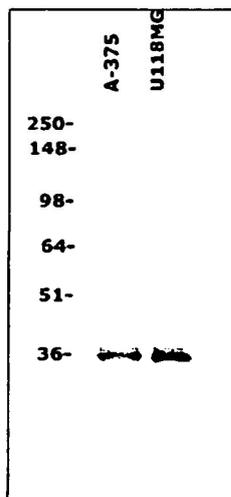


FIGURA 5

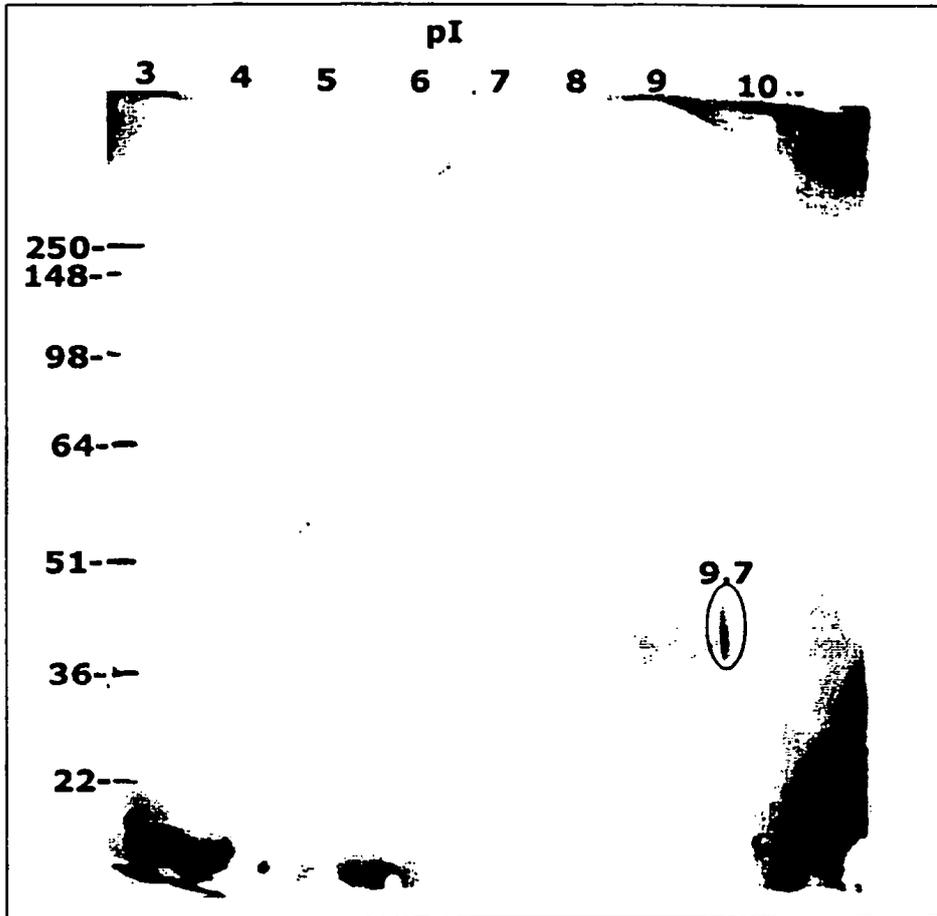


FIGURA 6

	<u>M</u> PRSFLVKKV	<u>K</u> LDAFSSADL	<u>E</u> SAYGRARSD	<u>L</u> GAPLHDKGY	<u>L</u> SDYVGPSSV
51	<u>Y</u> DGDAEAALL	<u>K</u> GPSPEPMYA	<u>A</u> AVRGELGPA	<u>A</u> AGSAPPPTP	<u>R</u> PELATAAGG
101	<u>Y</u> INGDAAVSE	<u>G</u> YAADAFIT	<u>D</u> GRSRRKASN	<u>A</u> GSAAAPSTA	<u>S</u> AAAPDGDAG
151	<u>G</u> GGGAGGRSL	<u>G</u> SGPGGRGGT	<u>R</u> AGAGTEARA	<u>G</u> PGAAGAGGR	<u>H</u> ACGECGKTY
201	<u>A</u> TSSNLSRHK	<u>Q</u> THRSLDSQL	<u>A</u> RRCPCTCGKV	<u>Y</u> VSMPAMAMH	<u>L</u> LTHDLRHKC
251	<u>G</u> VCCKAFSRP	<u>W</u> LQGHMRSH	<u>T</u> GEKPFCAH	<u>C</u> GKAFADRSN	<u>L</u> RAHMOTHTSA
301	<u>F</u> KHFQCKRCK	<u>K</u> SFALKSYLN	<u>K</u> HYESACFKG	<u>G</u> AGGPAAPAP	<u>P</u> QLSPVQA

FIGURA 7

cobertura de secuencia obtenida para gi|15928387 de MDA-MB-435S

Desconocido (proteína para IMAGE:4156878) [Homo sapiens] gi 15928387	
	AGAGGRHACG ECGKTYATSS NLSRHKQTHR SLDSQLARRC PTCGKVYVSM
51	PAMAMHLLTH DLRHKCGVCG KAFSRPWLLQ GHMRSHTGEK PFGCAHCGKA
101	FADRSNLRAH MQTHSAFKHF QCKRCKKSFA LKSYLNKHYE SACFKGGAGG
151	PAAPAPPQLS PVQA

comparación de secuencias BLAST para la secuencia derivada de 435S y Srt

435S_seq	1	AGAGGRHACGECGKTYATSSNLSRHKQTHRSLSQLARRCPTCGKVYVSM
Scr1_seq	185	GGRHACGECGKTYATSSNLSRHKQTHRSLSQLARRCPTCGKVYVSM
435S_seq	61	DLRHKCGVCGKAFSRPWLLQGHMRSHTGEKPFPGCAHCGKAFADRSNLRAHMQTHSAFKHF
Scr2_seq	245	DLRHKCGVCGKAFSRPWLLQGHMRSHTGEKPFPGCAHCGKAFADRSNLRAHMQTHSAFKHF
435S_seq	121	QCKRCKKSFAKSYLNKHYESACFKGGAGGPAAPAPPQLSPVQA
Scr3_seq	305	QCKRCKKSFAKSYLNKHYESACFKGGAGGPAAPAPPQLSPVQA

MDA-MB-435S mostro la presencia de una versión truncada de Scratch, i.e., proteína 17.823kDa gi|15928387, con 100% de homología a las secuencias 185-366 de la molecula scratch original identificada de la celula del glioma, melanoma y glioblastoma

5

10

5

10

FIGURA 8

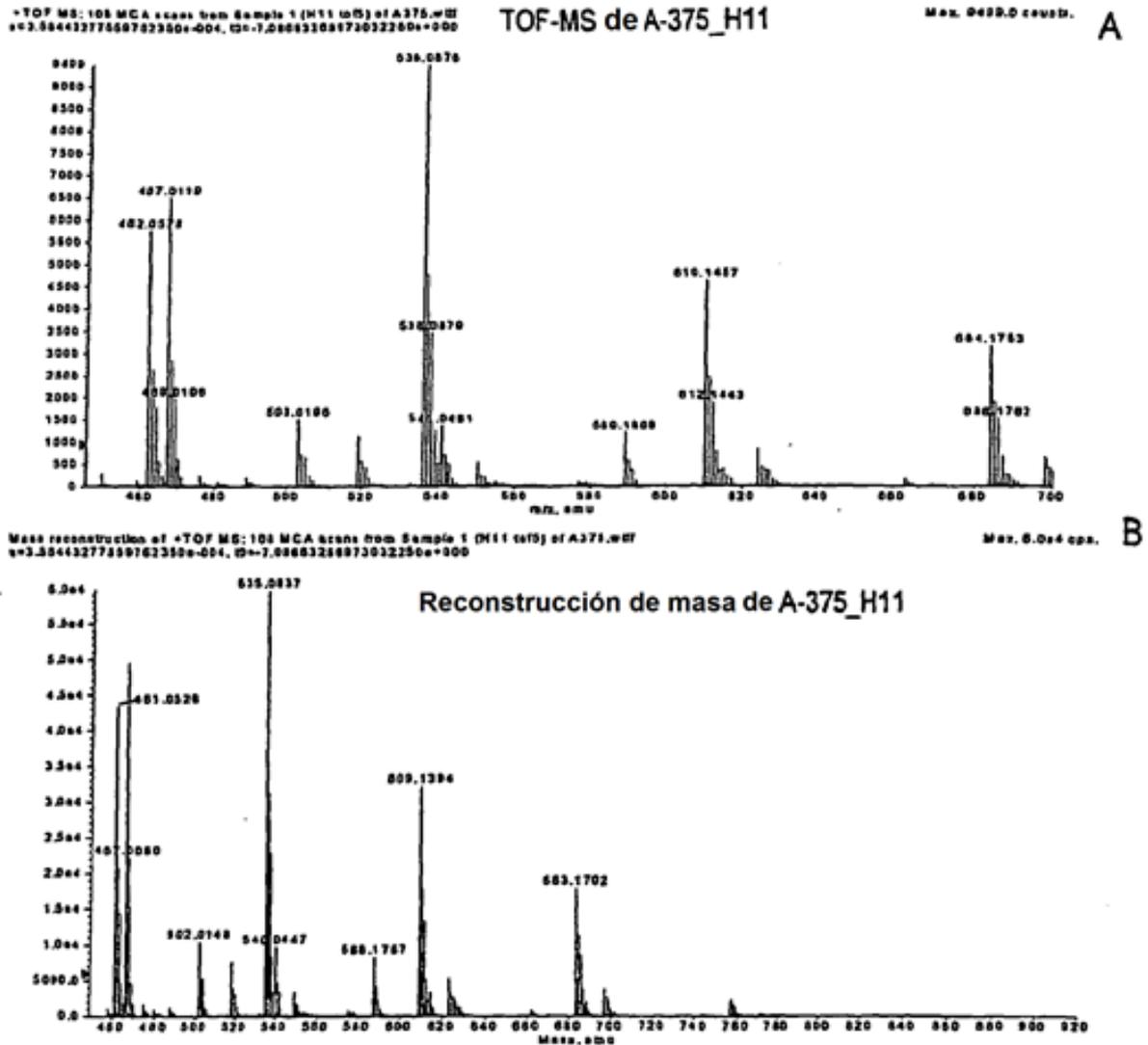


Figura 8: Escaneos TOFMS de péptidos obtenidos de la línea celular A-375, para detectar la presencia de iones péptidicos en la muestra: Cien escaneos a 1200-1400V en el rango de 100-1200 amu en un nanospray estatico resultó en la recuperación de un numero significativo de péptidos, que al ser analizados produjo un ID de proteína como Scratch Mamífero.

Figura 8A representa el escaneo TOF_MS con todos los iones cargados de péptidos multiplicadamente y

Figura 8B representa el espectro desconvolucionado con iones cargados de péptidos individualmente

FIGURA 9

TOF MS de U87MG_H11

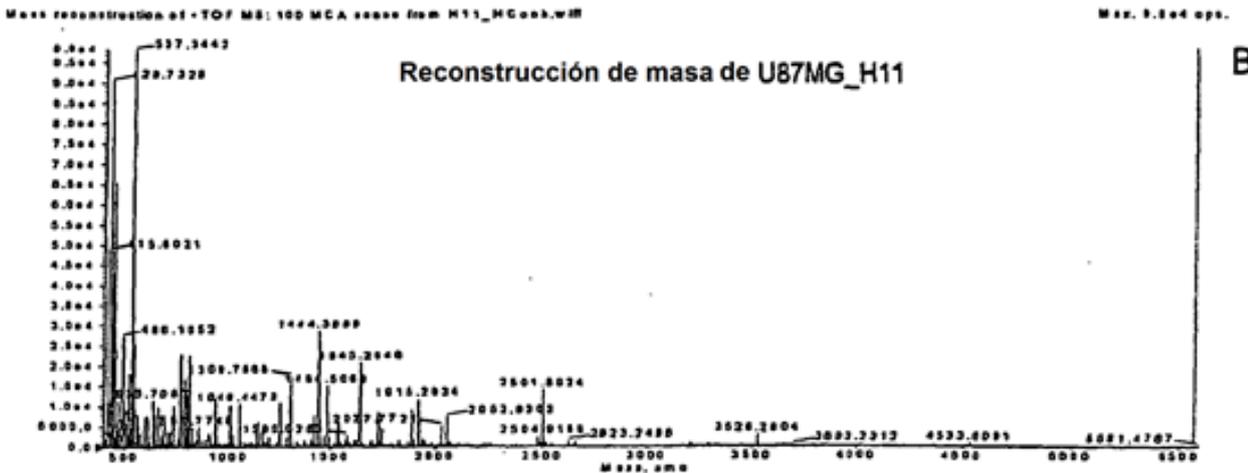
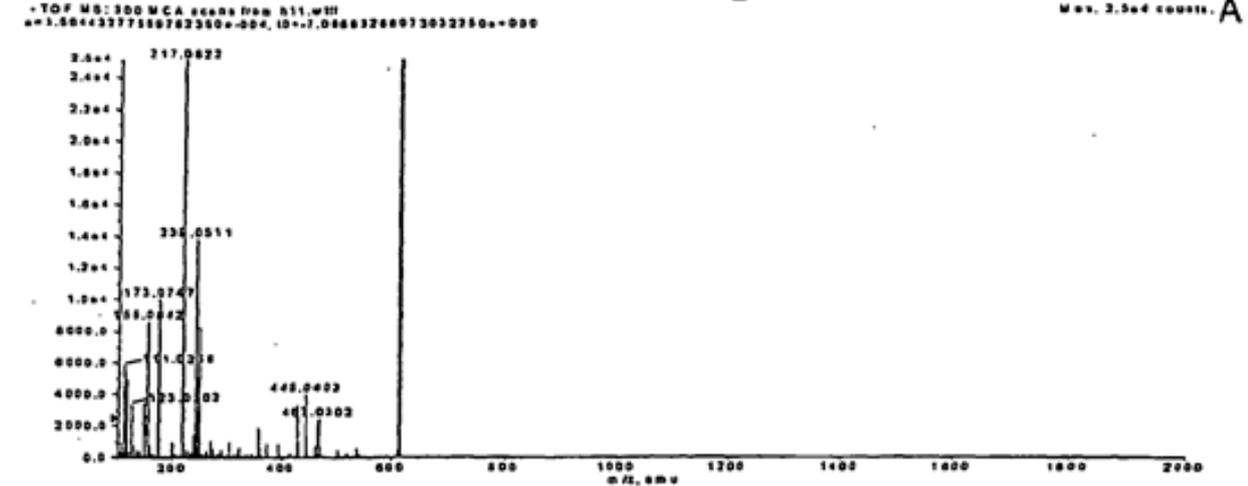


Figura 9: Escaneos TOFMS de péptidos obtenidos de la línea celular U87MG para detectar la presencia de iones péptidicos en la muestra: Trescientos escaneos a 1200-1400V en el rango de 100-1200 amu en un nanospray estatico resultó en la recuperación de un número significante de péptidos, que al ser analizados produjo un ID de proteína como Scratch Mamífero.

Figura 9A representa el escaneo TOF_MS con todos los iones cargados de péptidos multiplicadamente y

Figura 9B representa el espectro desconvolucionado con iones cargados de péptidos individualmente.

ES 2 395 103 T3

FIGURA 10

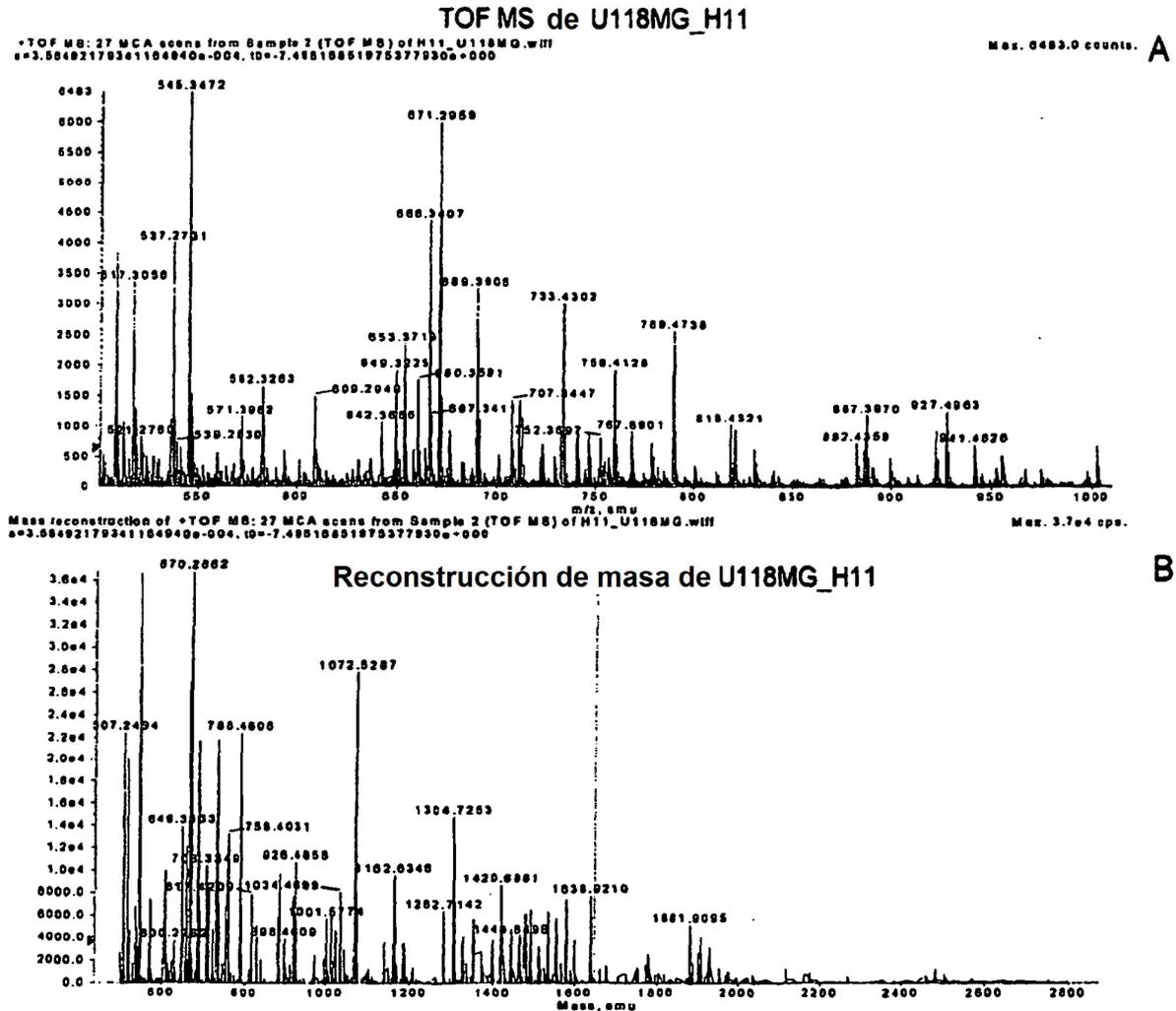


Figura 10: Escaneos TOFMS de péptidos obtenidos de la línea celular U118MG, para detectar la presencia de todos los iones de péptidos en la muestra: Veintisiete escaneos a 1200-1400V en el rango de 100-1200 amu en un nanospray estatico resultó en la recuperación de un número significativo de péptidos, que al analizarlos produjo un ID de proteína como Scratch Mamifero. Figura 10A representa el escaneo TOF_MS con todos los iones cargados de péptidos multiplicadamente y Figura 10B representa el espectro desconvolucionado con iones cargados de péptidos unicamente.

FIGURA 11

SEQ ID NO: 1

	<u>MPRSFLVKKV</u>	<u>KLDAFSSADL</u>	<u>ESAYGRAREL</u>	<u>AAFLAAAGPF</u>	<u>GFALGPSSV</u>
51	<u>YDGDAEAALL</u>	<u>KGPSPEPMYA</u>	<u>AAVRGELGPA</u>	<u>AAGSAPPPTP</u>	<u>RPELATAAGG</u>
101	<u>YINGDAAVSE</u>	<u>GYAADAFFIT</u>	<u>DGRSRRKASN</u>	<u>AGSAAAPSTA</u>	<u>SAAAPDGDAG</u>
151	<u>GGGAGGRSL</u>	<u>GSGPGGRGGT</u>	<u>RAGAGTEARA</u>	<u>GPGAAGAGGR</u>	<u>HACGECGKTY</u>
201	<u>ATSSNLSRHK</u>	<u>QTHRSLDSQL</u>	<u>ARRCPTCGKV</u>	<u>YVSMFAMAMH</u>	<u>LLTHDLRHKC</u>
251	<u>GVC GKAFSRP</u>	<u>WLLQGHMRSH</u>	<u>TGEKPFCAH</u>	<u>CGKAFADRSN</u>	<u>LRAHMQTHSA</u>
301	<u>EKFHQCKRCK</u>	<u>KSFALKSYLN</u>	<u>KHYESACFKG</u>	<u>GAGGPAAPAP</u>	<u>PQLSPVQA</u>

FIGURA 12

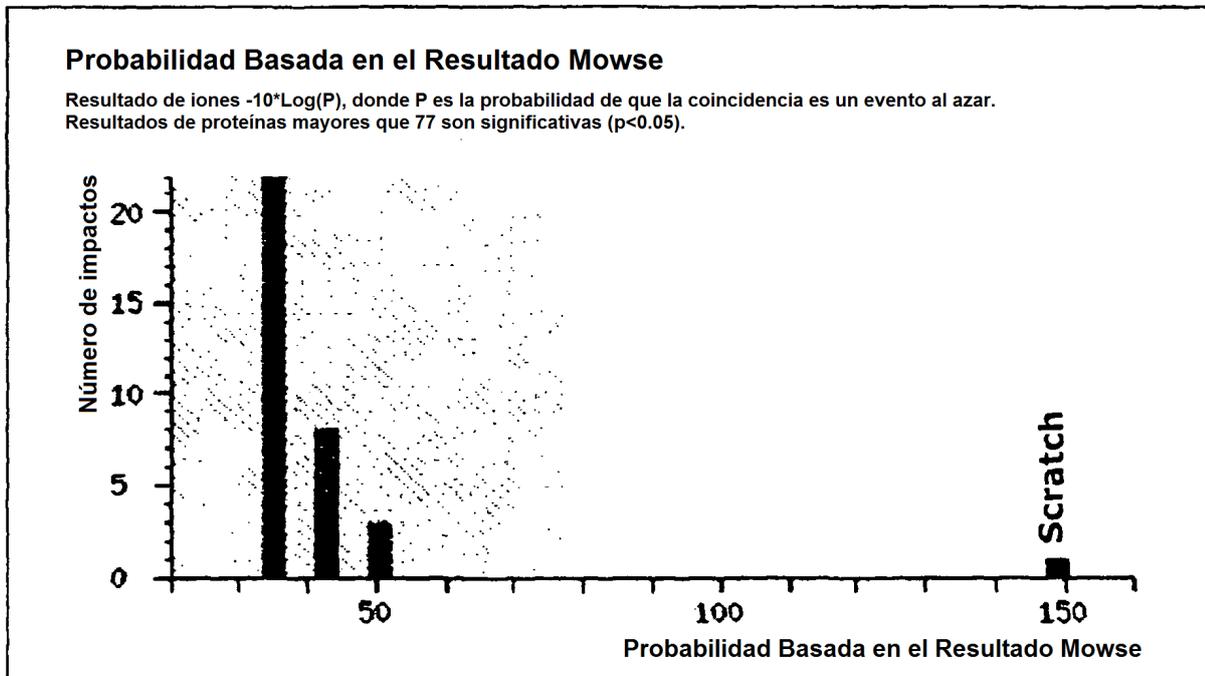
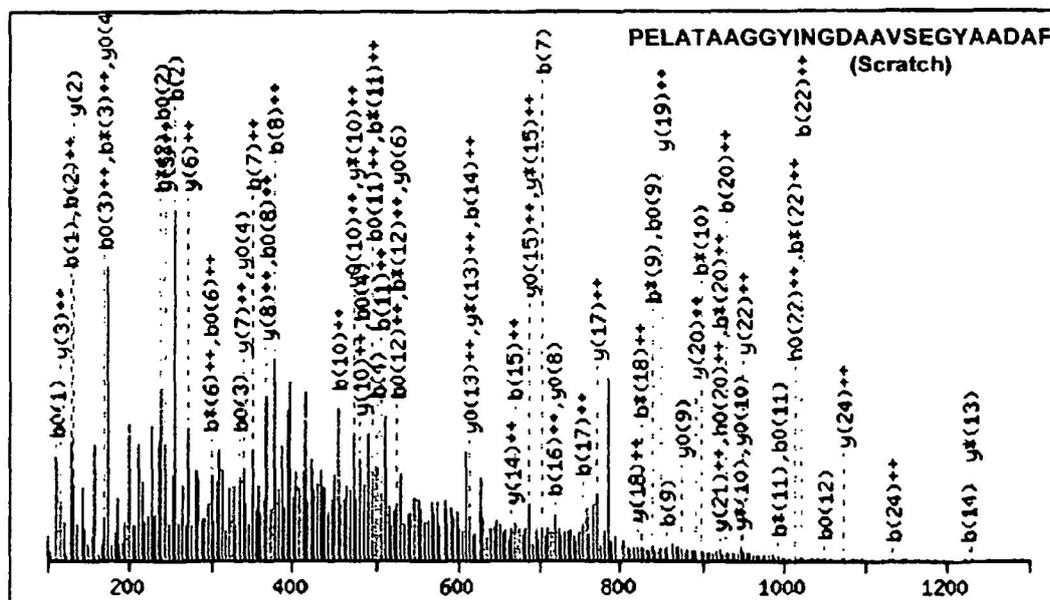


FIGURA 13

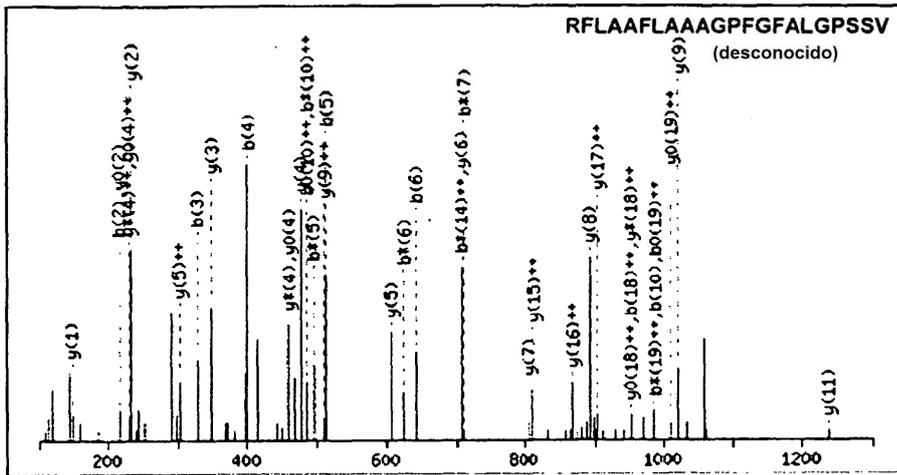
	Acceso	Masa	Resultado	Descripción
1	gi 13775236	35570	259	scratch [Homo sapiens]
2	gi 18700038	36546	137	Scratch homolog1 Zinc finger protein [Mus musculus]
3	gi 34867010	36573	58	PREVISTO: similar a scratch represor transcripcional [Rattus norvegicus]
4	gi 46430491	32583	52	proteina scratch 2 [Homo sapiens]
5	gi 51460390	13830	52	PREVISTO: proteina hipotetica XP_499570 [Homo sapiens]
6	gi 76633954	17808	51	PREVISTO: similar a scratch homolog 1. zinc finger protein. partial [Bos taurus]
7	gi 62646193	29336	48	PREVISTO: similar a scratch represor transcripcional 2
8	gi 68401409	26007	41	PREVISTO: similar a scratch homolog 1. zinc finger protein [Danio rerio]
9	gi 235397	24695	30	HMFG [Homo sapiens]
10	gi 2239432	3387	30	Receptor de células T de cadena delta [Homo sapiens]
11	gi 184111	5867	30	Proteina relacionada a Kruppel (AA a 172)
12	gi 70798131	12787	30	región variable de inmunoglobulina de cadena pesada [Homo sapiens]
13	gi 5668903	10109 8	30	heparan N-deacetylase/N-sulfotransferase 3 [Homo sapiens]
14	gi 55957998	41108	30	OTTHUMP0000021964 [Homo sapiens]
15	gi 40218010	14253	29	región variable de inmunoglobulina de cadena pesada [Homo sapiens]
16	gi 17384998	13254	29	región variable de inmunoglobulina de cadena pesada [Homo sapiens]
17	gi 3212542	43068	29	Cadena D, Estructura De Deshidrogenasa de Isovaleril-Coa Humano
18	gi 1552280	14036	28	inmunoglobulina G de cadena pesada [Homo sapiens]
19	gi 1675307	9276	28	cadena pesada de Ig reorganizado [Homo sapiens]
20	gi 746415	52725	28	I kappa BR

FIGURA 14



Masa monoisotópico de péptido neutro 2Mr(calc):2400.1206 Resultado de iones: 53 Estimado: 0.89
 Coincidencias (Negrita Roja) 72/287 fragmento de iones que usan 134 picos mas intensos

FIGURA 15



Masa monoisotópico de péptido neutro 2Mr(calc):2400.1206 Resultado de iones: 90 Estimado: 0.0016
 Coincidencias (Negrita Roja) 32/220 fragmento de iones que usan 36 picos mas intensos

FIGURA 16

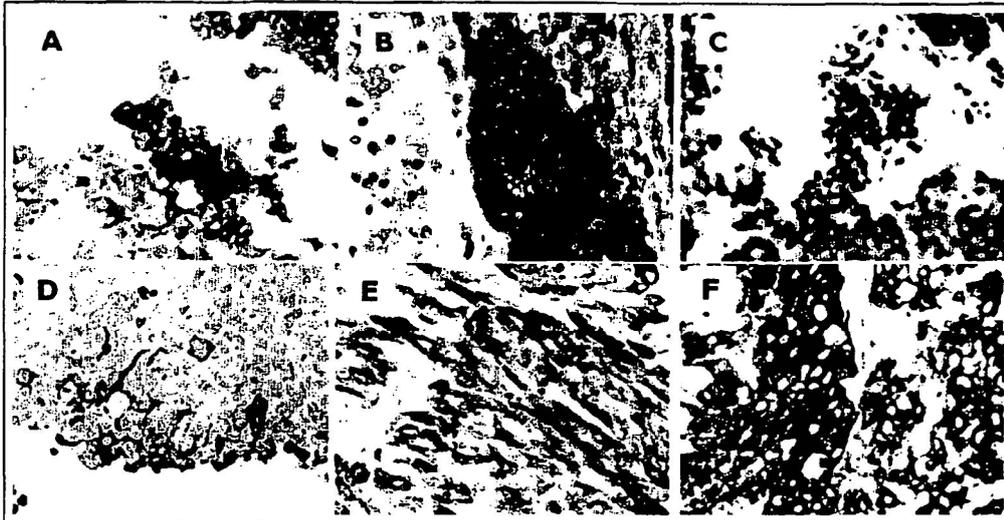
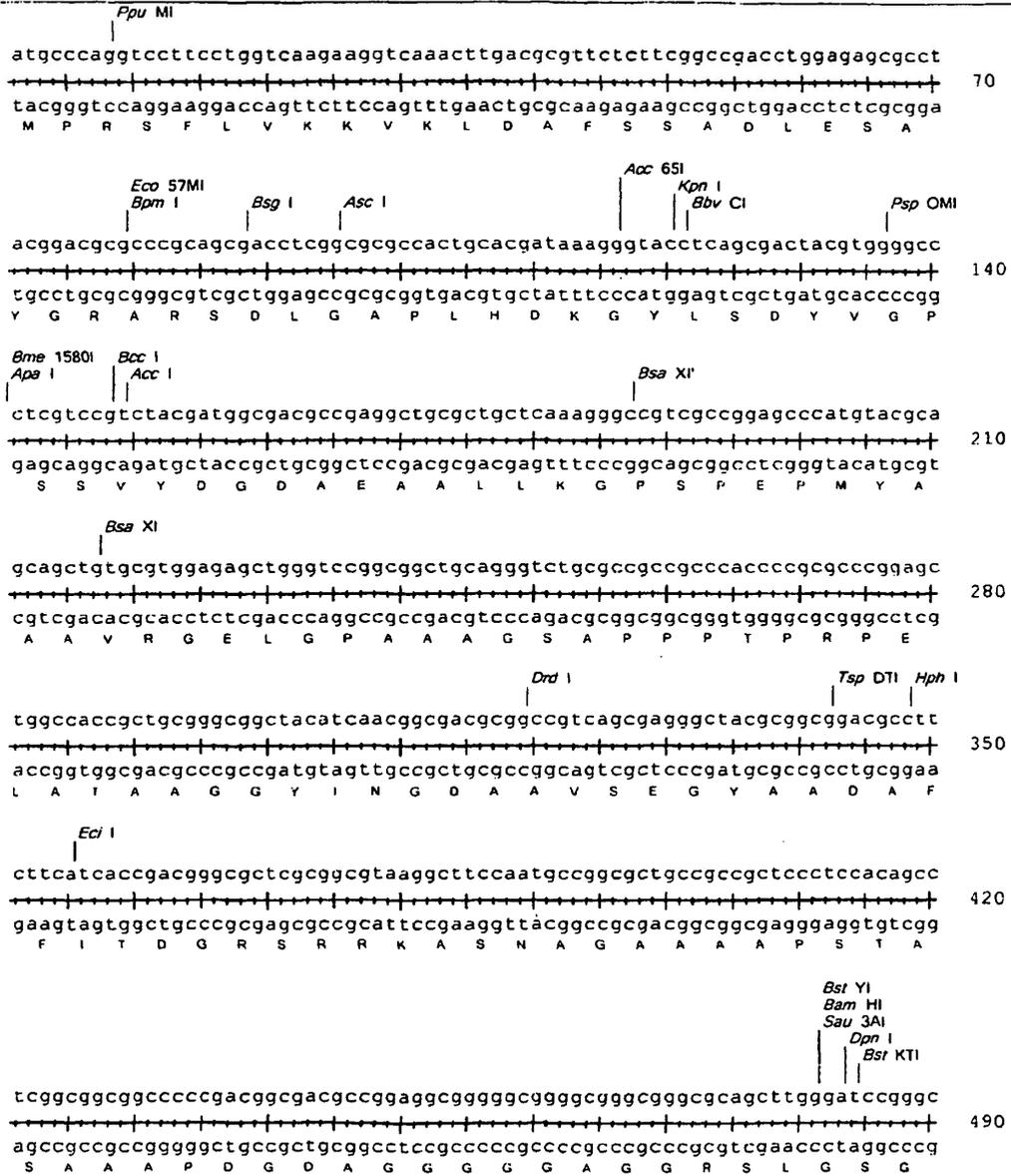


Figura 16: Fotografías representativas de la membrana específica Scratch manchada en tejidos tumorales: Fotografías representativas de VB3-011 manchado inmunohistoquímico de tejido neuroblastoma (A-C) y tejido melanoma (D-F). Las secciones de tejido son, (A) - Neuroblastoma en etapa temprana (Etapa I, II, III no N myc amplificada), 3+; (B) - No-N-myc amplificada Neuroblastoma de etapa IV, 2+; (C) - N-myc amplificada Neuroblastoma de etapa IV, 3+. (D) - Melanoma de etapa temprana (Etapa I - III), 3+; (E) - Melanoma de etapa IV, 3+; (F) - enfermedad metastásica, 3+. Todas las fotografías se muestran con una ampliación de 400X

FIGURA 17

Mapa de restricción de **Scratch-1**



Continuación de FIGURA 17

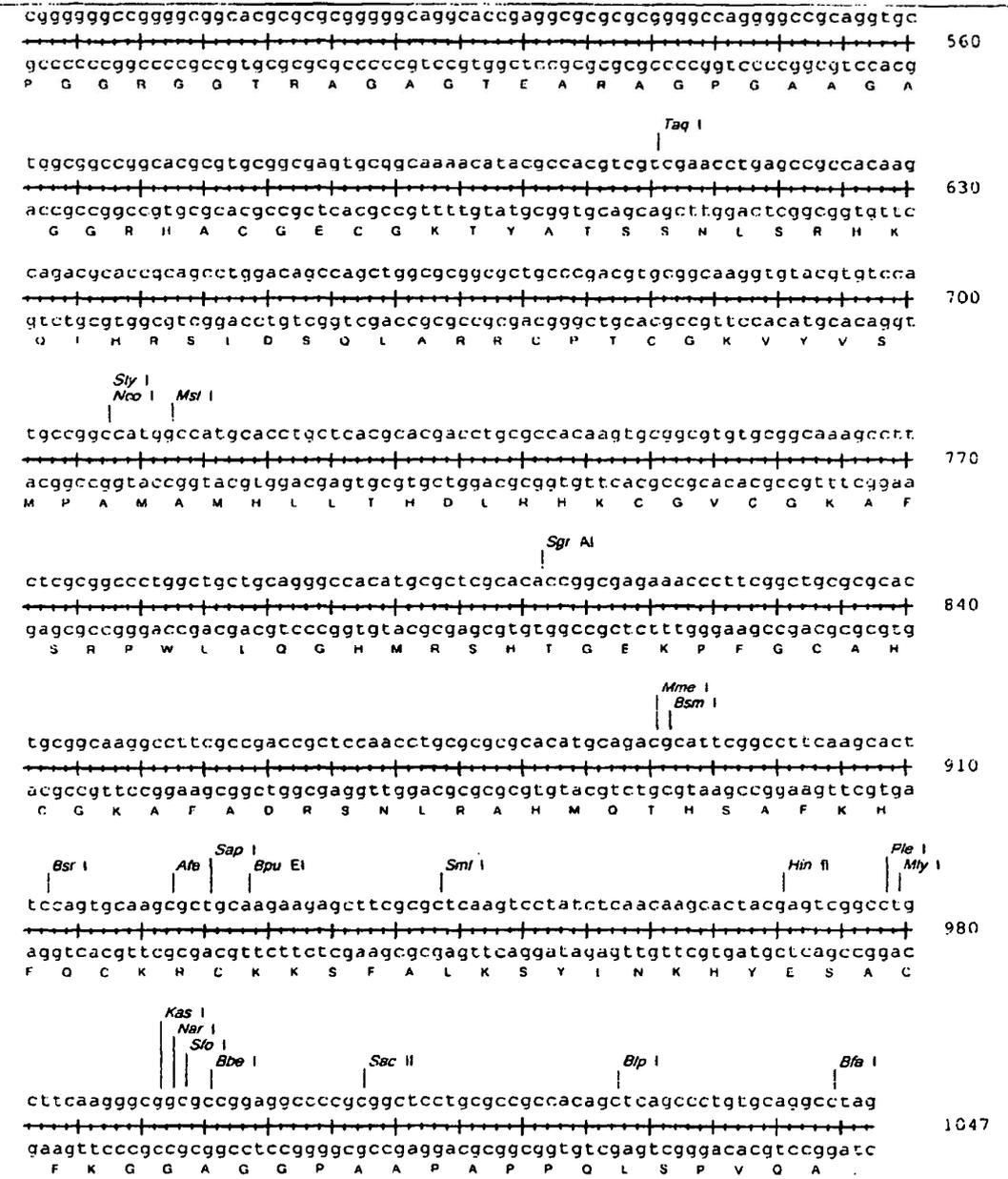


FIGURA 18

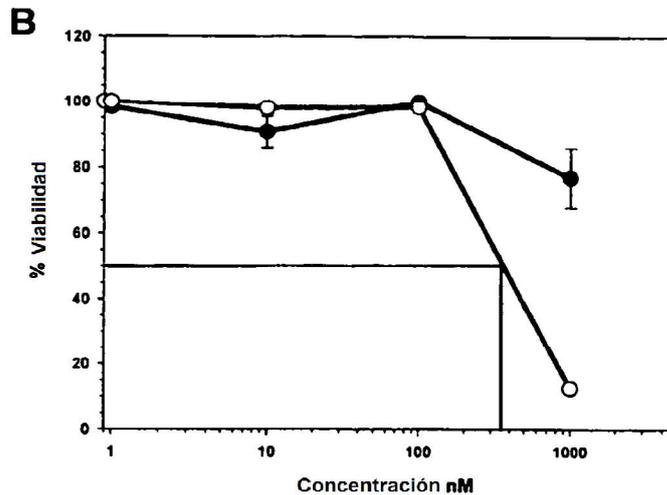


Figura 18: Citotoxicidad In vitro de VB6-011: Ensayo MTS de VB6-011 con células positivas al antígeno MB-435S (círculo abierto) y células negativas al antígeno Panc-1 (círculo negro). Las células sembradas a 1000 células por pocillo, fueron incubadas con las proteínas Fab-de-bougain purificadas. Después de 5 días de incubación, la viabilidad celular se midió y IC_{50} fue determinado.